

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 198**

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02736480 .1**  
96 Fecha de presentación: **24.01.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1392823**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2004**

54 Título: **Genes de desaturasa y uso de los mismos**

30 Prioridad:  
**25.01.2001 US 769863**  
**22.01.2002 US 54534**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.03.2012**

73 Titular/es:  
**ABBOTT LABORATORIES**  
**CHAD 0377/AP6D-2 100 Abbott Park Road**  
**Abbott Park IL 60064-3500 , US**

72 Inventor/es:  
**MUKERJI, Pradip;**  
**HUANG, Yung-Sheng;**  
**DAS, Tapas;**  
**THURMOND, Jennifer y**  
**PEREIRA, Suzette, L.**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

**ES 2 377 198 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Genes de desaturasa y uso de los mismos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a la identificación y aislamiento de genes que codifican enzimas (es decir,  $\Delta 5$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina* y  $\Delta 6$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina*) implicadas en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados y a usos de los mismos. En particular, la  $\Delta 5$ -desaturasa cataliza la conversión de, por ejemplo, ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico (DGLA) en ácido araquidónico (AA) y de ácido (n-3)-eicosatetraenoico (20:4n-3) en ácido eicosapentaenoico (20:5n-3). La delta-6 desaturasa cataliza la conversión de, por ejemplo, ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) en ácido estearidónico (STA). Los productos convertidos pueden utilizarse entonces como sustratos en la producción de otros ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). El producto u otros ácidos grasos poliinsaturados pueden añadirse a composiciones farmacéuticas, composiciones nutricionales, piensos animales, así como otros productos tales como cosméticos.

**Información antecedente**

Las desaturasas son críticas en la producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que tienen muchas funciones importantes. Por ejemplo, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son componentes importantes de la membrana plasmática de una célula, donde se encuentran en forma de fosfolípidos. También sirven como precursores para prostaciclina, eicosanoides, leucotrienos y prostaglandinas de mamíferos. Además, los PUFA son necesarios para el desarrollo apropiado del cerebro del lactante en desarrollo, así como para la formación y reparación de tejidos. En vista de la significación biológica de los PUFA, se han realizado intentos para producirlos, así como intermedios que conducen a su producción, de una forma eficaz.

Varias enzimas están implicadas en la biosíntesis de PUFA además de la  $\Delta 5$ -desaturasa y de la  $\Delta 6$ -desaturasa. Por ejemplo, la elongasa (elo) cataliza la conversión de ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA) en ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico (DGLA) y de ácido estearidónico (18:4n-3) en ácido (n-3)-eicosatetraenoico (20:4n-3). El ácido linolénico (LA, 18:2- $\Delta 9,12$  o 18:2n-6) se produce a partir del ácido oleico (18:1- $\Delta 9$ ) por una  $\Delta 12$ -desaturasa. El GLA (18:3- $\Delta 6,9,12$ ) se produce a partir de ácido linoleico mediante una  $\Delta 6$ -desaturasa.

Debe señalarse que los animales no pueden desaturar más allá de la posición  $\Delta 9$  y, por lo tanto, no pueden convertir el ácido oleico en ácido linoleico. Asimismo, el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA, 18:3- $\Delta 9,12,15$ ) no puede sintetizarse por mamíferos. Sin embargo, el ácido  $\alpha$ -linolénico puede convertirse en ácido estearidónico (STA, 18:4- $\Delta 6,9,12,15$ ) por una  $\Delta 6$ -desaturasa (véase la publicación PCT WO 96/13591 y The Faseb Journal, Abstracts, Parte I, Resumen 3093, página A532 (Experimental Biology 98, San Francisco, CA, 18-22 abril 1998); véase también la Patente de Estados Unidos N° 5.552.306), seguido de alargamiento a ácido (n-3)-eicosatetraenoico (20:4- $\Delta 8,11,14,17$ ) en mamíferos y algas. Este ácido graso poliinsaturado (es decir, 20:4- $\Delta 8,11,14,17$ ) puede convertirse entonces en ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5- $\Delta 5,8,11,14,17$ ) por una  $\Delta 5$ -desaturasa, tal como la de la presente invención. Otros eucariotas, incluyendo hongos y plantas, tienen enzimas que desaturan en el carbono 12 (véase la publicación PCT WO 94/11516 y la Patente de Estados Unidos N° 5.443.974) y en el carbono 15 (véase la publicación PCT WO 93/11245). Los ácidos grasos poliinsaturados principales de animales se obtienen por lo tanto de la dieta y/o de la desaturación y alargamiento de ácido linoleico y ácido  $\alpha$ -linolénico. En vista de estas dificultades, es de un interés significativo aislar genes implicados en la síntesis de PUFA a partir de especies que producen de forma natural estos ácidos grasos, y expresar estos genes en un sistema microbiano, vegetal o animal que pueda alterarse para proporcionar la producción de cantidades comerciales de uno o más PUFA.

Uno de los PUFA de cadena larga más importante señalado anteriormente es el ácido araquidónico (AA). El AA se encuentra en hongos filamentosos y también puede purificarse a partir de tejidos de mamífero incluyendo el hígado y las glándulas adrenales. Como se ha señalado anteriormente, la producción de AA a partir de ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico está catalizada por una  $\Delta 5$ -desaturasa. El EPA es otro PUFA de cadena larga importante. El EPA se encuentra en hongos y también en aceites marinos. Como se ha señalado anteriormente, el EPA se produce a partir de ácido (n-3)-eicosatetraenoico y está catalizado por una  $\Delta 5$ -desaturasa. En vista de la discusión anterior, existe una necesidad definitiva de enzimas  $\Delta 5$ -desaturasa y  $\Delta 6$ -desaturasa, los genes respectivos que codifican estas enzimas, así como métodos recombinantes de producción de estas enzimas. Además, existe la necesidad de aceites que contengan niveles de PUFA más allá de los presentes de forma natural, así como los enriquecidos en nuevos PUFA. Dichos aceites sólo pueden generarse por aislamiento y expresión de los genes de  $\Delta 5$ -desaturasa y  $\Delta 6$ -desaturasa.

**Sumario de la invención**

La presente invención incluye una secuencia de nucleótidos aislada o fragmento que comprende o es complementario a al menos el 90% de una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID N°: 13 (Figura 2) o la

SEC ID N°: 19 (Figura 4). En particular, la secuencia de nucleótidos aislada puede estar representada por la SEC ID N°: 13 o la SEC ID N°: 19. Estas secuencias pueden codificar una desaturasa funcionalmente activa que utilice un ácido graso poliinsaturado como sustrato.

- 5 Además, la presente invención incluye una secuencia de nucleótidos aislada que comprende o es complementaria a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa y que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEC ID N°: 20.

10 Las secuencias de nucleótidos pueden proceder, por ejemplo, de un hongo tal como *Saprolegnia diclina* (SEC ID N°: 13 y SEC ID N°:19).

La presente invención también incluye proteínas o polipéptidos purificados codificados por las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente.

- 15 Además, la presente invención incluye un polipéptido purificado que desatura ácidos grasos poliinsaturados en el carbono 5 o carbono 6, y que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de las proteínas purificadas de la SEC ID N°: 14 o la SEC ID N°: 20.

20 Además, la presente invención también incluye un método de producción de una desaturasa (es decir,  $\Delta 5$  o  $\Delta 6$ ). Este método comprende las etapas de: a) aislar la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 19 y la SEC ID N°: 13; b) construir un vector que comprende: i) la secuencia de nucleótidos aislada unida operativamente a ii) una secuencia reguladora; y c) introducir el vector en una célula hospedadora durante un tiempo y en condiciones suficientes para la expresión de la  $\Delta 5$ -desaturasa o  $\Delta 6$ -desaturasa, según sea apropiado. La célula hospedadora puede ser, por ejemplo, una célula eucariota o una célula procariota. En particular, la célula procariota puede ser, por ejemplo, *E. coli*, Cyanobacteria o *B. subtilis*. La célula eucariota puede ser, por ejemplo, una célula de mamífero no humano, una célula de insecto, una célula vegetal o una célula fúngica (por ejemplo, una célula de levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Candida spp.*, *Lipomyces starkey*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces spp.*, *Hansenula spp.*, *Trichoderma spp.* o *Pichia Spp.*).

30 Además, la presente invención también incluye un vector que comprende: a) una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 13 y la SEC ID N°: 19 unida operativamente a b) una secuencia reguladora. La invención también incluye una célula hospedadora no humana que comprende este vector. La célula hospedadora no humana puede ser, por ejemplo, una célula eucariota o una célula procariota. Las células eucariotas y células procariotas adecuadas son como se han definido anteriormente.

35 Además, la presente invención también incluye una célula vegetal, planta o tejido vegetal que comprende el vector anterior, en la que la expresión de la secuencia de nucleótidos del vector da como resultado la producción de al menos un ácido graso poliinsaturado por la célula vegetal, planta o tejido vegetal. El ácido graso poliinsaturado puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en AA, EPA, GLA y STA, dependiendo de si la secuencia de nucleótidos codifica una  $\Delta 5$ - o  $\Delta 6$ -desaturasa.

45 Además, la presente invención también incluye una planta transgénica que comprende el vector anterior, en la que la expresión de la secuencia de nucleótidos del vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado en semillas de la planta transgénica.

Además, la invención incluye una célula de mamífero no humano que comprende el vector anterior, en la que la expresión de la secuencia de nucleótidos del vector da como resultado la producción de niveles alterados de AA, EPA, GLA o STA cuando la célula se cultiva en un medio de cultivo que comprende un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en LA, ALA, DGLA y SP.

50 Además, la presente invención incluye un método (es decir, "primer" método) para producir un ácido graso poliinsaturado, que comprende las etapas de: a) aislar la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 19; b) construir un vector que comprende la secuencia de nucleótidos aislada; c) introducir el vector en una célula hospedadora en tiempo y condiciones suficientes para la expresión de la enzima  $\Delta 5$ -desaturasa; y d) exponer la enzima  $\Delta 5$ -desaturasa expresada a un ácido graso poliinsaturado sustrato para convertir el sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto. El ácido graso poliinsaturado sustrato puede ser DGLA o 20:4n-3 y el ácido graso poliinsaturado producto puede ser AA o EPA, respectivamente. Este método puede comprender además la etapa de exponer el ácido graso poliinsaturado producto a una elongasa para convertir el ácido graso poliinsaturado producto en otro ácido graso poliinsaturado (es decir, "segundo" método). En este método que contiene la etapa adicional (es decir, "segundo" método), el ácido graso poliinsaturado producto puede ser AA o EPA, y el "otro" ácido graso poliinsaturado puede ser ácido adrenico o ácido (n-3)-docosapentaenoico, respectivamente. El método que contiene la etapa adicional puede comprender además una etapa de exponer el otro ácido graso poliinsaturado a una desaturasa adicional para convertir el otro ácido graso poliinsaturado en un ácido graso poliinsaturado final (es decir, "tercer" método). El ácido graso poliinsaturado final puede ser ácido (n-6)-docosapentaenoico o ácido docosahexaenoico (DHA).

65

Además, la presente invención incluye un método para producir un ácido graso poliinsaturado que comprende las etapas de: a) aislar la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 13; b) construir un vector que comprende la secuencia de nucleótidos aislada; c) introducir el vector en una célula hospedadora durante un tiempo y en condiciones suficientes para la expresión de la enzima  $\Delta 6$ -desaturasa; y d) exponer la enzima  $\Delta 6$ -desaturasa expresada a un ácido graso poliinsaturado sustrato para convertir el sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto. El ácido graso poliinsaturado sustrato puede ser LA o ALA y el ácido graso poliinsaturado producto puede ser GLA o STA, respectivamente. Este método puede comprender además la etapa de exponer el ácido graso poliinsaturado producto a una elongasa para convertir el ácido graso poliinsaturado producto en otro ácido graso poliinsaturado. En este método que contiene la etapa adicional, el ácido graso poliinsaturado producto puede ser GLA o STA, y el "otro" ácido graso poliinsaturado puede ser DGLA o ácido eicosatetraenoico (ETA), respectivamente. El método que contiene la etapa adicional puede comprender además una etapa de exponer el otro ácido graso poliinsaturado a una desaturasa adicional para convertir el otro ácido graso poliinsaturado en un ácido graso poliinsaturado final. El ácido graso poliinsaturado final puede ser AA o EPA.

Debería señalarse que a cada secuencia de nucleótidos y aminoácidos mencionada en la presente memoria se le ha asignado un número de identificación de secuencia particular. El Listado de Secuencias (que se encuentra en la presente memoria) enumera cada una de dichas secuencias y su número correspondiente.

### Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 6-15 no son parte de la presente invención. La Figura 1 ilustra la ruta biosintética de ácido graso y los papeles de la  $\Delta 5$ -desaturasa y  $\Delta 6$ -desaturasa en esta ruta.

La Figura 2 ilustra la secuencia de nucleótidos que codifica la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851) (SEC ID N°: 13).

La Figura 3 ilustra la secuencia de aminoácidos de la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851) (SEC ID N°: 14).

La Figura 4 ilustra la secuencia de nucleótidos que codifica la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851) (SEC ID N°: 19).

La Figura 5 ilustra la secuencia de aminoácidos de la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851) (SEC ID N°: 20).

La Figura 6 ilustra la secuencia de nucleótidos que codifica la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) (SEC ID N°: 28).

La Figura 7 ilustra la secuencia de aminoácidos de la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) (SEC ID N°: 29).

La Figura 8 ilustra la secuencia de nucleótidos que codifica la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (BICC7091) (SEC ID N°: 30).

La Figura 9 ilustra la secuencia de aminoácidos traducida de la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (HICC7091) (SEC ID N°: 31).

La Figura 10 ilustra la secuencia de nucleótidos que codifica la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (BICC7091) (SEC ID N°: 32).

La Figura 11 ilustra la secuencia de aminoácidos traducida de la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (BICC7091) (SEC ID N°: 33).

La Figura 12 ilustra la identidad de la secuencia de aminoácidos de la  $\Delta 5$ -desaturasa entre los clones pRAT-2a y pRAT-2c.

La Figura 13 ilustra la identidad de la secuencia de aminoácidos de la  $\Delta 6$ -desaturasa entre los clones pRAT-1a y pRAT-1b.

La Figura 14 ilustra la secuencia de nucleótidos que codifica el gen de la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Isochrysis galbana* CCMP1323 (SEC ID N°: 34).

La Figura 15 ilustra la secuencia de aminoácidos traducida de la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Isochrysis galbana* CCMP1323 (SEC ID N°: 35).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos traducidas de un gen de  $\Delta 5$ -desaturasa derivado de *Saprolegnia diclina* y un gen de  $\Delta 6$ -desaturasa derivado de *Saprolegnia diclina*. Además, la presente invención también incluye usos de estos genes y de las enzimas codificadas por estos genes. Por ejemplo, los genes y las enzimas correspondientes pueden usarse en la producción de ácidos grasos poliinsaturados tales como, por ejemplo, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico y/o ácido adrenico, que pueden añadirse a composiciones farmacéuticas, composiciones nutricionales y otros productos valiosos.

#### Los genes de $\Delta 5$ -desaturasa, los genes de $\Delta 6$ -desaturasa y las enzimas codificadas por los mismos

Como se ha señalado anteriormente, las enzimas codificadas por los genes de  $\Delta 5$ -desaturasa y los genes de  $\Delta 6$ -desaturasa de la presente invención son esenciales en la producción de ácidos grasos poliinsaturados altamente

insaturados que tienen una longitud superior a 20 y 18 carbonos, respectivamente. La secuencia de nucleótidos del gen de  $\Delta 5$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina* aislado se muestra en la Figura 4, y la secuencia de aminoácidos de la proteína purificada correspondiente se muestra en la Figura 5. La secuencia de nucleótidos del gen de  $\Delta 6$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina* aislado se muestra en la Figura 2, y la secuencia de aminoácidos de la proteína purificada correspondiente se muestra en la Figura 3.

Como ejemplo de la importancia de los genes de la presente invención, los genes de  $\Delta 5$ -desaturasa aislados convierten DGLA en AA o convierten ácido eicosatetraenoico en EPA. El AA, por ejemplo, no puede sintetizarse sin los genes de  $\Delta 5$ -desaturasa y las enzimas codificadas por los mismos. El gen de  $\Delta 6$ -desaturasa aislado en la presente invención convierte, por ejemplo, el ácido linoleico (18:2n-6) en ácido  $\gamma$ -linoleico (GLA) y el ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA) en ácido estearidónico (STA).

Debería señalarse que la presente invención también incluye secuencias de nucleótidos (y las proteínas codificadas correspondientes) que tienen secuencias que comprenden o son complementarias a al menos el 90% de los nucleótidos en la secuencia (es decir, que tienen identidad de secuencia con) la SEC ID N°: 19 (es decir, la secuencia de nucleótidos del gen de  $\Delta 5$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina*), SEC ID N°: 13 (es decir, la secuencia de nucleótidos del gen de  $\Delta 6$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina*). (Todos los números enteros entre el 90% y el 100% también se consideran dentro del alcance de la presente invención con respecto al porcentaje de identidad). Dichas secuencias pueden proceder de fuentes humanas, así como de otras fuentes no humanas (por ejemplo, *C. elegans* o ratón).

La invención también incluye un polipéptido purificado que desatura ácidos grasos poliinsaturados en la posición de carbono 5 o la posición de carbono 6, y que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 90% con las secuencias de aminoácidos (es decir, SEC ID N°: 14 (mostrada en la Figura 3) y SEC ID N°: 20 (mostrada en la Figura 5)) de las proteínas señaladas anteriormente, que están, a su vez, codificadas por las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente. Todos los números enteros entre una similitud o identidad del 90-100% también se incluyen dentro del alcance de la invención.

El término "identidad" se refiere a la relación de dos secuencias en base a nucleótido por nucleótido a lo largo de una ventana de comparación o segmento particular. Por lo tanto, la identidad se define como el grado de igualdad, correspondencia o equivalencia entre las mismas cadenas (con sentido o antisentido) de dos segmentos de ADN. El "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una región particular, determinación del número de posiciones en las que aparece la base idéntica en ambas secuencias para dar el número de posiciones emparejadas, división del número de dichas posiciones por el número total de posiciones en el segmento que se está comparando, y multiplicación del resultado por 100. El alineamiento óptimo de secuencias puede realizarse mediante el algoritmo de Smith y Waterman, Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante el método de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444 (1988) y mediante programas informáticos que aplican los algoritmos pertinentes (por ejemplo, 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 y TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI). (Véase la Patente de Estados Unidos N° 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 por medición de la capacidad de la cadena con sentido de un segmento de ADN para hibridar con la cadena antisentido del otro segmento de ADN en condiciones apropiadas, para formar una doble hélice. En la doble hélice, aparece adenina en una cadena, aparece timidina en la otra cadena. De forma similar, cuando se encuentra guanina en una cadena, se encuentra citosina en la otra. Cuanto mayor sea la relación entre las secuencias de nucleótidos de dos segmentos de ADN, mayor será la capacidad para formar dúplex híbridos entre las cadenas de los dos segmentos de ADN.

La "similitud" entre dos secuencias de aminoácidos se define como la presencia de una serie de restos de aminoácidos idénticos, así como conservados, en ambas secuencias. Cuanto mayor sea el grado de similitud entre dos secuencias de aminoácidos, mayor será la 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 de aminoácidos exactamente iguales o invariantes en ambas secuencias). Las definiciones de "complementariedad", "identidad" y "similitud" son bien conocidas por los expertos en la materia.

La expresión "codificado por" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica, en la que la secuencia polipeptídica o una porción de la misma contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 3 aminoácidos, más preferentemente al menos 8 aminoácidos, y aún más preferentemente al menos 15 aminoácidos de un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico.

La presente invención también incluye una secuencia de nucleótidos aislada que codifica actividad de desaturasa de PUFA y que es hibridable, en condiciones moderadamente rigurosas, con un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende o es complementaria a la secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID N°: 13 (mostrada en la Figura 2), SEC ID N°: 19 (mostrada en la Figura 4). Una molécula de ácido nucleico es "hibridable" con otra molécula de ácido nucleico cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede hibridar con la otra molécula de ácido nucleico en las condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica (véase Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la "rigurosidad" de la hibridación. La "hibridación" requiere que dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias. Sin embargo, dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, pueden ocurrir emparejamientos erróneos entre bases. La rigurosidad apropiada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación. Dichas variables son bien conocidas en la técnica. Más específicamente, cuanto mayor sea el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de Tm para híbridos de ácidos nucleicos que tengan esas secuencias. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han obtenido ecuaciones para calcular la Tm (véase Sambrook et al., anteriormente). 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., anteriormente).

Como se usa en la presente memoria, un "fragmento o secuencia de ácido nucleico aislado" es un polímero de ARN o ADN que es mono- 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 compuesto por uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético. (Un "fragmento" de un polinucleótido especificado se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia contigua de aproximadamente al menos aproximadamente 6 nucleótidos, preferentemente de al menos aproximadamente 8 nucleótidos, más preferentemente de al menos aproximadamente 10 nucleótidos, y aún más preferentemente de al menos aproximadamente 15 nucleótidos y, más preferentemente de al menos aproximadamente 25 nucleótidos idénticos o complementarios a una región de la secuencia de nucleótidos especificada). Los nucleótidos (habitualmente encontrados en su forma 5'-monofosfato) se mencionan por su designación de una sola letra de la forma siguiente: "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 desoxitimidilato, "R" para purinas (A o G), "Y" para pirimidinas (C o T), "K" para G o T, "H" para A o C o T, "I" para inosina y "N" para cualquier nucleótido.

Las expresiones "fragmento o subfragmento que es funcionalmente equivalente" y "fragmento o subfragmento funcionalmente equivalente" se usan indistintamente en la presente memoria. Estas expresiones se refieren 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 se conserva independientemente de que el fragmento o subfragmento codifique o no una enzima activa. Por el ejemplo, el fragmento o subfragmento puede usarse en el diseño de construcciones quiméricas para producir el fenotipo deseado en una planta transformada. Las construcciones quiméricas pueden diseñarse para su uso en cosupresión o antisentido por unión de un fragmento de ácido nucleico o subfragmento del mismo, independientemente de que codifique o no una enzima activa, en la orientación apropiada respecto a una secuencia promotora vegetal.

Los términos "homología", "homólogo", "sustancialmente similar" y "sustancialmente correspondiente" se usan indistintamente en la presente memoria. Se refieren a fragmentos de ácido nucleico en los que los cambios en una o más bases de nucleótidos no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico para mediar la expresión génica o producir cierto fenotipo. Estos términos también se refieren 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 respecto al fragmento inicial no modificado. Por lo tanto se entiende, como apreciarán los expertos en la materia, que la invención incluye más que las secuencias ejemplares específicas.

El término "gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, incluyendo secuencias reguladoras que preceden (secuencias no codificantes 5') y siguen (secuencias no codificantes 3') a la secuencia codificante.

La expresión "gen nativo" se refiere a un gen como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. Por el contrario, una "construcción quimérica" se refiere a una combinación de fragmentos de ácido nucleico que normalmente no se encuentran juntos en la naturaleza. Por consiguiente, una construcción quimérica puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que proceden de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes que proceden de la misma fuente, pero dispuestas de una forma diferente a la que se encuentra normalmente en la naturaleza. (El término "aislado" significa que la secuencia se retira de su entorno natural).

Un gen "extraño" se refiere a un gen que normalmente no se encuentra en el organismo hospedador, pero que se introduce en el organismo hospedador por transferencia génica. Los genes extraños pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo o construcciones quiméricas. Un "transgén" es un gen que se ha

introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación.

La expresión "secuencia codificante" se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos específica. La expresión "secuencias reguladoras" se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas cadena arriba (secuencias no codificantes 5'), dentro de o cadena abajo (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN o la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir, pero sin limitación, promotores, secuencias líder de traducción, intrones y secuencias de reconocimiento de poliadenilación.

El término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. La secuencia promotora consiste en elementos cadena arriba proximales y más distales, denominándose con frecuencia estos últimos elementos 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 aumentar el nivel o la especificidad tisular de un promotor. Las secuencias promotoras también pueden localizarse dentro de las porciones de genes transcritas, y/o cadena abajo de las secuencias transcritas. Los promotores pueden proceder en su totalidad de un gen nativo, o pueden estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintéticos. Los expertos en la materia entienden que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tipos celulares o tisulares o en diferentes fases del desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Los promotores que causan que un gen se exprese en la mayoría de tipos celulares la mayor parte del tiempo se denominan comúnmente "promotores constitutivos". Se están descubriendo constantemente nuevos promotores de diversos tipos útiles en células vegetales; pueden encontrarse numerosos ejemplos en la recopilación por Okamoto y Goldberg, (1989) *Biochemistry of Plants* 15: 1-82. Se reconoce además que puesto que en la mayoría de los casos no se han definido completamente los límites exactos de las secuencias reguladoras, fragmentos de ADN de cierta variación pueden tener una actividad promotora idéntica.

Un "intrón" es una secuencia intermedia en un gen que no codifica una porción de la secuencia proteica. Por lo tanto, dichas secuencias se transcriben en ARN pero después se escinden y no se traducen. El término se usa también para las secuencias de ARN escindidas. Un "exón" es una porción de la secuencia de un gen que se transcribe y se encuentra en el ARN mensajero maduro derivado del gen, pero que no es necesariamente parte de la secuencia que codifica el producto génico final.

La "secuencia líder de traducción" se refiere a una secuencia de ADN localizada entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia codificante. La secuencia líder de traducción está presente en el ARNm totalmente procesado cadena arriba de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia líder de traducción puede afectar al procesamiento del transcrito primario en ARNm, a la estabilidad del ARNm o a la eficacia de traducción. Se han descrito ejemplos de secuencias líderes de traducción (Turner, R. y Foster, G. D. (1995) *Molecular Biotechnology* 3: 225).

Las "secuencias no codificantes 3'" se refieren a secuencias de ADN localizadas cadena abajo de una secuencia codificante, e incluyen secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del ARNm o a la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza habitualmente por afectar a la adición de tratos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias no codificantes 3' se ejemplifica por Ingelbrecht et al., (1989) *Plant Cell* 1: 671-680.

La expresión "transcrito de ARN" se refiere 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, se denomina transcrito primario, o puede ser una secuencia de ARN derivada del procesamiento postranscripcional del transcrito primario y se denomina ARN maduro. La expresión "ARN mensajero (ARNm)" se refiere al ARN que está sin intrones y que puede traducirse en proteína por la célula. El "ADNc" se refiere a un ADN que es complementario a y que se sintetiza a partir de un molde de ARNm usando la enzima transcriptasa inversa. El ADNc puede ser monocatenario o convertirse en la forma bicatenaria usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. Un ARN "con sentido" se refiere al transcrito de ARN que incluye el ARNm y que puede traducirse en proteína dentro de una célula o *in vitro*. Un "ARN antisentido" se refiere a un transcrito de ARN que es complementario a todo o parte de un transcrito primario o ARNm diana, y que bloquea la expresión de un gen diana (Patente de Estados Unidos Nº 5.107.065). La complementariedad de un ARN antisentido puede ser con cualquier parte del transcrito génico específico, es decir, en la secuencia no codificante 5', secuencia no codificante 3', intrones o la secuencia codificante. Un "ARN funcional" se refiere a ARN antisentido, ARN de ribozima u otro ARN que puede no traducirse pero sin embargo tener un efecto sobre los procesos celulares. Los términos "complementario" y "complementario inverso" se usan indistintamente en la presente memoria con respecto a transcritos de ARNm, y pretenden definir el ARN antisentido del mensaje.

La expresión "ARN endógeno" se refiere a cualquier ARN que está codificado por cualquier secuencia de ácido nucleico presente en el genoma del hospedador antes de la transformación con la construcción recombinante de la presente invención, ya sea de origen natural o de origen no natural, es decir, introducido por medios recombinantes,

mutagénesis, etc.

La expresión "de origen no natural" significa artificial, que no concuerda con lo que se encuentra normalmente en la naturaleza.

- 5 La expresión "unido operativamente" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un solo fragmento de ácido nucleico de modo que la función de uno esté regulado por el otro. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificante cuando es capaz de regular la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante esté bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden unirse operativamente a secuencias reguladoras en una orientación con sentido o antisentido.
- 10 En otro ejemplo, las regiones de ARN complementarias de la invención pueden unirse operativamente, directa o indirectamente, 5' al ARNm diana o 3' al ARNm diana, o dentro del ARNm diana, o una primera región complementaria está 5' y su complementaria está 3' al ARNm diana.

15 El término "expresión", como se usa en la presente memoria, se refiere a la producción de un producto final funcional. La expresión de un gen implica la transcripción del gen y la traducción del ARNm en una proteína precursora o madura. La "inhibición antisentido" se refiere a la producción de transcritos de ARN antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína diana. La "cosupresión" se refiere a la producción de transcritos de ARN con sentido capaces de suprimir la expresión de genes endógenos o extraños idénticos o sustancialmente similares (Patente de Estados Unidos N° 5.231.020).

20 Una proteína "madura" se refiere a un polipéptido procesado postraduccionalmente; es decir, uno del que se ha eliminado cualquier pre- o propéptido presente en el producto de traducción primario. La proteína "precursora" se refiere al producto primario de traducción de ARNm; es decir, con pre- y propéptidos todavía presentes. Los pre- y propéptidos pueden ser, pero sin limitación, señales de localización intracelular.

25 La expresión "transformación estable" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico al genoma de un organismo hospedador, incluyendo genomas tanto nucleares como de orgánulos, dando como resultado una herencia genéticamente estable. Por el contrario, una "transformación transitoria" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico al interior del núcleo, u orgánulo que contiene ADN, de un organismo hospedador, dando como resultado la expresión génica sin integración o herencia estable. Los organismos hospedadores que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos "transgénicos". El método preferido de transformación celular del arroz, maíz y otras monocotiledóneas es el uso de la tecnología de transformación de partículas aceleradas o "pistola de genes" (Klein et al., (1987) Nature (London) 327: 70-73; Patente de Estados Unidos N° 4.945.050), o un método mediado por *Agrobacterium* usando un plásmido Ti apropiado que contiene el transgén (Ishida Y. et al., 1996, Nature Biotech. 14: 745-750). El término "transformación", como se usa en la presente memoria, se refiere tanto a una transformación estable como a una transformación transitoria.

40 Se conocen bien en la materia técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular convencionales, y se describen más completamente en Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989 (en lo sucesivo "Sambrook").

45 El término "recombinante" se refiere a una combinación artificial de dos segmentos de secuencia de otro modo separados, por ejemplo, por síntesis química o por la manipulación de segmentos de ácidos nucleicos aislados por técnicas de ingeniería genética.

50 El término "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 bicatenario se desnaturaliza térmicamente, los dos cebadores complementarios a los límites 3' de la secuencia diana se hibridan a baja temperatura y después se extienden a una temperatura intermedia. Un conjunto de estas tres etapas consecutivas se denomina ciclo.

55 La reacción en cadena a la polimerasa ("PCR") es una técnica potente usada para amplificar el ADN millones de veces por replicación repetida de un molde en un corto periodo 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 Estados Unidos N° 4.683.202; Erlich, Patente de Estados Unidos N° 4.582.788; y Saiki et al, Patente de Estados Unidos N° 4.683.194). El proceso utiliza conjuntos de oligonucleótidos específicos sintetizados *in vitro* para cebar la síntesis de ADN. El diseño de los cebadores depende de las secuencias de ADN que se desee analizar. La técnica se lleva a cabo mediante muchos ciclos (habitualmente 20-50) de fusión del molde a alta temperatura, permitiendo que los cebadores hibriden con secuencias complementarias dentro del molde y después replicando el molde con ADN polimerasa.

65 Los productos de reacciones de PCR se analizan por separación en geles de agarosa, seguida de tinción con bromuro de etidio y visualización con transiluminación con UV. Como alternativa, pueden añadirse dNTP radiactivos a la PCR para incorporar un marcador en los productos. En este caso, los productos de PCR se visualizan por

exposición del gel a una película de rayos x. La ventaja añadida del radiomarcado de productos de PCR es que pueden cuantificarse los niveles de productos de amplificación individuales.

Las expresiones "construcción recombinante", "construcción de expresión" y "construcción de expresión recombinante" se usan indistintamente en la presente memoria. Estas expresiones se refieren a una unidad funcional de material genético que puede insertarse en el genoma de una célula usando metodología convencional bien conocida por un experto en la materia. Dicha construcción puede usarse de por sí o puede usarse junto con un vector. Si se usa un vector entonces la elección del vector depende del método que se usará para transformar plantas hospedadoras, como es bien sabido por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede usarse un vector plasmídico. El experto en la materia es bien consciente de los elementos genéticos que deben estar presentes en el vector para transformar, seleccionar y propagar con éxito células hospedadoras que comprendan cualquiera de los fragmentos de ácido nucleico aislados de la invención. El experto en la materia también reconocerá que se diferentes acontecimientos 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 deben explorarse múltiples acontecimientos para obtener líneas que presenten el nivel y patrón de expresión deseados. Dicha exploración puede efectuarse por análisis de Southern de ADN, análisis de Northern de la expresión de ARNm, análisis de Western de la expresión de proteína o análisis fenotípico.

#### Producción de las enzimas $\Delta 5$ -desaturasa y las enzimas $\Delta 6$ -desaturasa

Una vez que se ha aislado el gen que codifica una cualquiera de las enzimas desaturasas, puede introducirse después en una célula hospedadora procariota o eucariota mediante el uso de un vector o construcción. El vector, por ejemplo, un bacteriófago, cósmido o plásmido puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica las enzimas  $\Delta 5$ -desaturasa o la enzima  $\Delta 6$ -desaturasa, así como cualquier secuencia reguladora (por ejemplo, promotor) que sea funcional en la célula hospedadora y sea capaz de generar la expresión de la desaturasa codificada por la secuencia de nucleótidos. La secuencia reguladora está en asociación operativa con o unida operativamente con la secuencia de nucleótidos. (Como se ha señalado anteriormente, se dice que la reguladora está "unida operativamente" con una secuencia codificante si la secuencia reguladora afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante). Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos de genes que codifican alcohol deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, 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, GAL1 y GAL10. Además, las secuencias de nucleótidos que codifican otras proteínas, oligosacáridos, lípidos, etc. pueden incluirse también dentro del vector, así como otras secuencias reguladoras tales como una señal de poliadenilación (por ejemplo, la señal poli-A del antígeno SV-40T, ovoalbúmina u hormona del crecimiento bovina). La elección de secuencias presentes en la construcción depende de los productos de expresión deseados, así como de la naturaleza de la célula hospedadora.

Como se ha señalado anteriormente, una vez que se ha construido el vector, puede introducirse después en la célula hospedadora de elección por métodos conocidos por los expertos en la materia incluyendo, por ejemplo, transfección, transformación y electroporación (véase Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Después la célula hospedadora se cultiva en condiciones adecuadas que permitan la expresión de los genes, conduciendo a la producción del PUFA deseado, que después se recupera y purifica.

Los ejemplos de células hospedadoras procariotas adecuadas, por ejemplo, bacterias tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, así como cianobacterias tales como *Spirulina spp.* (es decir, algas verdeazuladas). Los ejemplos de células hospedadoras eucariotas adecuadas incluyen, por ejemplo, células de mamífero, células vegetales, células de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Lipomyces starkey*, *Candida spp.* tales 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*. Preferentemente, se utilizan células de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería).

La expresión en una célula hospedadora puede lograrse de una forma transitoria o estable. La expresión transitoria puede producirse a partir de construcciones introducidas que contienen señales de expresión funcionales en la célula hospedadora, pero construcciones que no se replican y que rara vez se integran en la célula hospedadora, o cuando la célula hospedadora no está en proliferación. La expresión transitoria también puede lograrse por inducción de la actividad de un promotor regulable unido operativamente al gen de interés, aunque dichos sistemas inducibles presentan frecuentemente un bajo nivel basal de expresión. La expresión estable puede conseguirse por introducción de una construcción que pueda integrarse en el genoma del hospedador o que se replique de forma autónoma en la célula hospedadora. La expresión estable del gen de interés puede seleccionarse mediante el uso de un marcador de selección localizado en o transfectedo con la construcción de expresión, seguido de selección de células que expresen el marcador. Cuando la expresión estable es el resultado de la integración, el sitio de la integración de la construcción puede aparecer aleatoriamente dentro del genoma del hospedador o puede fijarse como objetivo mediante el uso de construcciones que contienen regiones de homología con el genoma del hospedador suficientes para dirigir la recombinación con el locus del hospedador. Cuando las construcciones se

dirigen a un locus endógeno, todas o algunas de las regiones reguladoras de la transcripción y de la traducción pueden proporcionarse por el locus endógeno.

5 También puede usarse un mamífero no humano transgénico para expresar la enzima o enzimas de interés (es decir, una o más de las  $\Delta 5$ -desaturasas, una o más de las  $\Delta 6$ -desaturasas o una combinación de las mismas) y, en última instancia, el o los PUFA de interés. Más específicamente, una vez que se crea la construcción descrita anteriormente, puede insertarse en el pronúcleo de un embrión. Después, el embrión puede implantarse en una hembra receptora. Como alternativa, también podría utilizarse un método de transferencia nuclear (Schnieke *et al.*, Science 278: 2130-2133 (1997)). Entonces se permite la gestación y el nacimiento (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.750.176 y la Patente de Estados Unidos Nº 5.700.671). Muestras de leche, tejido u otros fluidos de la descendencia deberían contener entonces niveles alterados de PUFA en comparación con los niveles que se encuentran normalmente en el animal no transgénico. Las generaciones posteriores pueden controlarse para determinar la producción de los niveles alterados o aumentados de PUFA y, por lo tanto, la incorporación del gen que codifica la enzima desaturasa deseada en sus genomas. El mamífero no humano utilizado como hospedador puede seleccionarse del grupo que consiste en, por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un cerdo, una cabra, una oveja, un caballo y una vaca. Sin embargo, puede usarse cualquier mamífero no humano con tal de que tenga la capacidad de incorporar ADN que codifique la enzima de interés en su genoma.

20 Para la expresión de un polipéptido de desaturasa, las regiones funcionales de inicio y terminación de la transcripción y traducción están unidas operativamente al ADN que codifica el polipéptido desaturasa. Las regiones de inicio y terminación de la transcripción y traducción proceden de una diversidad de fuentes no exclusivas, incluyendo el ADN a expresar, genes conocidos o sospechosos de ser capaces de la expresión en el sistema deseado, vectores de expresión, síntesis química o a partir de un locus endógeno en una célula hospedadora. La expresión en un tejido vegetal y/o parte de planta presenta ciertas eficacias, particularmente cuando el tejido o parte es uno que se recoge de forma temprana, tal como semillas, hojas, frutos, flores, raíces, etc. La expresión puede dirigirse a esa localización en la planta utilizando una secuencia reguladora específica tal como las de las Patentes de Estados Unidos Nº 5.463.174, 4.943.674, 5.106.739, 5.175.095, 5.420.034, 5.188.958 y 5.589.379. Como alternativa, la proteína expresada puede ser una enzima que produzca un producto que pueda incorporarse, directamente o tras modificaciones adicionales, en una fracción fluida de la planta hospedadora. La expresión de un gen de desaturasa, o de transcritos de desaturasa antisentido, puede alterar los niveles de PUFA específicos, o derivados de los mismos, que se encuentran en partes de plantas y/o tejidos vegetales. La región codificante de polipéptido desaturasa puede expresarse de por sí o con otros genes, para producir tejidos y/o partes de plantas que contengan mayores proporciones de los PUFA deseados, o en los que la composición de PUFA se parezca más a la de la leche materna humana (Prieto *et al.*, publicación PCT WO 95/24494). La región de terminación puede proceder de la región 3' del gen del que se obtuvo la región de inicio, o de un gen diferente. Se conocen un gran número de regiones de terminación y se ha descubierto que son satisfactorias en una diversidad de hospedadores de géneros y especies iguales y diferentes. La región de terminación se selecciona habitualmente como una cuestión de conveniencia más que por cualquier propiedad particular.

40 Como se ha señalado anteriormente, una planta (por ejemplo, *Glycine max* (soja) o *Brassica napus* (colza)) o tejido vegetal también pueden utilizarse como un hospedador o célula hospedadora, respectivamente, para la expresión de la enzima desaturasa que puede, a su vez, utilizarse en la producción de ácidos grasos poliinsaturados. Más específicamente, los PUFA deseados pueden expresarse en semillas. Se conocen en la técnica métodos de aislamiento de aceites de semillas. Por lo tanto, además de proporcionar una fuente para PUFA, los componentes de aceites de semillas pueden manipularse mediante la expresión del gen de desaturasa, así como de quizá otros genes de desaturasa y genes de elongasa, para proporcionar aceites de semillas que puedan añadirse a composiciones nutricionales, composiciones farmacéuticas, piensos animales y cosméticos. De nuevo, un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica la desaturasa unida operativamente a un promotor se introducirá en el tejido vegetal o planta durante un tiempo y en condiciones suficientes para la expresión del gen de desaturasa. El vector también puede comprender uno o más genes que codifican otras enzimas, por ejemplo,  $\Delta 4$ -desaturasa, elongasa,  $\Delta 12$ -desaturasa,  $\Delta 15$ -desaturasa,  $\Delta 17$ -desaturasa y/o  $\Delta 19$ -desaturasa. El tejido vegetal o planta puede producir el sustrato pertinente (por ejemplo, DGLA (en el caso de  $\Delta 5$ -desaturasa), ALA (en el caso de  $\Delta 6$ -desaturasa), etc.) tras lo cual las enzimas actúan, o un vector que codifica enzimas que producen dichos sustratos puede introducirse en el tejido vegetal, célula vegetal o planta. Además, el sustrato puede pulverizarse sobre tejidos vegetales que expresen las enzimas apropiadas. Usando estas diversas técnicas, se pueden producir PUFA (por ejemplo, ácidos grasos insaturados n-6 tales como AA, o ácidos grasos n-3 tales como EPA o STA) mediante el uso de una célula vegetal, tejido vegetal o planta. También debería señalarse que la invención también incluye una planta transgénica que comprende el vector descrito anteriormente, en el que la expresión de la secuencia de nucleótidos del vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado, por ejemplo, las semillas de la planta transgénica.

65 La regeneración, desarrollo y cultivo de plantas a partir de transformantes de protoplastos de plantas individuales 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 proceso de regeneración y cultivo incluye típicamente las etapas de selección de células transformadas, cultivo de aquellas células

individualizadas a través de las fases habituales del desarrollo embrionario a la fase de plántula enraizada. Los embriones y semillas transgénicas se regeneran de forma similar. Los vástagos enraizados transgénicos resultantes se plantan después de eso en un medio de cultivo de plantas apropiado tal como tierra.

- 5 El desarrollo o la regeneración de plantas que contienen el gen exógeno extraño que codifica una proteína de interés son bien conocidos en la técnica. Preferentemente, las plantas regeneradas se autopolinizan para proporcionar plantas transgénicas homocigotas. De otro modo, el polen obtenido de las plantas regeneradas se cruza con plantas cultivadas a partir de semillas de líneas agrícola-mente importantes. Por el contrario, el polen de plantas de estas líneas importantes se usa para polinizar las plantas regeneradas. Una planta transgénica de la presente invención  
10 que contiene un polipéptido deseado se cultiva usando métodos bien conocidos por un experto en la materia.

Existen una diversidad de métodos para la regeneración de plantas a partir de tejido vegetal. El método de regeneración particular dependerá del tejido vegetal de partida y de la especie vegetal particular a regenerar.

- 15 Se han publicado métodos para transformar dicotiledóneas, principalmente por uso de *Agrobacterium tumefaciens*, y obtener plantas transgénicas para algodón (Patente de Estados Unidos N° 5.004.863, Patente de Estados Unidos N° 5.159.135, Patente de Estados Unidos N° 5.518.908); soja (Patente de Estados Unidos N° 5.569.834, Patente de Estados Unidos N° 5.416.011, McCabe *et al.*, *BiolTechnology* 6: 923 (1988), Christou *et al.*, *Plant Physiol.* 87: 671-674 (1988)); *Brassica* (Patente de Estados Unidos N° 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 descrito la transformación de monocotiledóneas usando electroporación, bombardeo de partículas y *Agrobacterium*. La transformación y regeneración de plantas se ha conseguido en espárrago (Bytebier *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84: 5354, (1987)); cebada (Wan y 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.*, *BiolTechnology* 8: 833 (1990), Koziel *et al.*, *BiolTechnology* 11: 194, (1993), Armstrong *et al.*, *Crop Science* 35: 550-557 (1995)); avena (Somers *et al.*, *BiolTechnology* 10: 15 89 (1992)); pasto ovillo (Horn *et al.*, *Plant Cell Rep.* 7: 469 (1988)); arroz (Toriyama *et al.*, *TheorAppl. 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 y Wu, *Theor. Appl. Genet.* 76: 835 (1988); Zhang *et al.* *Plant Cell Rep.* 7: 379, (1988); Batraw y Hall, *Plant Sci.* 86: 191-202 (1992); Christou *et al.*, *Bio/Technology* 9: 957 (1991)); centeno (De la Pena *et al.*, *Nature* 325: 274 (1987)); caña de azúcar (Bower y Birch, *Plant J.* 2: 409 (1992)); festuca alta (Wang *et al.*, *BiolTechnology* 10: 691 (1992)) y trigo (Vasil *et al.*, *Bio/Technology* 10: 667 (1992); Patente de Estados Unidos N° 5.631.152).

- 35 Se han desarrollado ensayos para expresión génica basándose en la expresión transitoria de construcciones de ácido nucleico clonadas por introducción de las 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)).

- Pueden usarse sistemas de expresión transitoria para diseccionar funcionalmente construcciones génicas (véase en general 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 introducirse en una célula vegetal de una forma permanente o transitoria en combinación con otros elementos genéticos tales como vectores, promotores, potenciadores, etc.

- Además de los procedimientos analizados anteriormente, los expertos en la materia están familiarizados con los materiales de recurso convencionales que describen condiciones y procedimientos específicos para la construcción, manipulación y aislamiento de macromoléculas (por ejemplo, moléculas de ADN, plásmidos, etc.), la generación de organismos recombinantes y la exploración 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, Nueva York (1998); Birren *et al.*, *Genome Analysis: Analyzing DNA*, 2, Cold Spring Harbor, Nueva York (1998); *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, eds. Clark, Springer, Nueva York (1997)).

- Los sustratos que pueden producirse por la célula hospedadora de forma natural o transgénica, así como las enzimas que pueden estar codificadas por secuencias de ADN presentes en el vector que se introduce posteriormente en la célula hospedadora, se muestran en la Figura 1.

- 60 En vista de lo anterior, la presente invención incluye un método de producción de las enzimas desaturasas (es decir,  $\Delta 5$  o  $\Delta 6$ ), que comprende las etapas de: 1) aislar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima desaturasa; 2) construir un vector que comprende dicha secuencia de nucleótidos unida operativamente a una secuencia reguladora y 3) introducir dicho vector en una célula hospedadora en tiempo y condiciones suficientes para la producción de la enzima desaturasa.  
65

- Con respecto a las desaturasas, pueden producirse ácidos grasos poliinsaturados por exposición de un ácido a la enzima de modo que la desaturasa convierta el ácido en un ácido graso poliinsaturado. Por ejemplo, cuando se expone 20:3n-6 a una enzima  $\Delta 5$ -desaturasa se convierte en AA. Después el AA puede exponerse a elongasa, que alarga el AA a ácido adrenico (es decir, 22:4n-6). Como alternativa, la  $\Delta 5$ -desaturasa puede utilizarse para convertir el 20:4n-3 en 20:5n-3, que puede exponerse a elongasa y convertirse en ácido (n-3)-docosapentaenoico. El ácido (n-3)-docosapentaenoico puede convertirse entonces en DHA mediante el uso de la  $\Delta 4$ -desaturasa. Por lo tanto, la  $\Delta 5$ -desaturasa puede usarse en la producción de ácidos grasos poliinsaturados que pueden usarse, a su vez, para fines beneficiosos particulares.
- 10 Con respecto al papel de la  $\Delta 6$ -desaturasa, el ácido linoleico puede exponerse a la enzima de modo que la enzima convierta el ácido en GLA. Después puede usarse una elongasa para convertir el GLA en DGLA. El DGLA puede convertirse entonces en AA por exposición del DGLA a una  $\Delta 5$ -desaturasa. Como otro ejemplo, el ALA puede exponerse a una  $\Delta 6$ -desaturasa para convertir el ALA en STA. El STA puede convertirse entonces en 20:4n-3 mediante el uso de una elongasa. Por consiguiente, el 20:4n-3 puede convertirse en EPA por exposición del 20:4n-3 a una  $\Delta 5$ -desaturasa. Por lo tanto, la  $\Delta 6$ -desaturasa puede usarse en la producción de PUFA que puedan tener propiedades ventajosas o puedan usarse en la producción de otros PUFA.

#### Usos de los genes de $\Delta 5$ -desaturasas, los genes de $\Delta 6$ -desaturasa y las enzimas codificadas por los mismos

- 20 Como se ha señalado anteriormente, los genes de desaturasa aislados y las enzimas desaturasa codificadas por los mismos tienen muchos usos. Por ejemplo, el gen y la enzima correspondiente pueden usarse indirecta o directamente en la producción de ácidos grasos poliinsaturados, por ejemplo, la  $\Delta 5$ -desaturasa puede usarse en la producción de AA, ácido adrenico o EPA. La delta-6 desaturasa puede usarse indirecta o directamente en la producción de GLA, DGLA, STA o 20:4n-3. (El término "directamente" se entiende que incluye la situación en la que la enzima convierte directamente el ácido en otro ácido, el último de los cuales se utiliza en una composición (por ejemplo, la conversión de DGLA en AA). El término "indirectamente" se entiende que incluye la situación en la que un ácido se convierte en otro ácido (es decir, un intermedio de ruta) por la desaturasa (por ejemplo, DGLA en AA) y después el último ácido se convierte en otro ácido mediante el uso de una enzima no desaturasa (por ejemplo, AA en ácido adrenico por elongasa o mediante el uso de otra enzima desaturasa (por ejemplo, AA en EPA por  $\Delta 17$ -desaturasa)). Estos ácidos grasos poliinsaturados (es decir, los producidos directa o indirectamente por actividad de la enzima desaturasa) pueden añadirse, por ejemplo, a composiciones nutricionales, composiciones farmacéuticas, cosméticos y piensos animales, incluyéndose todos en la presente invención. Las composiciones nutricionales, composiciones farmacéuticas y aplicaciones veterinarias descritas en los párrafos siguientes no forman parte de la invención reivindicada.

#### Composiciones nutricionales

- La presente invención incluye composiciones nutricionales. Dichas composiciones, para los fines de la presente invención, incluyen cualquier alimento o preparación para consumo humano, incluyendo para consumo enteral o parenteral, que cuando se introduce en el cuerpo (a) sirve para nutrir o construir tejidos o suministrar energía y/o (b) mantener, restaurar o servir de soporte a un estado nutricional o función metabólica adecuados.

- La composición nutricional de la presente invención comprende al menos un aceite o ácido producido directa o indirectamente mediante el uso del gen de desaturasa, de acuerdo con la presente invención, y puede estar en forma sólida o líquida. Además, la composición puede incluir macronutrientes, vitaminas y minerales comestibles en las cantidades deseadas para un uso particular. La cantidad de dichos ingredientes variará dependiendo de si la composición está destinada a usarse con lactantes, niños o adultos sanos normales que tengan necesidades especializadas, tales como las que acompañan a ciertas afecciones metabólicas (por ejemplo, trastornos metabólicos).

- Los ejemplos de macronutrientes que pueden añadirse a la composición incluyen, pero sin limitación, grasas, carbohidratos y proteínas comestibles. Los ejemplos de dichas grasas comestibles incluyen, pero sin limitación, aceite de coco, aceite de soja y mono- y diglicéridos. Los ejemplos de dichos carbohidratos incluyen, pero sin limitación, glucosa, lactosa comestible y almidón hidrolizado. Además, los ejemplos de proteínas que pueden utilizarse en la composición nutricional de la invención incluyen, pero sin limitación, proteínas de soja, suero electrodiálizado, leche desnatada electrodiálizada, suero de leche o los hidrolizados de estas proteínas.

- Con respecto a vitaminas y minerales, lo siguiente puede añadirse a las composiciones nutricionales de la presente invención: calcio, fósforo, potasio, sodio, cloro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, selenio, yodo y vitaminas A, E, D, C y el complejo B. También pueden añadirse otras vitaminas y minerales de este tipo.

- Los componentes utilizados en las composiciones nutricionales de la presente invención serán de origen purificado o semipurificado. Por purificado o semipurificado se entiende un material que se ha preparado por purificación de un material natural o por síntesis.

65

Los ejemplos de composiciones nutricionales de la presente invención incluyen, pero sin limitación, leches maternizadas, complementos dietéticos, sustitutos dietéticos y composiciones de rehidratación. Las composiciones nutricionales de interés particular incluyen, pero sin limitación, las utilizadas para complementación enteral y parenteral para lactantes, leches maternizadas especializadas, complementos para las personas mayores y complementos para aquellos con dificultades gastrointestinales y/o mala absorción.

La composición nutricional de la presente invención también puede añadirse a alimentos incluso cuando no sea necesaria una complementación de la dieta. Por ejemplo, la composición puede añadirse a alimentos de cualquier tipo incluyendo, pero sin limitación, margarinas, mantequillas modificadas, quesos, leche, yogur, chocolate, dulces, aperitivos, aceites para ensalada, aceites de cocina, grasas de cocina, carnes, pescados y bebidas.

En una realización preferida de la presente invención, la composición nutricional es un producto nutricional enteral, más preferentemente, un producto nutricional enteral adulto o pediátrico. Esta composición puede administrarse a adultos o niños que sufran estrés o tengan necesidades especializadas debido a patologías crónicas o agudas. La composición puede comprender, además de ácidos grasos poliinsaturados producidos de acuerdo con la presente invención, macronutrientes, vitaminas y minerales, como se han descrito anteriormente. Los macronutrientes pueden estar presentes en cantidades equivalentes a las presentes en leche humana o en una base energética, es decir, en una base por calorías.

Se conocen bien en la técnica métodos para formular fórmulas nutricionales enterales y parenterales líquidas o sólidas. (Véanse también los Ejemplos a continuación).

La fórmula enteral, por ejemplo, puede esterilizarse y posteriormente utilizarse en una base lista para tomar (RTF) o almacenarse en un líquido o polvo concentrado. El polvo puede prepararse mediante secado por pulverización de la fórmula preparada como se ha indicado anteriormente, y reconstitución de la misma por rehidratación del concentrado. Se conocen bien en la técnica fórmulas nutricionales pediátricas y para adultos, y están disponibles en el mercado (por ejemplo, Similac<sup>®</sup>, Ensure<sup>®</sup>, Jevity<sup>®</sup> y Alimentum<sup>®</sup> de Ross Products Division, Abbott Laboratories, Columbus, Ohio). Un aceite o ácido producido de acuerdo con la presente invención puede añadirse a cualquiera de estas fórmulas.

La densidad energética de las composiciones nutricionales de la presente invención, cuando están en forma líquida, puede variar de aproximadamente 0,6 Kcal a aproximadamente 3 Kcal por ml. Cuando están en forma sólida o en polvo, los complementos nutricionales pueden contener de aproximadamente 1,2 a más de 9 Kcal por gramo, preferentemente de aproximadamente 3 a 7 Kcal por g. En general, la osmolaridad de un producto líquido debería ser inferior a 700 mOsm y, más preferentemente, inferior a 660 mOsm.

La fórmula nutricional puede incluir macronutrientes, vitaminas y minerales, como se han señalado anteriormente, además de los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención. La presencia de estos componentes adicionales ayuda al individuo a ingerir las necesidades mínimas diarias de estos elementos. Además del suministro de PUFA, también puede ser deseable añadir cinc, cobre, ácido fólico y antioxidantes a la composición. Se cree que esta sustancia refuerza un sistema inmune estresado y, por lo tanto, proporcionará beneficios adicionales al individuo que reciba la composición. Una composición farmacéutica también puede complementarse con estos elementos.

En una realización más preferida, la composición nutricional comprende, además de antioxidantes y al menos un PUFA, una fuente de carbohidratos en la que al menos el 5 por ciento en peso del carbohidrato es oligosacárido indigerible.

En una realización más preferida, la composición nutricional comprende además proteína, taurina y carnitina.

Como se ha señalado anteriormente, los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención, o derivados de los mismos, pueden añadirse a un sustituto o complemento dietético, particularmente una leche maternizada, para pacientes que estén recibiendo alimentación intravenosa, o para prevenir o tratar una malnutrición u otras afecciones o patologías. Como antecedente, debería señalarse que la leche materna humana tiene un perfil de ácidos grasos que comprende de aproximadamente el 0,15% a aproximadamente el 0,36% como DHA, de aproximadamente el 0,03% a aproximadamente el 0,13% como EPA, de aproximadamente el 0,30% a aproximadamente el 0,88% como AA, de aproximadamente el 0,22% a aproximadamente el 0,67% como DGLA y de aproximadamente el 0,27% a aproximadamente el 1,04% como GLA. Por lo tanto, pueden usarse ácidos grasos, tales como AA, EPA y/o ácido docosahexaenoico (DHA), producidos de acuerdo con la presente invención para alterar, por ejemplo, la composición de leches maternizadas para reproducir mejor el contenido de PUFA de la leche materna humana o para alterar la presencia de los PUFA que se encuentran normalmente en una leche de mamífero no humana. En particular, una composición para su uso en un complemento farmacológico o alimenticio, particularmente un sustituto o complemento de leche materna, comprenderá preferentemente uno o más de AA, DGLA y GLA. Más preferentemente, el aceite comprenderá de aproximadamente el 0,3 al 30% de AA, de aproximadamente el 0,2 al 30% de DGLA y/o de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 30% de GLA.

Se incluyen en la presente invención composiciones nutricionales parenterales que comprenden de aproximadamente el 2 a aproximadamente el 30 por ciento en peso de ácidos grasos calculado como triglicéridos. La composición preferida tiene de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 25 por ciento en peso de la composición de PUFA total como GLA (Patente de Estados Unidos N° 5.196.198). Pueden incluirse opcionalmente  
 5 otras vitaminas, particularmente vitaminas liposolubles tales como vitamina A, D, E y L-carnitina. Cuando se desee, puede añadirse un conservante tal como alfa-tocoferol en una cantidad de aproximadamente el 0,1% en peso.

Además, las proporciones de AA, DGLA y GLA pueden adaptarse para un uso final dado particular. Cuando se formulan como un complemento o sustituto de la leche materna, se proporcionará una composición que comprenda  
 10 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 los animales puede variar en proporciones de AA:DGLA:GLA que varían de 1:19:30 a 6:1:0,2, lo que incluye proporciones intermedias que son preferentemente de aproximadamente 1:1:1, 1:2:1, 1:1:4. Cuando se producen juntos en una célula hospedadora, puede usarse el ajuste del índice y del porcentaje de conversión de un sustrato precursor tal como GLA y DGLA en AA para controlar con precisión las  
 15 proporciones de PUFA. Por ejemplo, puede usarse un índice de conversión de DGLA en AA del 5% al 10% para producir una proporción de AA respecto a DGLA de aproximadamente 1:19, mientras que puede usarse un índice de conversión de aproximadamente el 75% al 80% para producir una proporción de AA respecto a DGLA de aproximadamente 6:1. Por lo tanto, ya sea en un sistema de cultivo celular o en un animal hospedador, la regulación del momento, del grado y de la especificidad de la expresión de desaturasa, así como de la expresión de otras  
 20 desaturasas y elongasas, puede usarse para modular los niveles y proporciones de PUFA. Los PUFA/ácidos producidos de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, AA y EPA) pueden combinarse entonces con otros PUFA/ácidos (por ejemplo, GLA) en las concentraciones y proporciones deseadas.

Además, los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención o células hospedadoras que los contienen  
 25 también pueden usarse como complementos alimenticios animales para alterar la composición de ácidos grasos del tejido o de la leche de un animal hacia una más deseable para consumo humano o animal.

#### Composiciones farmacéuticas

La presente invención también incluye una composición farmacéutica que comprende uno o más de los ácidos y/o  
 30 aceites resultantes producidos usando los genes de desaturasa descritos en la presente memoria, de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Más específicamente, dicha composición farmacéutica puede comprender uno o más de los ácidos y/o aceites, así como un vehículo, adyuvante o excipiente convencional bien conocido no tóxico farmacéuticamente aceptable tal como, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato,  
 35 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 un comprimido, cápsula, líquido ingerible o polvo, inyectable o pomada o crema tópica. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, por mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares,  
 40 cloruro sódico y similares. Aparte de dichos diluyentes inertes, la composición también puede incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, agentes saporíferos y agentes perfumantes.

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

Las formas de dosificación sólida tales como comprimidos y cápsulas pueden prepararse usando técnicas bien  
 50 conocidas en la materia. Por ejemplo, los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención pueden prepararse en comprimidos con bases para comprimidos convencionales tales como lactosa, sacarosa y almidón de maíz en combinación con aglutinantes tales como goma arábiga, almidón de maíz o gelatina, agentes disgregantes tales como almidón de patata o ácido algínico y un lubricante tal como ácido esteárico o estearato de magnesio. Las cápsulas pueden prepararse por incorporación de estos excipientes en una cápsula de gelatina junto con antioxidantes y los PUFA pertinentes. Los componentes antioxidantes y PUFA deberían ajustarse a las directrices  
 55 presentadas anteriormente.

Para la administración intravenosa, los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención o derivados de los  
 60 mismos pueden incorporarse en formulaciones comerciales tales como Intralipids™. El perfil de ácidos grasos en plasma de adultos normales típico comprende del 6,64 al 9,46% de AA, del 1,45 al 3,11% de DGLA y del 0,02 al 0,08% de GLA. Estos PUFA o sus precursores metabólicos pueden administrarse en solitario o en combinación con otros PUFA para conseguir un perfil de ácidos grasos normal en un paciente. Cuando se desee, los componentes individuales de las formulaciones pueden proporcionarse individualmente, en forma de kit, para uso individual o múltiple. Una dosificación típica de un ácido graso particular es de 0,1 mg a 20 mg (hasta 100 g) diarios, y es preferentemente de 10 mg a 1, 2, 5 ó 10 g diarios.

Las vías de administración posibles de las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, por  
 65

ejemplo, la enteral (por ejemplo, oral y rectal) y la parenteral. Por ejemplo, una preparación líquida puede administrarse, por ejemplo, por vía oral o rectal. Además, una mezcla homogénea puede dispersarse completamente en agua, mezclarse en condiciones estériles con diluyentes, conservantes, tampones o propulsores fisiológicamente aceptables para formar una pulverización o inhalador. La vía de administración dependerá, por supuesto, del efecto deseado. Por ejemplo, si la composición se está utilizando para tratar piel áspera, seca o envejecida, para tratar piel lesionada o quemada, o para tratar piel o pelo afectado por una enfermedad o afección, quizá puede aplicarse tópicamente.

La dosificación de la composición a administrar al paciente puede determinarse por un experto en la materia y depende de diversos factores tales como el peso del paciente, la edad del paciente, el estado inmune del paciente, etc.

Con respecto a la forma, la composición puede ser, por ejemplo, una solución, una dispersión, una suspensión, una emulsión o un polvo estéril que después se reconstituye.

La presente invención también incluye el tratamiento de diversos trastornos mediante el uso de las composiciones farmacéuticas y/o nutricionales descritas en la presente memoria. En particular, las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar la reestenosis después de la angioplastia. Además, también pueden tratarse síntomas de inflamación, artritis reumatoide, asma y psoriasis con las composiciones de la invención. Las pruebas también indican que los PUFA pueden estar implicados en el metabolismo del calcio; por lo tanto, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse quizá en el tratamiento o la prevención de la osteoporosis y de cálculos renales o del tracto urinario.

Además, las composiciones de la presente invención también pueden usarse en el tratamiento del cáncer. Se ha demostrado que las células malignas tienen composiciones de ácidos grasos alteradas. Se ha demostrado que la adición de ácidos grasos ralentiza su crecimiento, causa muerte celular y aumenta su susceptibilidad a agentes quimioterápicos. Además, las composiciones de la presente invención también pueden ser útiles para tratar la caquexia asociada con el cáncer.

Las composiciones de la presente invención también pueden usarse para tratar la diabetes (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.826.877 y Horrobin et al., Am. J. Clin. Nutr. Vol. 57 (Supl.) 732S-737S). Se ha demostrado un metabolismo y una composición de ácidos grasos alterados en animales diabéticos.

Además, las composiciones de la presente invención, que comprenden PUFA producidos directa o indirectamente mediante el uso de las enzimas desaturasas, también pueden usarse en el tratamiento del eccema, en la reducción de la presión arterial y en la mejora de las puntuaciones de exámenes de matemáticas. Además, las composiciones de la presente invención pueden usarse en la inhibición de la agregación plaquetaria, la inducción de vasodilatación, la reducción de los niveles de colesterol, la inhibición de la proliferación de tejido fibroso y muscular liso de las paredes de los vasos (Brenner et al., Adv. Exp. Med. Biol. Vol. 83, págs. 85-101, 1976), la reducción o prevención del sangrado gastrointestinal y otros efectos secundarios de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.666.701), la prevención o el tratamiento de la endometriosis y del síndrome premenstrual (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.758.592) y el tratamiento de la encefalomiелitis miálgica y de la fatiga crónica después de infecciones víricas (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.116.871).

Los usos adicionales de las composiciones de la presente invención incluyen el uso en el tratamiento del SIDA, la esclerosis múltiple y trastornos cutáneos inflamatorios, así como para el mantenimiento de la salud general.

Además, la composición de la presente invención puede utilizarse con fines cosméticos. Puede añadirse a composiciones cosméticas preexistentes de modo que se forme una mezcla o puede usarse como una composición única.

#### Aplicaciones veterinarias

Debería señalarse que las composiciones farmacéuticas y nutricionales descritas anteriormente pueden utilizarse en relación con animales (es decir, domésticos o no domésticos), ya que los animales experimentan muchas de las mismas necesidades y afecciones que los seres humanos. Por ejemplo, el aceite o ácidos de la presente invención pueden utilizarse en complementos de piensos animales o de acuicultura, sustitutos de piensos animales, vitaminas animales o en pomadas tópicas para animales.

La presente invención puede ilustrarse mediante el uso de los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplo 1

Diseño de oligonucleótidos degenerados para el aislamiento de desaturasas a partir de hongos y construcción de genoteca de ADNc

5 El análisis de la composición de ácidos grasos de *Saprolegnia diclina* (*S. diclina*) (ATCC 56851) puso de manifiesto la presencia de una cantidad considerable de ácido araquidónico (ARA, 20:4 n-6) y ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3). Por lo tanto, se pensaba que este organismo contenía una  $\Delta$ 6-desaturasa activa capaz de convertir el ácido linoleico (LA, 18:2 n-6) en ácido gamma-linolénico (GLA, 18:3 n-6) y una  $\Delta$ 5-desaturasa activa que convertiría el ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA, 20:3 n-6) en ácido araquidónico (ARA, 20:4 n-6) (Figura 1). Además, se pensaba que *S. diclina* también contenía una  $\Delta$ 17-desaturasa capaz de desaturar el ARA en EPA.

10 El objetivo era por lo tanto intentar aislar estos genes de desaturasa esperados de *S. diclina* y, finalmente, verificar la funcionalidad por expresión en un hospedador alternativo.

15 Para aislar genes que codifican enzimas desaturasas funcionales, se construyó una genoteca de ADNc para *S. diclina*. Los cultivos de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851) se cultivaron en medio de patata dextrosa Difco nº 336 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) a temperatura ambiente durante 4 días con agitación constante. Los micelios se recogieron por filtración a través de varias capas de estopilla, y los cultivos se trituraron en nitrógeno líquido usando un mortero y una mano de mortero. El ARN total se purificó a partir de los mismos usando el kit Qiagen RNeasy Maxi (Qiagen, Valencia, CA) según el protocolo del fabricante.

20 El ARNm se aisló a partir del ARN total de cada organismo usando resina de oligo dT celulosa. El kit de construcción de genoteca pBluescript II XR (Stratagene, La Jolla, CA) se usó después para sintetizar ADNc bicatenario, que después se clonó de forma dirigida (5' *EcoRI*/3' *XhoI*) en el vector pBluescript II SK(+). La genoteca de *S. diclina* contenía aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  clones con un promedio de tamaño de inserto de aproximadamente 700 pb. El ADN genómico de cultivos de *S. diclina* que producían PUFA se aisló triturando el cultivo en nitrógeno líquido y se purificó usando el Kit de Extracción de ADN Genómico de Qiagen (Qiagen, Valencia, CA).

25 La estrategia tomada fue la de diseñar oligonucleótidos degenerados (es decir, cebadores) que representan motivos aminoacídicos que están conservados en desaturasas conocidas. Estos cebadores podrían usarse en una reacción de PCR para identificar un fragmento que contenía las regiones conservadas en los genes de desaturasa esperados de hongos. Puesto que las únicas desaturasas fúngicas identificadas fueron los genes de  $\Delta$ 5 y  $\Delta$ 6-desaturasa de *Mortierella alpina* (números de acceso Genbank AF067650, AB020032, respectivamente), se tuvieron en cuenta las secuencias de desaturasa de plantas, así como de animales, durante el diseño de estos cebadores degenerados. Las secuencias de  $\Delta$ 5- y  $\Delta$ 6-desaturasa conocidas de los siguientes organismos se usaron para el diseño de estos cebadores degenerados: *Mortierella alpina*, *Borago officinalis*, *Helianthus annuus*, *Brassica napus*, *Dictyostelium discoideum*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* y *Ricinus communis*. Los cebadores degenerados usados eran los siguientes, usando el programa CODEHOP Blockmaker (<http://blocks.fh-crc.org/codehop.html>):

30 A. Motivo proteico 1 (SEC ID Nº: 53):  
 NH<sub>3</sub>-VYDVTEWVKRHPGG-COOH  
 Cebador RO 834 (SEC ID Nº: 1):  
 45 5'-GTBTAYGAYGTBACCGARTGGGTBAAGCGYAYCCBGGHGGH-3'

B. Motivo proteico 2 (SEC ID Nº: 54):  
 NH<sub>3</sub>-GASANWWKHQHNVHH-COOH  
 Cebador RO835 (Directo) (SEC ID Nº: 2):  
 50 5'-GGHGCTCCGCYAACTGGTGAAGCAYCAGCAYAACGTBCAYCAY-3'  
 Cebador RO836 (Inverso) (SEC ID Nº: 3)  
 5'-RTGRTGVACGTTTGTGCTGRTGCTTCCACCAGTTRGCGGARGCDCC-3'

C. Motivo proteico 3 (SEC ID Nº: 55):  
 NH<sub>3</sub>-NYQIEHHLFPTM-COOH  
 Cebador R0838 (Inverso) (SEC ID Nº: 4)  
 55 5'-TTGATRGCTARCTYGTRGTRGASAARGGVTTGGTAC-3'

60 Además se diseñaron dos cebadores más basándose en la 2ª y 3ª "caja de histidina" conservada encontradas en las  $\Delta$ 6-desaturasas conocidas. Estos fueron:

Cebador RO753 (SEC ID Nº: 5)  
 5'-CATCATCATNGGRAANARRTGRTG-3'  
 Cebador RO754 (SEC ID Nº: 6)

5'-CTACTACTACTACAYCAYACNTAYACNAAY-3'

El código de degeneración para las secuencias oligonucleotídicas era: B = C, G, T; H = A, C, T; S = C, G; R = A, G; V = A, C, G; Y = C, T; D = A + T + C; N = A, C, G, o T/U, desconocido u otro.

5

## Ejemplo 2

### Aislamiento de secuencias de nucleótidos de $\Delta 6$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851)

10 Se aisló ARN total de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851) usando el método de cloruro de litio (Hoge, et al., Exp. Mycology (1982) 6: 225-232). Se sometieron a transcripción inversa cinco  $\mu\text{g}$  del ARN total; usando el sistema de preamplificación Superscript (LifeTechnologies, Rockville, MD) y el cebador oligo(dT)<sub>12-18</sub> suministrado con el kit para generar el ADNc de primera cadena.

15 Para aislar el gen de  $\Delta 6$ -desaturasa, se usaron diversas permutaciones y combinaciones de los oligonucleótidos degenerados mencionados anteriormente en reacciones de PCR. De los diversos conjuntos de cebadores probados, los únicos cebadores que dieron bandas distintas fueron RO834/RO838. La amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen de 100  $\mu\text{l}$  que contenía: 2  $\mu\text{l}$  del molde de ADNc de primera cadena, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 200  $\mu\text{M}$  de cada desoxirribonucleótido trifosfato y 2 pmol de cada cebador. El termociclado se llevó a cabo a dos temperaturas de hibridación diferentes, 42°C y 45°C, y estas dos reacciones de PCR se combinaron, se resolvieron en un gel de agarosa al 1,0% y la banda de ~1000 pb se purificó en gel usando el Kit de Extracción en Gel QiaQuick (Qiagen, Valencia, CA). Los extremos escalonados en estos fragmentos se "rellenaron" usando ADN polimerasa de T4 (LifeTechnologies, Rockville, MD) según las especificaciones del fabricante, y estos fragmentos de ADN se clonaron en el vector PCR-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los plásmidos recombinantes se transformaron en células supercompetentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y los clones se secuenciaron.

25

De este modo se aislaron dos clones que mostraban homología de secuencia con  $\Delta 6$ -desaturasas identificadas previamente. Estos clones se describen de la forma siguiente:

30 a. El clon nº 20-2 se secuenció parcialmente y la secuencia de aminoácidos deducida de 702 pb mostró una identidad del 30,2% con  $\Delta 6$ -desaturasa de *Mortierella alpina* como el emparejamiento de mayor puntuación en una búsqueda de TfastA.

35 b. El clon nº 30-1 se secuenció parcialmente y la secuencia de aminoácidos deducida de 687 pb mostró una identidad de aminoácidos del 48,5% con la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Mortierella alpina* como el emparejamiento de mayor puntuación en una búsqueda de TfastA. Estas dos secuencias también solapaban entre sí, indicando que pertenecían a una sola supuesta  $\Delta 6$ -desaturasa de *S. diclina*. Esta nueva secuencia de  $\Delta 6$ -desaturasa se usó después para diseñar cebadores para recuperar el extremo 3' y el extremo 5' del gen de  $\Delta 6$ -desaturasa de longitud completa de la genoteca de ADNc generada a partir del ARNm de *S. diclina*.

40

Para aislar el extremo 3', se llevó a cabo una amplificación por PCR usando ADN plasmídico purificado a partir de la genoteca de ADNc como molde, y los oligonucleótidos R0923 (SEC ID Nº: 7) (5'-CGGTGCAGTGGTGAAGAACAAGCACAAAC-3') y R0899 (SEC ID Nº: 8) (5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC-3'). El oligonucleótido R0923 se diseñó basándose en el fragmento nº 20-2 de esta supuesta  $\Delta 6$ -desaturasa, y el oligonucleótido de R0899 correspondía a la secuencia del vector pBluescript II SK(+) usado para la preparación de la genoteca de ADNc. Se llevó a cabo una amplificación usando 10 pmoles de cada cebador y la mezcla maestra de PCR de Taq (Qiagen, Valencia, CA). Las muestras se desnaturalizaron inicialmente a 94°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de lo siguiente: 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos. Se llevó a cabo un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos antes de que se terminase la reacción. Los fragmentos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 0,8% y se purificaron en gel usando el Kit de Extracción en Gel de Qiagen. El extremo escalonado de estos fragmentos se "rellenó" usando ADN polimerasa de T4 (LifeTechnologies, Rockville, MD) según las especificaciones del fabricante, y estos fragmentos de ADN se clonaron en el vector PCR-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los plásmidos recombinantes se transformaron en células supercompetentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y los clones se secuenciaron. El clon sd2-2 contenía un inserto de 958 pb que se identificó que contenía el extremo 3' del supuesto gen de  $\Delta 6$  basándose en la homología de secuencia con  $\Delta 6$ -desaturasas conocidas y la presencia del codón de terminación "TAA" y de la cola Poli A.

55

60 Para aislar el extremo 5' de esta  $\Delta 6$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina*, el oligonucleótido RO939 (SEC ID Nº: 9) (5'-CGTAGTACTGCTCGAGGAGCTTGAGCGCCG-3') se diseñó basándose en la secuencia del fragmento nº 30-1 identificado anteriormente. Este oligonucleótido se usó en combinación con RO898 (SEC ID Nº: 10) (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG-3') (diseñado basándose en la secuencia del vector pBluescript SK(+)) para amplificar por PCR el extremo 5' de la  $\Delta 6$ -desaturasa de la genoteca de ADNc. En este caso, el kit de PCR de ADNc Advantage-GC (Clonetech, Palo Alto, CA) se usó para superar los problemas de amplificación por PCR que se producían con regiones ricas en GC, que se esperaba estuviesen presentes en el extremo 5' de esta

65

Δ6-desaturasa. Las condiciones de termociclado de la PCR eran las siguientes: el molde se desnaturizó inicialmente a 94°C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de [94°C durante 30 segundos, 68°C durante 3 minutos] y, por último, un ciclo de extensión a 68°C durante 5 minutos. Los productos de PCR así obtenidos se clonaron en el vector PCR-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el mismo protocolo que se ha descrito anteriormente. Se obtuvo por lo tanto el clon sd21-2 que contenía un inserto de 360 pb que contenía el supuesto sitio de inicio "ATG" de la nueva Δ6-desaturasa. La secuencia de aminoácidos deducida de este fragmento, cuando se alineaba con Δ6-desaturasa conocida mostraba una identidad del 37-45%.

Este nuevo gen de Δ6-desaturasa se aisló en su totalidad mediante amplificación por PCR usando la genoteca de ADNc de *S. diclina* o ADN genómico de *S. diclina* como molde, y los oligonucleótidos siguientes:

a. RO 951 (SEC ID N°: 11)

(5'-TCAACAGAATTCATGGTCCAGGGGCAAAGGCCGAGAAGATCTCG-3') que contenía la secuencia del extremo 5' del clon sd21-2, así como un sitio *EcoRI* (subrayado) para facilitar la clonación en un vector de expresión de levadura.

b. RO960 (SEC ID N°: 12)

(5'-ATACGTAAGCTTTTACATGGCGGGAAACTCCTTGAAGAACTCGATCG-3'), que contenía la secuencia del extremo 3' del clon sd2-2 incluyendo el codón de terminación, así como un sitio *HindIII* (subrayado) para la clonación en un vector de expresión.

La amplificación por PCR se llevó a cabo usando 200 ng del molde plasmídico de la genoteca de ADNc, 10 pmoles de cada cebador y la mezcla maestra de PCR de Taq (Qiagen, Valencia, CA), o 200 ng de ADN genómico, 10 pmoles de cada cebador y el kit de PCR de ADNc Advantage-GC (Clontech, Palo Alto, CA). Las condiciones de termociclado eran las siguientes: el molde se desnaturizó inicialmente a 94°C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de [94°C durante 30 segundos, 68°C durante 3 minutos] y, por último, un ciclo de extensión a 68°C durante 5 minutos. El producto de PCR así obtenido se digirió con *EcoRI/HindIII* y se clonó en el vector de expresión de levadura pYX242 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para generar los clones pRSP1 (derivado de ADN genómico) y pRSP2 (derivado de genoteca), que después se secuenciaron y se usaron para estudios de expresión.

El inserto de gen de longitud completa de Δ6-desaturasa era de 1362 pb (SEC ID N°: 13, Figura 2) de longitud y, comenzando con el primer ATG, contenía una fase de lectura abierta que codificaba 453 aminoácidos. (La secuencia de nucleótidos que codifica la Δ6-desaturasa se depositó como plásmido pRSP1 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 bajo los términos del Tratado de Budapest el 23 de enero de 2001, y se acordó el número de acceso PTA-2829). La secuencia de aminoácidos del gen de longitud completa (SEC ID N°: 14, Figura 3) contenía regiones de homología con Δ6-desaturasa de *Mortierella alpina*, *Caenorhabditis elegans* y *Borago officinalis*. También contenía las tres "cajas de histidina" conservadas encontradas en todas las desaturasa unidas a membrana conocidas (Okuley, et al. (1994) The Plant Cell 6: 147-158). Éstas estaban presentes en las posiciones de aminoácidos 171-176, 208-212 y 391-395. Como con otras Δ6-desaturasa unidas a membrana, se descubrió que el tercer motivo de caja de histidina (HXXHH) en la Δ6-desaturasa de *S. diclina* era QXHH. Esta secuencia también contenía un dominio de citocromo b5 en el extremo 5'. Este dominio de citocromo b5 se encontró en varias enzimas desaturasa unidas a membrana y se cree que el citocromo b5 funciona como donador de electrones en estas enzimas. La presencia de este dominio puede ser ventajosa cuando se expresa la desaturasa en sistemas heterólogos para la producción de PUFA. Puesto que el uso propuesto de este gen es para la reconstrucción de la ruta biosintética de PUFA en plantas, la composición de bases de este gen puede ser muy importante. (Se sabe que algunos genes recombinantes muestran una escasa expresión debido a variaciones en su composición de bases en comparación con la del hospedador. El contenido de G+C global de este gen era del 59%, que está próximo al de desaturasa de *M. alpina* que se han expresado con éxito en plantas).

### Ejemplo 3

#### Aislamiento de secuencias de nucleótidos de Δ5-desaturasa de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851)

La *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851) produce tanto ácido araquidónico (ARA, 20:4 n-6) como ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3); por lo tanto, se pensaba que tenía, quizá, una Δ5-desaturasa que puede convertir el ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA, 20:3n-6) en ácido araquidónico (ARA, 20:4 n-6).

Como con el aislamiento de Δ6-desaturasa, para el aislamiento de Δ5-desaturasa de *S. diclina* se usaron diversas combinaciones de los cebadores degenerados en reacciones de PCR, usando ADNc de primera cadena como molde. La combinación de cebadores, R0753 y R0754, generaba una banda distinta de 588 pb usando las condiciones de PCR siguientes: 2 μl del molde de ADNc de primera cadena, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 200 μM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 2 pmol de cada cebador y 1 U de ADNc polimerasa (Clontech, Palo Alto, CA), en un volumen de reacción final de 50 μl. El termociclado se llevó a cabo de la forma siguiente: una desnaturización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de: desnaturización a 94°C

durante 30 segundos, hibridación a 60°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. Esto estaba seguido de una extensión final a 72°C durante 7 minutos y la reacción se terminó a 4°C. Este fragmento así generado se clonó (clon nº 18-1), se secuenció y, cuando se tradujo, mostró una identidad de aminoácidos del 43% con la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Mortierella alpina* (nº de acceso Genbank AF067654) y una identidad del 38,7% con la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Dictyostelium discoideum* (nº de acceso Genbank AB029311). El segundo fragmento de PCR se identificó usando los cebadores R0834 y R0838 en la reacción descrita en el Ejemplo 2. Este fragmento de aproximadamente 1000 pb de longitud se clonó (clon nº 20-8) y la secuencia de aminoácidos deducida derivada de 775 pb mostró una identidad del 42% con la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Dictyostelium discoideum* (nº de acceso Genbank AB029311). Estas dos secuencias, nº 18-1 y nº 20-8, solapaban entre sí, indicando que pertenecían a una sola supuesta  $\Delta 5$ -desaturasa de *S. diclina*. Estas secuencias se usaron después para diseñar cebadores para recuperar el extremo 3' y 5' del nuevo gen de  $\Delta 5$ -desaturasa de la genoteca de ADNc generada a partir del ARNm de *S. diclina*.

Para aislar el extremo 3' de esta supuesta  $\Delta 5$ -desaturasa, se llevó a cabo una amplificación por PCR usando ADN plasmídico purificado a partir de la genoteca de ADNc como molde, y los oligonucleótidos RO851 (SEC ID Nº: 15) (5'-CATCAAGACGTAC-CTTGCGATC-3') y R0899 (SEC ID Nº: 8) (5'-AGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGC-3'). El oligonucleótido RO851 se diseñó basándose en el fragmento nº 18-1 de esta supuesta  $\Delta 5$ -desaturasa, y el oligonucleótido de R0899 correspondía a la secuencia del vector pBluescript II SK(+). Se llevó a cabo una amplificación usando 200 ng de ADN plasmídico de molde, 10 pmoles de cada cebador y la mezcla maestra de PCR de Taq (Qiagen, Valencia, CA). Las muestras se desnaturalizaron inicialmente a 94°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de lo siguiente: 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto. Se llevó a cabo un ciclo de extensión final a 72°C durante 7 minutos antes de que se terminara la reacción. Los fragmentos de PCR se clonaron en el vector PCR-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA) como por el protocolo descrito en el Ejemplo 2. Los plásmidos recombinantes se transformaron en células supercompetentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y los clones se secuenciaron. El clon sd12-11 contenía un inserto de 648 pb que contenía el extremo 3' del supuesto gen de  $\Delta 5$  basándose en la homología de secuencia con  $\Delta 5$ -desaturasas conocidas y en la presencia del codón de terminación "TAA" y de la cola poliA.

El extremo 5' de esta  $\Delta 5$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina* se aisló usando los cebadores RO941 y R0898. El oligonucleótido RO941 (SEC ID Nº: 16) (5'-GCTGAACGGGTGGTACGAGTCCAACGTG-3') se diseñó basándose en la secuencia del fragmento nº 20-8 identificado anteriormente. Este oligonucleótido se usó en combinación con R0898 (SEC ID Nº: 10) (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG-3') (diseñado basándose en la secuencia del vector pBluescript II SK(+)) en una reacción de amplificación por PCR usando el ADN plasmídico de la genoteca de ADNc como molde. Aquí el kit de PCR de ADNc Advantage-GC (Clontech, Palo Alto, CA) se usó según el protocolo del fabricante y las condiciones de termociclado eran las siguientes: se llevó a cabo una desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, seguida de 30 ciclos de [desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación y extensión a 68°C durante 3 minutos] y un ciclo de extensión a 68°C durante 5 minutos. Estos productos de PCR se purificaron, se clonaron en el vector PCR-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se secuenciaron como se ha descrito anteriormente. Se identificó que el clon sd24-1 contenía un inserto de 295 pb que contenía el supuesto sitio de inicio "ATG" de la nueva  $\Delta 5$ -desaturasa. El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida de este fragmento mostró regiones de alta homología con  $\Delta 5$ -desaturasas conocidas, y también la presencia de un dominio de citocromo b5.

El gen de  $\Delta 5$ -desaturasa de longitud completa se aisló por amplificación por PCR usando ADN genómico de *S. diclina* como molde y los oligonucleótidos siguientes:

a. RO 953 (SEC ID Nº: 17)

(5'-ACGAGAGAATTTCATGGCCCCGACGAGCTCCGCCAG CGC-3') que contenía la secuencia del extremo 5' del clon sd24-1, así como un sitio *EcoRI* (subrayado) para facilitar la clonación en un vector de expresión de levadura; y

b. RO956 (SEC ID Nº: 18)

(5'-AAAAGACTCGAGTTAGCCCATGTGGATCGTGCGGCGATGCCC TGC-3') que contenía la secuencia del extremo 3' del clon sd12-11, incluyendo el codón de terminación así como un sitio *XhoI* (subrayado) para la clonación en un vector de expresión.

Las condiciones para la amplificación por PCR del gen de "longitud completa" eran similares a las descritas para la amplificación de la  $\Delta 6$ -desaturasa del ADN genómico (Ejemplo 2). El producto de PCR así obtenido se ingirió con *EcoRI/XhoI* y se clonó en el vector de expresión de levadura pYX242 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se demostró que el clon pRSP3 (derivado de ADN genómico) contenía un inserto de 1413 pb y se usó para estudios de expresión.

El gen de longitud completa de 1413 pb (SEC ID Nº: 19, Figura 4) de la supuesta  $\Delta 5$ -desaturasa de *S. diclina* contenía una fase de lectura abierta que codifica 471 aminoácidos (SEC ID Nº: 20, Figura 5). (La secuencia de nucleótidos que codifica la  $\Delta 5$ -desaturasa se depositó (como plásmido pRSP3) en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10810 University Boulevard, Manassas, VA 20110 bajo los términos del Tratado de Budapest el 23 de

enero de 2001, y se acordó el número de acceso PTA-2928). Esta proteína producida mostró una identidad global del 40,5% con la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Mortierella alpina* (nº de acceso Genbank AF067654) y una identidad del 39,5% con la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Dictyostelium discoideum* (nº de acceso Genbank AB022097). También contenía las tres "cajas de histidina" conservadas en las posiciones de aminoácidos 186-190, 223-228, 406-410. Como la  $\Delta 6$ -desaturasa, esta secuencia también contenía el dominio de citocromo b5 en el extremo 5'. El contenido global de G+C de este gen era del 61,5%.

#### Ejemplo 4

##### 10 Expresión de genes de desaturasa de *S. diclina* en levadura de panadería

El clon pRSP2, que consistía en la  $\Delta 6$ -desaturasa de longitud completa clonada en PYX242 (Invitrogen, Carlsbad, CA), y el clon pRSP3, que consistía en el gen de delta-5-desaturasa de longitud completa en pYX242, se transformaron en la cepa 334 competente de *Saccharomyces cerevisiae*. La transformación de la levadura se llevó a cabo usando el kit de transformación de levadura por cationes alcalinos (BIO 101, Vista, CA) de acuerdo con las condiciones especificadas por el fabricante. Los transformantes se seleccionaron por su auxotrofia para leucina en medios que carecían de leucina (DOB [-Leu]). Para detectar la actividad desaturasa específica de estos clones, los transformantes se cultivaron en presencia de sustratos ácidos grasos específicos 50  $\mu$ M, como se enumeran a continuación:

- 20 a. Ácido esteárico (18:0) (la conversión en ácido oleico indicaría actividad  $\Delta 9$ -desaturasa).
- b. Ácido oleico (18:1) (la conversión en ácido linoleico indicaría actividad  $\Delta 12$ -desaturasa).
- 15 c. Ácido linoleico (18:2 n-6) (la conversión en ácido alfa-linolénico indicaría actividad  $\Delta 15$ -desaturasa y la conversión en ácido gamma-linolénico indicaría actividad  $\Delta 6$ -desaturasa).
- 25 d. Ácido alfa-linolénico (18:3 n-3) (la conversión en ácido estearidónico indicaría actividad  $\Delta 6$ -desaturasa).
- e. Ácido dihomo-gamma-linolénico (20:3 n-6) (la conversión en ácido araquidónico indicaría actividad  $\Delta 5$ -desaturasa).

La cepa de control negativo era *S. cerevisiae* 334, que contenía el vector pYX242 inalterado, y éstas se cultivaron simultáneamente. Los cultivos se agitaron enérgicamente (250 rpm) y se cultivaron durante 48 horas a 24°C en presencia de 50  $\mu$ M (concentración final) de los diversos sustratos. Las células se sedimentaron y se agitaron vorticialmente en metanol; se añadió cloroformo junto con tritridecanoína (como patrón interno). Estas mezclas se incubaron durante al menos una hora a temperatura ambiente o a 4°C durante una noche. La fase de cloroformo se extrajo y se filtró a través de un filtro Whatman con 1 g de sulfato sódico anhidro para eliminar los particulados y el agua residual. Los disolventes orgánicos se evaporaron a 40°C bajo una corriente de nitrógeno. Los lípidos extraídos se derivatizaron después a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) para análisis por cromatografía de bases (GC) por adición de 2 ml de hidróxido de potasio 0,5 N en metanol a un tubo cerrado. Las muestras se calentaron a 95°C-100°C durante 30 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente. Se añadieron aproximadamente 2 ml de trifluoruro de boro al 14% en metanol y se repitió el calentamiento. Después de enfriarse la mezcla de lípidos extraída, se añadieron 2 ml de agua y 1 ml de hexano para extraer los FAME para su análisis por GC. El porcentaje de conversión se calculó dividiendo el producto producido por la suma de (el producto producido + el sustrato añadido) y multiplicando después por 100.

La Tabla 1 representa la actividad enzimática de los genes aislados basándose en el porcentaje de conversión de sustrato añadido. El clon pRSP1 que contenía el gen de  $\Delta 6$ -desaturasa de *S. diclina* convertía el 28% del sustrato de 18:2n-6 en 18:3n-3, así como el 37% del sustrato de 18:3n-3 en 18:4n-3. Esto confirma que el gen codifica una  $\Delta 6$ -desaturasa. No había fondo (conversión inespecífica de sustrato) en este caso. (Todas las tablas mencionadas en la presente memoria se presentan después del Resumen de la descripción).

50 El clon pRSP3 que contenía el gen de  $\Delta 5$ -desaturasa de *S. diclina* era capaz de convertir el 27% del sustrato de 20:3n-6 añadido en 20:4n-6, indicando que la enzima que codifica es una  $\Delta 5$ -desaturasa. En este caso tampoco se detectó conversión de sustrato de fondo. Estos datos indican que las desaturasas con diferente especificidad de sustrato pueden expresarse en un sistema heterólogo y también pueden usarse para producir ácidos grasos poliinsaturados.

55 La Tabla 2 representa ácidos grasos de interés como porcentaje de los lípidos totales extraídos de *S. cerevisiae* 334 con el plásmido indicado. No había presente glucosa en el medio de cultivo. Se usó cromatografía de gases de afinidad para separar los lípidos respectivos. Se empleó GC/MS para identificar los productos. A partir de esta tabla, es evidente que los sustratos añadidos exógenamente, cuando se añadían en la forma libre, eran captados por la levadura recombinante y los incorporaban sus membranas. En el clon de levadura que contiene el gen de  $\Delta 6$ -desaturasa (pRSP1), se identificó GLA ( $\gamma$ -18:3) como un nuevo PUFA cuando se añadía LA (18:2) como sustrato, y se detectó ácido araquidónico en levadura que contenía el gen de  $\Delta 5$ -desaturasa (pRSP3) cuando se añadía DGLA (20:3) como sustrato.

Ejemplo 5Coexpresión de desaturasas de *S. diclina* con elongasas

- 5 Los plásmidos pRSP1 (A6) y pRSP3 (A5) se cotransformaron individualmente con pRAE73-A3, un clon que contiene el gen de elongasa humana (SEC ID N°: 21) en el vector de expresión de levadura pYES2, en levaduras como se describe en el Ejemplo 4. Este gen de elongasa cataliza algunas de las etapas de elongación en la ruta de PUFA. Se seleccionaron cotransformantes en medios mínimos que carecían de leucina y uracilo (DOB[-Leu-Ura]).
- 10 La Tabla 3 muestra que cuando se añadieron 50  $\mu$ M del sustrato LA (18:2 n-6) la  $\Delta$ 6-desaturasa convertía este sustrato en GLA (18:3 n-6) y la elongasa era capaz de añadir dos carbonos a GLA para producir DGLA (20:3 n-6). El porcentaje de conversión en el producto final mediante estas enzimas cotransformadas es del 26,4%, no observándose fondo a partir del control negativo. De forma similar, las enzimas cotransformadas pueden actuar sobre el ALA (18:3n-3) para formar finalmente (20:4n-3) con un porcentaje de conversión del 34,39%. Por lo tanto, la
- 15  $\Delta$ 6-desaturasa de *S. diclina* era capaz de producir un producto en un sistema de expresión heterólogo que podría utilizarse adicionalmente por otra enzima heteróloga de la ruta biosintética de PUFA para producir el PUFA esperado.
- La Tabla 4 muestra resultados del experimento de cotransformación de pRSP3( $\Delta$ 5)/elongasa humana. En este caso, el sustrato GLA (18:3n-6) se convirtió en DGLA (20:3n-6) por elongasa humana y éste se convirtió adicionalmente en ARA (20:4n-6) por acción de la  $\Delta$ 5-desaturasa de *S. diclina*. El porcentaje de conversión del sustrato en el producto final por estas enzimas cotransformadas es del 38,6%, no observándose fondo a partir del control negativo.
- 20 El otro sustrato ensayado en este caso era STA (18:4 n-3) que finalmente se convertía en EPA (20:5n-3) por la acción concertada de las dos enzimas. Se observaron resultados similares cuando el pRSP1 y el pRSP3 se cotransforman con un gen de elongasa derivado de *M. alpina* (pRPB2) (SEC ID N°: 22), y se demostró que ambos genes eran funcionales en presencia del otro (véanse la Tabla 3 y la Tabla 4).
- 25

Ejemplo 6 (comparativo)

30

Aislamiento de secuencias de nucleótidos de  $\Delta$ 5-desaturasa a partir de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34303)

- Para aislar supuestos genes de desaturasas, se aisló el ARN total como se describe en el Ejemplo 2. Se sometieron a transcripción inversa aproximadamente 5  $\mu$ g usando el sistema de preamplificación Superscript (LifeTechnologies, Rockville, MD) como se muestra en el Ejemplo 2 para producir ADNc de primera cadena. Usando los cebadores degenerados RO834 (SEC ID N°: 1) y 838 (SEC ID N°: 4) diseñados con el programa Blockmaker en una reacción de 50  $\mu$ l, se combinaron los componentes siguientes: 2  $\mu$ l del molde de ADNc de primera cadena, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 200  $\mu$ M de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 2 pmol de concentración final de cada cebador y ADNc polimerasa (Clonetech, Palo Alto, CA). El termociclado se llevó a cabo de la forma siguiente:
- 40 una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 60°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. Esto estaba seguido de una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Dos bandas débiles de aproximadamente 1000 pb se separaron en un gel de agarosa al 1%, se escindieron y se purificaron con el kit de extracción en gel QiaQuick (Qiagen, Valencia, CA). Los extremos se rellenaron con ADN polimerasa de T4 y los fragmentos de extremos romos se clonaron en PCR Blunt como se ha descrito en el Ejemplo 2. La secuenciación de los clones obtenidos identificó la secuencia parcial de 680 pb del clon 30-9, cuya traducción de 226 aminoácidos tenía una identidad del 31,5% con la  $\Delta$ 6-desaturasa de pez cebra adulto (número de acceso Genbank AW281238). Se encontró un grado similar de homología de aminoácidos (29,6%-28,7%) con la  $\Delta$ 6-desaturasa humana (número de acceso Genbank AF126799),  $\Delta$ 6-desaturasa de *Physcomitrella patens* (musgo) (número de acceso Genbank AJ222980),  $\Delta$ 8-esfingolípido desaturasa de *Brassica napus* (colza) (número de acceso Genbank AJ224160) y  $\Delta$ 5-desaturasa humana (número de acceso de la ATCC 203557, número de acceso Genbank AF199596). Puesto que había un grado razonable de homología de aminoácidos con desaturasas conocidas, se buscó un gen de longitud completa que codifica una desaturasa potencial para determinar su actividad cuando se expresaba en levaduras.
- 45
- 50 Para aislar el extremo 3' del gen, se combinaron 10 pmol de cebador RO936 (SEC ID N°: 23) (5'-GTCGGGCAAGGCGGAAAAGTACCTCAAGAG-3') y cebador del vector RO899 (SEC ID N°: 8) en una reacción con 100 ng de plásmido purificado de la genoteca de ADNc de *T. aureum* en un volumen de reacción de 100  $\mu$ l en mezcla maestra de PCR de Taq (Qiagen, Valencia, CA). Las condiciones de termociclado eran las siguientes: una fusión inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos. Esto venía seguido de una etapa de extensión de 10 minutos a 72°C. Varias bandas, incluyendo el tamaño esperado de 1,2 kb, se separaron en un gel de agarosa al 1% y se purificaron como se ha indicado anteriormente. También como se ha descrito anteriormente, los extremos de los fragmentos se hicieron romos, se clonaron en PCR Blunt y se secuenciaron. El fragmento n° 70-2 de aproximadamente 1,2 kb se secuenció y contenía una fase de lectura abierta y un codón de terminación que solapaba con el fragmento 30-9.
- 55
- 60

Para aislar el extremo 5' del gen, se usó RO937 (SEC ID N°: 24) (5'-AAACCTGTAGACAATGTGGAGGGGCGTGGG-3') y RO 899 (SEC ID N°: 8) en una reacción de PCR de 50 µl con el kit de PCR de ADNc Advantage-GC (Clontech, Palo Alto, CA) según el protocolo del fabricante, con 100 ng de ADN plasmídico purificado a partir de la genoteca y 10 pmol de cada cebador. Las condiciones de termociclado eran las siguientes: se llevó a cabo una desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, seguida de 30 ciclos de [desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación y extensión a 68°C durante 3 minutos] y un ciclo de extensión final a 68°C durante 5 minutos. Una banda de aproximadamente 500 pb, en el intervalo de tamaño esperado, se purificó en gel, sus extremos se hicieron romos y se clonó en PCR Blunt como se ha descrito previamente. El clon 95-2 contenía una fase de lectura abierta con un codón de inicio. Este fragmento también solapaba con el clon 30-9, indicando que eran de hecho trozos del mismo gen.

Para aislar el gen de longitud completa, se diseñaron cebadores con sitios de restricción 5' y 3' (subrayados) con *EcoRI* y *XhoI*, respectivamente, de la forma siguiente: cebador 5' RO972 (SEC ID N°: 25) (5'-ATACTTGAATTCATGGGACGCGCGCGAAGGTCAGGTGAAC-3'), cebador 3' RO949 (SEC ID N°: 26) (5'-CTTATACTCGAGCTAAGCGG CCTTGGCCGCCGCTGGCC-3') y cebador 3' RO950 (SEC ID N°: 27) (5'-CTTATACTCGAGTAAATGGCTCGCGAGGCGAAGCGAGTGGC-3'). Se usaron dos cebadores para el extremo 3' del gen en el intento de aislamiento inicial puesto que el cebador RO949, que contenía el codón de terminación, tenía un contenido de GC del 66%, mientras que el cebador alternativo RO950, que estaba fuera del codón de terminación, tenía sólo un contenido de GC del 56%. Se realizó una reacción de PCR de 50 µl con RO972/RO949 y RO972/950 con el kit de PCR de ADNc Advantage-GC (Clontech, Palo Alto, CA) en condiciones idénticas señaladas en el párrafo anterior. Sólo el conjunto de cebadores RO972/950 producía una banda de aproximadamente 1,6 kb. El uso de ADN genómico como molde (en condiciones idénticas con 100 ng de diana) también producía una banda de un tamaño similar. Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa, se purificaron en gel, sus extremos se hicieron romos y se clonaron en PCR Blunt como se ha descrito previamente. Los fragmentos se evaluaron por secuenciación y se cortaron varios clones con *EcoRI/XhoI* para escindir el gen de longitud completa, se ligaron en pYX242 *EcoRI/XhoI* que se había tratado con fosfatasa alcalina de camarón (Roche, Indianápolis, IN) con el kit de ligación rápida (Roche, Indianápolis, IN). El clon 99-3, denominado pRTA4, contenía el gen de longitud completa de 1317 pb (SEC ID N°: 28, Figura 6) y una fase de lectura abierta de 439 aminoácidos (SEC ID N°: 29, Figura 7). (La secuencia de nucleótidos que codifica la  $\Delta 5$ -desaturasa se depositó en la ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 bajo los términos del Tratado de Budapest el 23 de enero de 2001 y se acordó el número de acceso PTA-2927). Este gen contenía tres cajas de histidina en los números de aminoácidos 171-175, 208-212 y 376-380. El extremo 5' del gen, cuando se traduce, también muestra homología con el citocromo b5.

### Ejemplo 7 (Comparativo)

#### Expresión de gen de desaturasa de *T. aureum* en levadura de panadería

El clon pRTA4 que contenía el gen de longitud completa se transformó en el hospedador de levadura *S. cerevisiae* 334 y se sembró en placas en medio selectivo como se ha descrito en el Ejemplo 4. Los cultivos se cultivaron a 24°C durante 48 horas en medios mínimos que carecían de leucina con 50 µM de ácido graso libre exógeno añadido como sustrato como se muestra en la Tabla 5. La única conversión de un sustrato era de DGLA (20:3n-6) en ARA (20:4n-6). La conversión del 23,7% del DGLA añadido indica que este gen codifica una  $\Delta 5$ -desaturasa.

La Tabla 6 muestra algunos de los ácidos grasos como porcentaje de los lípidos extraídos del hospedador de levadura. Para la actividad de  $\Delta 5$ -desaturasa, no había fondo (la detección de ARA observada en el control negativo que contenía el plásmido de expresión en levadura PYX242.)

### Ejemplo 8 (Comparativo)

#### Coexpresión de gen de desaturasa de *T. aureum* con elongasas

El plásmido pRTA4 se cotransformó con una enzima adicional en la ruta de PUFA, pRAE73-A3, que contiene el gen de elongasa humana en el vector de expresión de levadura pYES2, como se ha descrito en el Ejemplo 4, y los cotransformantes se seleccionaron en medios mínimos que carecían de leucina y uracilo.

La Tabla 7 muestra que cuando se añadían 100 µM del sustrato DGLA, la  $\Delta 5$ -desaturasa producía activamente ARA, al que la elongasa era capaz de añadir dos carbonos para producir ADA. El porcentaje de conversión de  $\Delta 5$ -desaturasa de *T. aureum*, que consiste tanto en ARA como en ADA (productos), era del 16,7%, no observándose fondo a partir del control negativo.

En vista de los resultados anteriores, la  $\Delta 5$ -desaturasa de *T. aureum* es capaz de producir un producto en un sistema de expresión heterólogo que puede usarse mediante una enzima heteróloga adicional en la ruta biosintética de PUFA para producir el PUFA esperado.

Ejemplo 9 (Comparativo)Aislamiento de secuencias de nucleótidos de  $\Delta 5$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* BICC7091 (T7091)

5 Se aisló un candidato a desaturasa parcial usando la combinación de cebadores degenerados de RO834/RO838, enumerada en el Ejemplo 1. Se preparó el ADN genómico de *Thraustochytrium aureum* BICC7091 (Biocon India Ltd., Bangalore, India) usando el kit DNeasy plant maxi (Qiagen, Valencia, CA). Se amplificó el ADNg de T7091 con los cebadores RO834 (5'-GTB TAY GAY GTB ACC GAR TGG GTB AAG CGY CAY CCB GGH GGH-3') (SEC ID N°: 1) y RO838 (5'-CAT GGT VGG RAA SAG RTG RTG YTC RAT CTG RTA GTT-3') (SEC ID N°: 36). La amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen de 100  $\mu$ l que contenía: 5  $\mu$ l de ADNg de T7091 aislado, mezcla de dNTP 0,2 M, 50 pmol de cada cebador, 10  $\mu$ l de tampón 10X y 1,0 U de ADNc polimerasa. Las condiciones de termociclador en Perkin Elmer 9600 eran las siguientes: 94°C durante 3 min, después 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 1 min. La PCR estaba seguida de una extensión adicional a 72°C durante 7 minutos. La mezcla amplificada por PCR se procesó en un gel de agarosa al 1,0% y los fragmentos amplificados de aproximadamente 1,2 Kb y 1,4 Kb se purificaron en gel usando el kit de extracción en gel Qiaquick (Qiagen, Valencia, CA). Los extremos escalonados de estos fragmentos se rellenaron usando ADN Polimerasa de T4 (LifeTechnologies, Rockville, MD), los fragmentos aislados se clonaron en el vector PCR-Blunt (Invitrogen, Co., Carlsbad, CA) y los plásmidos recombinantes se transformaron en células supercompetentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

25 Se prepararon y secuenciaron veinticuatro clones usando un Secuenciador de ADN ABI 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias traducidas se usaron como consulta para realizar una búsqueda en la base de datos GenEmbl (Genetics Computer Group (GCG) (Madison, WI)), usando el algoritmo tFastA (una búsqueda de similitud de Pearson y Lipman entre una secuencia proteica de consulta y cualquier grupo de secuencias de nucleótidos). Se buscó además un fragmento génico, T7091B2, ya que tenía identidad con desaturasas conocidas. El T7091B2 tenía una identidad del 26,8% en 362 aminoácidos con la  $\Delta 5$ -desaturasa humana (número de acceso GenBank AF226273).

30 Para aislar los extremos 3' y 5', se diseñaron nuevos cebadores basándose en la secuencia interna de T7091B2. La genoteca de ADNc de T7091, que contiene aproximadamente  $2 \times 10^7$  clones con un tamaño de inserto promedio de 1 Kb, se amplificó por PCR usando los nuevos cebadores y un cebador de vector. Los cebadores que producían más secuencias 5' y 3' con los cebadores de vector RO898 (5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CGA CGG CCA G-3') (SEC ID N°: 10) y R0899 (5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA AAC AGC- 3') (SEC ID N°: 8) eran RO1065 (5'-CGA CAA GAG GAA GAG TGT CCA AAT C-3') (SEC ID N°: 37) y RO1064 (5'-CGC CTT CAA GAG TTT TTG TAC GGA ATT GGG-3') (SEC ID N°: 38), respectivamente, para el clon T7091B2. Se diseñaron dos nuevos cebadores basándose en las secuencias 5' y 3' de T7091B2:

- 40 a. RO1097 (5'-CTT GTA CCA TGG GTC GCG GAG CAC AGG GAG-3) (SEC ID N°: 39), que tenía un sitio de restricción NcoI añadido (subrayado).  
 b. RO1098 (5'-TGA AGC TTA CTC GCT CTT GGC AGC TTG GCC-3') (SEC ID N°: 40), que tenía un sitio de restricción HindIII añadido (subrayado).

45 Este nuevo gen de  $\Delta 5$ -desaturasa se aisló en su totalidad por amplificación por PCR usando el ADNg de *T. aureum* 7091. Se llevó a cabo una PCR en un volumen de 50  $\mu$ l que contenía:

50 1  $\mu$ l de ADNg de T7091 aislado, mezcla de dNTP 0,2  $\mu$ M, 50 pM de cada cebador, 5  $\mu$ l de tampón 10 X, 1,5  $\mu$ l de MgSO<sub>4</sub> 50 mM y 0,5 U de ADN Polimerasa Taq. Las condiciones de termociclador en Perkin Elmer 9600 eran las siguientes: 94°C durante 3 min, después 30 ciclos de 95°C durante 45 s, 55°C durante 30 s y 68°C durante 2 min. La mezcla amplificada por PCR se procesó en un gel, se purificó en gel un fragmento amplificado de aproximadamente 1,3 Kb, y el fragmento aislado se clonó en el vector pYX242(NcoI/EcoRV). Se prepararon y secuenciaron dos clones, denominados pRAT-2a y 2c. (El plásmido pRAT-2c se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 en enero de 2002 bajo los términos del Tratado de Budapest, y se acordó el número de depósito de la ATCC     ). Las secuencias eran diferentes por cuatro aminoácidos (Figura 12), y la secuencia traducida tenía una identidad del 67,4% en 436 aminoácidos con la  $\Delta 5$ -desaturasa de *T. aureum* (ATCC34303) (véase el Ejemplo 6).

Ejemplo 10 (comparativo)Aislamiento de secuencias de nucleótidos de  $\Delta 6$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* BICC7091 (T7091)

60 Se secuenciaron trescientos setenta y tres moldes de la genoteca de ADNc de T7091 para determinar la viabilidad de la genoteca. Las secuencias traducidas se usaron como consultas para realizar una búsqueda en la base de datos GenEmbl usando el algoritmo tFastA. El clon 602187281R1 (o clon 281 para acortar) tenía identidad con varias desaturasas conocidas. Los extremos 5' y 3' del clon EST se secuenciaron para diseñar cebadores para la

amplificación. Los cebadores RO1107 (5'-TTT AAC CAT GGG CCG CGG CGG CGAGAA AAG-3') (SEC ID N°: 41), que tenían un sitio de restricción NcoI añadido (subrayado) y RO1108 (5'-GGG AAG AAG CTT TCT ACT GCG CCT TGG CTT TCT TTG-3') (SEC ID N°: 42), que tenían un sitio de restricción HindIII (subrayado) se usaron para amplificar por PCR el ADNg de T7091.

5 La PCR se llevó a cabo en un volumen de 50 µl con ADN Polimerasa *Taq* como anteriormente. La mezcla amplificada por PCR se procesó en un gel, se purificó en gel un fragmento amplificado de aproximadamente 1,3 Kb, y el fragmento aislado se clonó en el vector pYX242(*NcoI/EcoRV*). Se prepararon y secuenciaron dos clones, denominados pRAT-1a y 1b. Las secuencias eran diferentes por un aminoácido (Figura 13) y la secuencia traducida  
10 tenía una identidad del 25% en 430 aminoácidos con la Δ5-desaturasa humana. (El plásmido pRAT-1a se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 en enero de 2002 bajo los términos del Tratado de Budapest y se acordó el número de depósito de ATCC \_).

#### 15 Ejemplo 11 (comparativo)

##### Expresión de genes de desaturasa de *T. aureum* 7091 en levadura de panadería

Los clones pRAT-2a y pRAT-2c, que consistían en la Δ5-desaturasa de longitud completa clonada en pYX242 (Invitrogen, Carlsbad, CA), y los clones pRAT-1a y pRAT-1b, que consistían en el gen de Δ6-desaturasa de longitud  
20 completa en pYX242, se transformaron en *Saccharomyces cerevisiae* 334 competente. La transformación de levaduras se llevó a cabo usando el kit de transformación de levaduras por cationes alcalinos (BIO 101, Vista, CA). Los transformantes se seleccionaron por su auxotrofia para leucina en medios que carecían de leucina (DOB[-leu]). Debido a que la secuencia traducida del ADNc de pRAT-1 no tenía una fuerte identidad con ninguna desaturasa conocida particular, se ensayaron varios sustratos de ácidos grasos para determinar la actividad de la enzima  
25 expresada. Para detectar la actividad desaturasa específica de los clones pRAT-1a y pRAT-1b, los transformantes se cultivaron en presencia de sustratos de ácidos grasos específicos 100 µM como se enumeran a continuación:

- a. Ácido linoleico (LA, 18:2n-6) (la conversión en ácido α-linolénico indicaría actividad de Δ15-desaturasa y la conversión en ácido γ-linolénico indicaría actividad de Δ6-desaturasa).
- 30 b. Ácido α-linolénico (ALA, 18:3n-3) (la conversión en ácido estearidónico indicaría actividad de Δ6-desaturasa).
- c. Ácido ω6-eicosadienoico (EDA, 20:2n-6) (la conversión en ácido dihomo-γ-linolénico indicaría actividad de Δ8-desaturasa).
- d. Ácido dihomo-γ-linolénico (DGLA, 20:3n-6) (la conversión en ácido araquidónico indicaría actividad de Δ5-desaturasa).

35 El sustrato para clones pRAT-2 era 100 µM de DGLA. Se usó *S. cerevisiae* 334 que contenía el vector pYX242 inalterado como control negativo. Tanto pRAT-1a como pRAT-2c se cotransformaron también en *S. cerevisiae* 334 con pRAE-73-A3 (es decir, un vector que contenía la enzima elongasa humana que convierte ácidos grasos 18C en ácidos grasos 20C, SEC ID N°: 21) (véase el Ejemplo 5). Los sustratos para los clones pRAT-1a/pRAE-73-A3 eran  
40 LA y ALA, y los sustratos para los clones pRAT-2c/pRAE-73-A3 eran LA, ALA y GLA. Los cultivos se cultivaron durante 48 horas a 24°C en medios selectivos en presencia de un sustrato particular. Los análisis de ácidos grasos se realizaron como se resume en el Ejemplo 4.

45 La Tabla 8 incluye un ejemplo de la producción de AA por la cepa 334 (pRAT-2c) frente a la de la cepa de control 334 (pYX242). La cantidad de AA producido era del 22,98% frente a ninguna cantidad detectable en la cepa de control. La cepa 334 (pRAT-2a) tampoco tenía una cantidad detectable de AA producido (no se muestran los datos). La diferencia de cuatro aminoácidos entre los dos clones (Figura 12, véase el subrayado) volvía a la enzima expresada de la cepa 334 (pRAT-2a) inactiva. La actividad de Δ5-desaturasa del clon pRAT-2c se detectó  
50 adicionalmente cuando se coexpresó con pRAE-73-A3 en presencia de GLA.

La Tabla 9 son los resultados del análisis de ácidos grasos de las cepas 334 (pRAT-1a) y 334 (pYX242) expresados en presencia de los sustratos LA, ALA, EDA y DGLA. La Δ6-desaturación de LA producirá GLA, la Δ8-desaturación de EDA producirá DGLA y la Δ5-desaturación de DGLA producirá AA. Las tres actividades se detectaron a partir de  
55 ambas cepas que contenían el gen de T7091 frente a la cepa de control. Basándose en los índices de conversión, esta enzima es una Δ6-desaturasa activa que puede comportarse como una Δ5- o Δ8-desaturasa dados los sustratos apropiados. Sin embargo, los índices de conversión de estos sustratos en sus ácidos grasos desaturados respectivos son reducidos en comparación con los sustratos para una Δ6-desaturación. La diferencia de un solo aminoácido entre los dos clones (Figura 13, véase el subrayado) no tenía efectos sobre la actividad enzimática (no se muestran los datos). Los porcentajes de conversiones se muestran en el recuadro inferior de la Tabla 9. La  
60 actividad de Δ6-desaturasa se detectó adicionalmente cuando el pRAT-1a se coexpresó con pRAE-73-A3 en presencia de LA o ALA. Los porcentajes de conversiones no se calcularon para el experimento de coexpresión, ya que es difícil determinar si la producción de los nuevos ácidos grasos se debe a la actividad de la desaturasa, o de la elongasa, o a la combinación de las dos enzimas.

65 Se exploraron dos métodos diferentes de aislamiento de un nuevo gen para identificar genes de desaturasa de *T.*

*aureum* 7091. Estos métodos condujeron al aislamiento de los genes de  $\Delta 5$ -desaturasa y  $\Delta 6$ -desaturasa de T7091. En presencia de estos genes y de los sustratos apropiados, *S. cerevisiae* producía ácidos grasos desaturados a un nivel mucho mayor que la cepa de control. La cotransformación de las construcciones que contenían el gen de T7091B2 (pRAT-2c) y el gen de elongasa humana (pRAE-73-A3) en levaduras dio como resultado la conversión del sustrato GLA en AA. Este experimento confirmó que la enzima expresada a partir de pRAT-2c debe desaturar el DGLA (producido por la elongasa) a AA. La cotransformación de las construcciones que contenían el gen "281" (pRAT-1a) y el gen de elongasa humana (pRAE-73-A3) en levaduras dio como resultado la conversión del sustrato LA en DGLA. Este experimento confirmó que la enzima expresada a partir de pRAT-1a debe desaturar LA en GLA.

#### 10 Ejemplo 13 (comparativo)

##### Aislamiento de la secuencia de nucleótidos de $\Delta 5$ -desaturasa de *Isochrysis galbana* 1323

Se aisló un candidato a desaturasa parcial usando la combinación de cebadores degenerados de RO834/RO838 enumerada en el Ejemplo 1. El ADN genómico se preparó a partir de *Isochrysis galbana* CCMP1323 (Provasoli-Guillard National Center for the Culture of Marine Phytoplankton (CCMP), West Boothbay Harbor, MA) usando el kit DNeasy plant maxi (Qiagen, Valencia, CA). El ADNg de *I. galbana* se amplificó con los cebadores R0834 (5'-GTB TAY GAY GTB ACC GAR TGG GTB AAG CGY CAY CCB GGH GGH-3') (SEC ID N°: 1) y RO838 (5'-CAT GGT VGG RAA SAG RTG RTG YTC RAT CTG RTA GTT-3') (SEC ID N°: 10). La PCR se llevó a cabo en un volumen de 50  $\mu$ l que contenía: 1  $\mu$ l de ADNg de *I. galbana* aislado, mezcla de dNTP 0,2  $\mu$ M, 50 pM de cada cebador, 5  $\mu$ l de tampón 10 X, 1,5  $\mu$ l de MgSO<sub>4</sub> 50 mM y 0,5 U de ADN Polimerasa Taq. Las condiciones de termociclador en Perkin Elmer 9600 eran las siguientes: 94°C durante 3 min, después 30 ciclos de 95°C durante 45 s, 55°C durante 30 s y 68°C durante 2 min. La mezcla amplificada por PCR se procesó en un gel de agarosa al 1,0%, y un fragmento amplificado de aproximadamente 1,1 Kb se purificó en gel usando el Kit de Extracción en Gel Qiaquick (Qiagen, Valencia, CA). Los extremos escalonados del fragmento se rellenaron usando una ADN Polimerasa T4 (LifeTechnologies, Rockville, MD), el fragmento aislado se clonó en el vector PCR-Blunt (Invitrogen, Co., Carlsbad, CA) y los plásmidos recombinantes se transformaron en células supercompetentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Se prepararon seis clones y se secuenciaron usando un Secuenciador de ADN ABI 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todas las secuencias eran iguales. La secuencia traducida del fragmento aislado tenía una identidad del 47,5% en 335 aminoácidos con la  $\Delta 5$ -desaturasa de *T. aureum* (ATCC 34303) en el clon pRTA4 (Ejemplo 6) y una identidad del 45,3% en 278 aminoácidos con una  $\Delta 5$ -desaturasa de *T. aureum* BICC7091 en el clon pRAT-2c (Ejemplo 9).

Para aislar los extremos 5' y 3', se diseñaron nuevos cebadores basándose en la secuencia interna del fragmento de *I. galbana* aislado. Para el extremo 5' se usó RO1235 (5'-CGA AGTTGG TGA AGATGT AGG TGC CG-3') (SEC ID N°: 43), mientras que se usó RO1232 (5'-GAG CGA CGC GTA CAA CAA CTT TCA CGT-3') (SEC ID N°: 44) para el extremo 3' del gen. Se usaron aproximadamente 1,4  $\mu$ g de ARN total, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con la amplificación rápida de extremos de ADNc o RACE con el kit GeneRacer™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y la enzima Superscript II™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) para la transcripción inversa para producir la diana de ADNc. Para la amplificación inicial de los extremos, se usó el protocolo de termociclado siguiente en un Perkin Elmer 9600: fusión inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 5 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos; 10 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 70°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos; y 20 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos; seguidos de una extensión de 72°C durante 10 minutos. Esta primera reacción de PCR se realizó con 10 pMol de RO1235 o RO1232 y cebador 5' prima GeneRacer™ (5'-CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA-3') (SEC ID N°: 45) o cebador 3' prima GeneRacer™ (5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G-3') (SEC ID N°: 46), respectivamente con 1  $\mu$ l de Thermozyne™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 1  $\mu$ l de ADNc en un volumen final de 50  $\mu$ l de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se realizó una reacción anidada con 2  $\mu$ l de la reacción inicial, 10 pMol de cebador anidado RO1234 (5'-AGC TCC AGG TGA TTG TGC ACG CGC AG-3') (SEC ID N°: 47) o RO1233 (5'-GAC TTT GAG AAG CTG CGC CTC GAG CTG-3') (SEC ID N°: 48) y 30 pMol del cebador 5' prima anidado GeneRacer™ (5'-GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA-3') (SEC ID N°: 49) y del cebador 3' prima anidado GeneRacer™ (5'-CGC TAC GTA ACG GCA TGA CAG TG-3') (SEC ID N°: 50) respectivamente, y Platinum Taq™ PCRx (Clontech, Palo Alto, CA) usando MgSO<sub>4</sub> de acuerdo con el protocolo del fabricante. El parámetro de termociclado era el siguiente en un Perkin Elmer 9600: fusión inicial a 94°C durante 2 minutos; seguida de 5 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos; 5 ciclos de 94°C 30 segundos, 70°C durante 2 minutos; 20 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos; seguidos de una extensión de 68°C durante 10 minutos. El análisis en gel de agarosa de los productos de PCR mostró una banda de aproximadamente 800 pares de bases para las reacciones 5' prima y aproximadamente una banda de 1,2 kilobases para la reacción 3' prima. La posterior clonación en pCR Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA), la transformación en células competentes Top10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y la secuenciación pusieron de manifiesto una fase de lectura abierta con codones tanto de inicio como de terminación.

Los cebadores RO1309 (5'-ATG ATG GAA TTC ATG GTG GCA GGC AAA TCA GGC GC-3') (SEC ID N°: 51) y RO1310 (5'-AAT AAT GTC GAC CTA GTG CGT GTG CTC GTG GTA GG-3') (SEC ID N°: 52) con sitios de restricción añadidos para la clonación (véanse *EcoRI* y *SaI* subrayados, respectivamente) se usaron para aislar un gen de longitud completa.

5 Como se ha mostrado anteriormente, se usaron 10 pmol de los cebadores RO1309 y 1310 con Platinum Taq™ PCRx (Clontech, Palo Alto, CA) usando MgSO<sub>4</sub> de acuerdo con el protocolo del fabricante, con 2 µl del ADNc como diana. Los parámetros de termociclado eran los siguientes: fusión inicial a 94°C durante 2 minutos; seguida de 5 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos; 5 ciclos de 94°C 30 segundos, 70°C durante 2 minutos; 20 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos; seguidos de una extensión de 68°C durante 10 minutos. El único producto de la reacción se purificó en gel usando el kit de purificación en gel QiaQuick (Qiagen, Valencia, CA), se cortó con *EcoRI* y *SaI*, se ligó con ADN linealizado con *EcoRI/XhoI* de pYX242 con el kit de ligación rápida (Roche, Indianápolis, IN) y se denominó pRIG-1. El clon pRIG-1 contenía un gen de longitud completa de 1329 pb (SEC ID N°: 34; Figura 14) y una fase de lectura abierta de 442 aminoácidos (SEC ID N°: 35; Figura 15). (El plásmido pRIG-1 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 en enero de 2002 bajo los términos del Tratado de Budapest, y se acordó el número de depósito de la ATCC \_).

#### 20 Ejemplo 13 (comparativo)

##### Expresión del gen de desaturasa de *I. galbana* en levadura de panadería

25 El clon pRIG-1 que contenía el gen de longitud completa se transformó en el hospedador de levadura *S. cerevisiae* 334 y se sembró en placas en medios selectivos como se ha descrito en el Ejemplo 4. Los cultivos se cultivaron a 24°C durante 48 horas en medios mínimos que carecían de leucina, con 50 µM de ácido graso libre exógeno añadido como sustrato como se muestra en la Tabla 10. La conversión de los sustratos era de ETA (20:4n-3) en EPA (20:5n-3) y de DGLA (20:3n-6) en AA (20:4n-6). La conversión del 45,4% en ARA y la conversión del 59,75% en EPA indican que este gen codifica una Δ5-desaturasa. La Tabla 10 muestra algunos de los ácidos grasos como porcentaje del lípido extraído del hospedador de levadura. Para la actividad de Δ5-desaturasa, había escaso o ningún fondo (detección de ARA o EPA observada en el control negativo que contenía el plásmido de expresión en levadura, pYX242.)

#### 30 Ejemplo 14 (comparativo)

##### 35 Coexpresión del gen de desaturasa de *I. galbana* con elongasas

40 El plásmido pRIG-1 podía cotransformarse con una enzima adicional en la ruta de PUFA, tal como pRAE-73-A3, que contiene el gen de elongasa humana en el vector de expresión de levadura pYES2, como se describe en el Ejemplo 4, y los cotransformantes seleccionarse en medios mínimos que carecían de leucina y uracilo. Podían añadirse sustratos tales como DGLA o ETA de modo que la Δ5-desaturasa produciría activamente ARA o EPA, a los que la elongasa es capaz de añadir dos carbonos para producir ADA o ω-3-DPA. Por lo tanto, la Δ5-desaturasa de *I. galbana* podía producir un producto en un sistema de expresión heterólogo que puede usarse mediante una enzima heteróloga adicional en la ruta biosintética de PUFA para producir el PUFA esperado.

45 Las composiciones nutricionales siguientes no forman parte de la invención reivindicada y se describen por razones comparativas.

##### Composiciones nutricionales

50 Los PUFA descritos en la Descripción Detallada pueden utilizarse en diversos complementos nutricionales, formulaciones para lactantes, sustitutos nutricionales y otras soluciones nutricionales.

#### I. FORMULACIONES PARA LACTANTES

##### 55 A. Leche maternizada de soja con hierro Isomil®:

Uso: Como bebida para lactantes, niños y adultos con una alergia o sensibilidad a la leche de vaca. Una alimentación para pacientes con trastornos para los que debería evitarse la lactosa: deficiencia de lactasa, intolerancia a la lactosa y galactosemia.

60 Características:

- Aislado de proteína de soja para evitar síntomas de alergia o sensibilidad a proteínas de la leche de vaca.
- Formulación sin lactosa para evitar la diarrea asociada a la lactosa.
- 65 - Baja osmolaridad (240 mOs/kg agua) para reducir el riesgo de diarrea osmótica.

- Carbohidratos dobles (jarabe de maíz y sacarosa) diseñados para aumentar la absorción de carbohidratos y reducir el riesgo de superar la capacidad de absorción del intestino dañado.
  - 1,8 mg de hierro (como sulfato ferroso) por 100 calorías para ayudar a prevenir la deficiencia de hierro.
  - Niveles recomendados de vitaminas y minerales.
- 5
- Aceites vegetales para proporcionar los niveles recomendados de ácidos grasos esenciales.
  - Color blanco de leche, consistencia de tipo leche y aroma agradable.

Ingredientes: (Pareve) agua al 85%, jarabe de maíz al 4,9%, azúcar al 2,6% (sacarosa), aceite de soja al 2,1%, aislado de proteína de soja al 1,9%, aceite de coco al 1,4%, citrato de calcio al 0,15%, fosfato de calcio tribásico al 0,11%, citrato de potasio, fosfato de potasio monobásico, cloruro de potasio, mono- y diglicéridos, lecitina de soja, carragenina, ácido ascórbico, L-metionina, cloruro de magnesio, fosfato potásico dibásico, cloruro sódico, 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, clorhidrato de cloruro de tiamina, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenito sódico, vitamina D3 y cianocobalamina.

B. Leche maternizada de soja para diarrea Isomil® DF:

Uso: Como alimentación a corto plazo para la gestión dietética de la diarrea en lactantes y niños pequeños que empiezan a caminar.

Características:

- Primera leche maternizada que contiene fibra dietética añadida a partir de fibra de soja especialmente para la gestión de la diarrea.
- Se ha demostrado clínicamente que reduce la duración de heces sueltas acuosas durante la diarrea de leve a grave en lactantes.
- Nutricionalmente completa para satisfacer las necesidades nutricionales del lactante.
- El aislado de proteína de soja con L-metionina añadida satisface o supera las necesidades del lactante de todos los aminoácidos esenciales.
- Formulación sin lactosa para evitar la diarrea asociada a la lactosa.
- Baja osmolaridad (240 mOs/kg agua) para reducir el riesgo de diarrea osmótica.
- Carbohidratos dobles (jarabe de maíz y sacarosa) diseñados para aumentar la absorción de carbohidratos y reducir el riesgo de superar la capacidad de absorción del intestino dañado.
- Satisface o supera los niveles de vitaminas y minerales recomendados por el Committee on Nutrition of the American Academy of Pediatrics y requeridos por el Infant Formula Act.
- 1,8 mg de hierro (como sulfato ferroso) por 100 calorías para ayudar a prevenir la deficiencia de hierro.
- Aceites vegetales para proporcionar los niveles recomendados de ácidos grasos esenciales.

Ingredientes: (Pareve) agua al 86%, jarabe de maíz al 4,8%, azúcar al 2,5% (sacarosa), aceite de soja al 2,1%, aislado de proteína de soja al 2,0%, aceite de coco al 1,4%, fibra de soja al 0,77%, citrato de calcio al 0,12%, fosfato de calcio tribásico al 0,11%, citrato de potasio al 0,10%, cloruro de potasio, fosfato potásico monobásico, mono- y diglicéridos, lecitina de soja, carragenina, cloruro de magnesio, ácido ascórbico, L-metionina, fosfato de potasio dibásico, cloruro sódico, 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, clorhidrato de cloruro de tiamina, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenito sódico, vitamina D3 y cianocobalamina.

C. Leche maternizada de soja sin sacarosa con hierro Isomil® SF:

Uso: Como bebida para lactantes, niños y adultos con una alergia o sensibilidad a proteínas de la leche de vaca o una intolerancia a la sacarosa. Una alimentación para pacientes con trastornos para los que debería evitarse la lactosa y la sacarosa.

Características:

- Aislado de proteína de soja para evitar los síntomas de alergia o sensibilidad a proteínas de la 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 el paciente que no puede tolerar la sacarosa.
- Baja osmolaridad (180 mOs/kg agua) para reducir el riesgo de diarrea osmótica.
- 1,8 mg de hierro (como 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 de leche, consistencia de tipo leche y aroma agradable.

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

10 D. Leche maternizada de soja con hierro lista para tomar, 20 Cal/29,57ml (Cal/fl oz). Isomil® 20:

Uso: Cuando se desea una alimentación de soja.

15 Ingredientes: (Pareve) agua al 85%, jarabe de maíz al 4,9%, azúcar al 2,6% (sacarosa), aceite de soja al 2,1%, aislado de proteína de soja al 1,9%, aceite de coco al 1,4%, citrato de calcio al 0,15%, fosfato cálcico tribásico al 0,11%, citrato de potasio, fosfato de potasio monobásico, cloruro de potasio, mono- y diglicéridos, lecitina de soja, carragenina, ácido ascórbico, L-metionina, cloruro de magnesio, fosfato potásico dibásico, cloruro sódico, 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, clorhidrato de cloruro de tiamina, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenito sódico, vitamina D3 y cianocobalamina.

E. Leche maternizada Similac®:

25 Uso: Cuando es necesaria una leche maternizada: si se toma la decisión de interrumpir la lactancia natural antes de la edad de 1 año, si es necesario un complemento para la leche materna o como alimentación de rutina si no se ha adoptado la lactancia natural.

Características:

- 30
- Proteína de calidad y en cantidad apropiada para un buen crecimiento; desnaturizada térmicamente, lo que reduce el riesgo de pérdidas de sangre entéricas asociadas con la leche.
  - Grasa de una mezcla de aceites vegetales (doblemente homogeneizada), que proporciona ácido linoleico esencial que se absorbe fácilmente.
  - 35 - Carbohidrato como lactosa en proporción similar a la de la leche humana.
  - Baja carga renal de solutos para minimizar la agresión sobre órganos en desarrollo.
  - Formas en polvo, líquido concentrado y lista para tomar.

40 Ingredientes: (-D) Agua, leche desnatada, lactosa, aceite de soja, aceite de coco, mono- y diglicéridos, lecitina de soja, ácido ascórbico, carragenina, 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, clorhidrato de cloruro de tiamina, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, filoquinona, biotina, selenito sódico, vitamina D3 y cianocobalamina.

45 F. Leche maternizada para prematuros con hierro Similac® NeoCare:

Uso: Para las necesidades nutricionales especiales de los lactantes prematuros después del alta hospitalaria. Similac NeoCare es una leche maternizada nutricionalmente completa desarrollada para proporcionar a los lactantes prematuros calorías extra, proteínas, vitaminas y minerales necesarios para promover que recuperen el ritmo de crecimiento atrasado y mantener el desarrollo.

Características:

- 55
- Reduce la necesidad de complementación calórica y vitamínica. Más calorías (22 Cal/29,57ml (Cal/fl oz)) que las leches maternizadas por término convencional (20 Cal/29,57ml (Cal/fl oz)).
  - Mezcla de grasa altamente absorbida con triglicéridos de cadena media (MCToil) para ayudar a satisfacer las necesidades digestivas especiales de los lactantes prematuros.
  - Mayores niveles de proteína, vitaminas y minerales por 100 calorías para prolongar el mantenimiento nutricional iniciado en el hospital.
  - 60 - Más calcio y fósforo para mejorar la mineralización ósea.

65 Ingredientes: -D sólidos de jarabe de maíz, leche desnatada, lactosa, concentrado de proteína del suero, aceite de soja, aceite de cártamo rico en 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 sódico, taurina, sulfato ferroso, m-inositol, cloruro de colina, palmitato de ascorbilo, L-carnitina, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, niacinamida, tocoferoles mixtos, citrato sódico, pantotenato de calcio,

sulfato cúprico, clorhidrato de cloruro de tiamina, palmitato de vitamina A, beta caroteno, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, filoquinona, biotina, selenito sódico, vitamina D3 y cianocobalamina.

G. Enriquecimiento de leche humana bajo en hierro listo para tomar Similac Natural Care, 24 Cal/29,57ml (Cal/fl oz):

5  
Uso: Diseñado para mezclarse con leche humana o para suministrarse alternativamente con la leche humana a lactantes de bajo peso al nacimiento.

10  
Ingredientes: -D Agua, leche desnatada, almidón de maíz hidrolizado, lactosa, aceite de coco fraccionado (triglicéridos de cadena media), concentrado de proteína del suero, aceite de soja, aceite de coco, fosfato cálcico tribásico, citrato de potasio, cloruro de magnesio, citrato sódico, ácido ascórbico, carbonato de calcio, mono- y diglicéridos, lecitina de soja, carragenina, 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, clorhidrato de cloruro de tiamina, clorhidrato de piridoxina, biotina, ácido fólico, sulfato de manganeso, filoquinona, vitamina D3, selenito sódico y cianocobalamina.

15  
Diversos PUFA de esta invención pueden sustituirse y/o añadirse a las leches maternizadas descritas anteriormente y a otras leches maternizadas conocidas por los expertos en la materia.

## 20 II. FORMULACIONES NUTRICIONALES

### A. ENSURE®

25  
Uso: ENSURE es un alimento líquido de bajo nivel de residuos diseñado principalmente como complemento nutricional oral a usar con o entre las comidas, o en cantidades apropiadas como sustituto de comidas. ENSURE carece de lactosa y de gluten y es adecuado para su uso en dietas modificadas, incluyendo dietas bajas en colesterol. Aunque principalmente es un complemento oral, puede suministrarse por tubo.

Condiciones del paciente:

- 30
- Para pacientes con dietas modificadas.
  - Para pacientes mayores con riesgo nutricional.
  - Para pacientes con pérdida de peso involuntaria.
  - Para pacientes que se recuperan de una enfermedad o cirugía.
  - Para pacientes que necesitan una dieta de bajo nivel de residuos.

35  
Ingredientes: -D Agua, Azúcar (Sacarosa), Maltodextrina (Maíz), Caseinatos de Calcio y Sodio, Aceite de Cártamo Rico en Oleico, Aislado de Proteína de Soja, Aceite de Soja, Aceite de Colza, Citrato de Potasio, Fosfato Cálcico Tribásico, Citrato Sódico, Cloruro de Magnesio, Fosfato de Magnesio Dibásico, Aroma Artificial, Cloruro Sódico, Lecitina de Soja, Cloruro de Colina, Ácido Ascórbico, Carragenina, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Goma Gelano, Niacinamida, Pantotenato Cálcico, Sulfato de Manganeso, Sulfato Cúprico, Palmitato de Vitamina A, Clorhidrato de Cloruro de Tiamina, Clorhidrato de Piridoxina, Riboflavina, Ácido Fólico, Molibdato Sódico, Cloruro de Cromo, Biotina, Yoduro de Potasio, Selenato Sódico.

### 45 B. BARRITAS ENSURE®:

Uso: Las BARRITAS ENSURE son una nutrición completa equilibrada para uso complementario entre o con las comidas. Proporcionan una alternativa deliciosa rica en nutrientes a otros aperitivos. Las BARRITAS ENSURE contienen <1 g de lactosa/barrita y el sabor Chocolate Fudge Brownie carece de gluten (el sabor Honey Graham Crunch sí contiene gluten).

50  
Condiciones del paciente:

- 55
- Para pacientes que necesitan calorías extra, proteína, vitaminas y minerales.
  - Especialmente útil para personas que no toman suficientes calorías y nutrientes.
  - Para personas que tienen la capacidad de masticar y tragar.
  - No debe usarse por nadie con alergia al cacahuete o cualquier tipo de alergia a frutos secos.

60  
Ingredientes: Honey Graham Crunch -- Jarabe de Maíz de Alto Contenido en Fructosa, Aislado de Proteína de Soja, Azúcar Moreno, Miel, Maltodextrina (Maíz), Arroz Crujiente (Arroz Molido, Azúcar [Sacarosa], Sal [Cloruro Sódico] y Malta), Salvado de Avena, Aceites de Soja y Semilla de Algodón Parcialmente Hidrogenados, Polisacárido de Soja, Glicerina, Concentrado de Proteína del Suero, Polidextrosa, Fructosa, Caseinato de Calcio, Polvo de Cacao, Aromas Artificiales, Aceite de Colza, Aceite de Cártamo Rico en Oleico, Leche en Polvo Desnatada, Suero en Polvo, Lecitina de Soja y Aceite de Maíz. Fabricado en una instalación que procesa frutos secos.

65  
Vitaminas y Minerales: Fosfato Cálcico Tribásico, Fosfato de Potasio Dibásico, Óxido de Magnesio, Sal (Cloruro Sódico), Cloruro de Potasio, Ácido Ascórbico, Ortofosfato Férrico, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Niacinamida, Óxido de

## ES 2 377 198 T3

Cinc, Pantotenato Cálcico, Gluconato de Cobre, Sulfato de Manganeso, Riboflavina, Beta Caroteno, Clorhidrato de Piridoxina, Mononitrato de Tiamina, Ácido Fólico, Biotina, Cloruro de Cromo, Yoduro de Potasio, Selenato Sódico, Molibdato Sódico, Filoquinona, Vitamina D3 y Cianocobalamina.

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

Aislado de proteína de soja	74%
Proteínas de la leche	26%

- 10 Grasa: Honey Graham Crunch - La fuente de grasa es una mezcla de aceites de soja y semilla de algodón parcialmente hidrogenados, colza, cártamo rico en oleico y lecitina de soja.

Aceite de de soja y semilla de algodón parcialmente hidrogenado	76%
Aceite de colza	8%
Aceite de cártamo rico en oleico	8%
Aceite de maíz	4%
Lecitina de soja	4%

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

Jarabe de maíz de alto contenido en fructosa,	24%
Azúcar moreno	21%
Maltodextrina	12%
Miel	11%
Arroz crujiente	9%
Glicerina	9%
Polisacárido de soja	7%
Salvado de avena	7%

### C. ENSURE® ALTO CONTENIDO EN PROTEÍNA:

- 20  
25
- Uso: ENSURE ALTO CONTENIDO EN PROTEÍNA es un alimento líquido concentrado de alto contenido en proteína diseñado para personas que requieren calorías, proteínas, vitaminas y minerales adicionales en sus dietas. Puede usarse como complemento nutricional oral con o entre las comidas, o en cantidades apropiadas como sustituto de comidas. ENSURE ALTO CONTENIDO EN PROTEÍNA carece de lactosa y de gluten y es adecuado para su uso por personas que se recuperan de una cirugía general o de fracturas de cadera, o por pacientes en riesgo de úlceras de decúbito.

Condiciones del paciente:

- 30
- Para pacientes que requieren calorías, proteínas, vitaminas y minerales adicionales, tales como pacientes que se recuperan de una cirugía general o de fracturas de cadera, pacientes en riesgo de úlceras de decúbito y pacientes con dietas bajas en colesterol.

Características:

- 35  
40
- Bajo contenido en grasas saturadas.
  - Contiene 6 g de grasa total y <5 mg de colesterol por ración.
  - Sabor rico y cremoso.
  - Excelente fuente de proteína, calcio y otras vitaminas y minerales esenciales.
  - Para dietas bajas en colesterol.
  - Sin lactosa, fácil de digerir.

## ES 2 377 198 T3

### Ingredientes:

5 Vanilla Supreme: -D Agua, Azúcar (Sacarosa), Maltodextrina (Maíz), Caseinatos de Calcio y Sodio, Aceite de  
Cártamo Rico en Oleico, Aislado de Proteína de Soja, Aceite de Soja, Aceite de Colza, Citrato de Potasio, Fosfato  
Cálcico Tribásico, Citrato Sódico, Cloruro de Magnesio, Fosfato de Magnesio Dibásico, Aroma Artificial, Cloruro  
10 Sódico, Lecitina de Soja, Cloruro de Colina, Ácido Ascórbico, Carragenina, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato  
de Alfa-Tocoferilo, Goma Gelano, Niacinamida, Pantotenato de Calcio, Sulfato de Manganeso, Sulfato Cúprico,  
Palmitato de Vitamina A, Clorhidrato de Cloruro de Tiamina, Clorhidrato de Piridoxina, Riboflavina, Ácido Fólico,  
Molibdato Sódico, Cloruro de Cromo, Biotina, Yoduro de Potasio, Selenato Sódico, Filoquinona, Vitamina D3 y  
Cianocobalamina.

### Proteína:

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

Caseinatos de sodio y calcio	85%
Aislado de proteína de soja	15%

### Grasa:

20 La fuente de grasa es una mezcla de tres aceites: cártamo rico en oleico, colza y soja.

Aceite de cártamo rico en oleico	40%
Aceite de colza	30%
Aceite de soja	30%

25 El nivel de grasa en ENSURE ALTO CONTENIDO EN PROTEÍNA cumple las directrices de la Asociación Americana  
del Corazón (AHA). Los 6 gramos de grasa en ENSURE ALTO CONTENIDO EN PROTEÍNA representan el 24% de  
las calorías totales, siendo el 2,6% de la grasa de ácidos grasos saturados y el 7,9% de ácidos grasos  
poliinsaturados. Estos valores están dentro de las directrices de la AHA de <30% de las calorías totales de la grasa,  
<10% de las calorías de ácidos grasos saturados y <10% de las calorías totales de ácidos grasos poliinsaturados.

### Carbohidratos:

30 ENSURE ALTO CONTENIDO EN PROTEÍNA contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El dulzor  
moderado y la diversidad de sabores (Vanilla supreme, Chocolate royal, Wild berry y Banana), más VARI-  
FLAVORS® Flavor Pacs en pacana, cereza, fresa, limón y naranja, ayuda a prevenir el cansancio del sabor y  
contribuye a la conformidad del paciente.

35 Sabores de vainilla y otros distintos del chocolate:

Sacarosa	60%
Maltodextrina	40%

### Chocolate:

Sacarosa	70%
Maltodextrina	30%

## 40 D. ENSURE® LIGHT

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

### Condiciones del paciente:

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

## ES 2 377 198 T3

### Características:

- Bajo en grasa y grasas saturadas.
- Contiene 3 g de grasa total por ración y <5 mg de colesterol.
- 5 - Sabor rico y cremoso.
- Excelente fuente de calcio y otras vitaminas y minerales esenciales.
- Para dietas bajas en colesterol.
- Sin lactosa, fácil de digerir.

### 10 Ingredientes:

French Vanilla: -D Agua, Maltodextrina (Maíz), Azúcar (Sacarosa), Caseinato de Calcio, Aceite de Cártamo Rico en Oleico, Aceite de Colza, Cloruro de Magnesio, Citrato Sódico, Citrato de Potasio, Fosfato Potásico Dibásico, Fosfato de Magnesio Dibásico, Aroma Natural y Artificial, Fosfato de Calcio Tribásico, Gel de Celulosa, Cloruro de Colina, 15 Lecitina de Soja, Carragenina, Sal (Cloruro Sódico), Ácido Ascórbico, Goma de Celulosa, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Sulfato de Cinc, Niacinamida, Sulfato de Manganeso, Pantotenato de Calcio, Sulfato Cúprico, Clorhidrato de Cloruro de Tiamina, Palmitato de Vitamina A, Clorhidrato de Piridoxina, Riboflavina, Cloruro de Cromo, Ácido Fólico, Molibdato Sódico, Biotina, Yoduro de Potasio, Selenato Sódico, Filoquinona, Vitamina D3 y Cianocobalamina.

20

### Proteínas:

La fuente de proteínas es el caseinato de calcio.

Caseinato de calcio 100%

25

### Grasa:

La fuente de grasa es una mezcla de dos aceites: cártamo rico en oleico y colza.

Aceite de cártamo rico en oleico 70%

Aceite de colza 30%

30

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

35

### Carbohidratos:

ENSURE LIGHT contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El sabor chocolate contiene jarabe de maíz también. El dulzor moderado y la diversidad de sabores (French vanilla, Chocolate supreme, Strawberry swirl) más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pacana, cereza, fresa, limón y naranja, ayudan a prevenir el cansancio del sabor y contribuyen a la conformidad del paciente.

40

Sabores de vainilla y otros distintos del chocolate:

45

Sacarosa 51%

Maltodextrina 49%

### Chocolate:

Sacarosa 47,0%

Jarabe de maíz 26,5%

Maltodextrina 26,5%

### Vitaminas y minerales:

50

Una ración de 236,59 ml (8-fl-oz) de ENSURE LIGHT proporcional al menos el 25% de las CDR para 24 vitaminas y minerales clave.

Cafeína:

El sabor chocolate contiene 2,1 mg de cafeína/236,59 ml (8 fl oz).

5 E. ENSURE PLUS®

Uso: ENSURE PLUS es un alimento líquido bajo en residuos altamente calórico para su uso cuando son necesarias calorías y nutrientes extra pero una concentración normal de proteína. Está diseñado principalmente como complemento nutricional oral a usar con o entre las comidas o, en cantidades apropiadas, como sustituto de  
10 comidas. ENSURE PLUS carece de lactosa y de gluten. Aunque es principalmente un complemento nutricional oral, puede suministrarse mediante tubo.

Condiciones del paciente:

- 15 - Para pacientes que requieren calorías y nutrientes extras, pero una concentración normal de proteína, en un volumen limitado.  
- Para pacientes que necesitan aumentar o mantener un peso sano.

Características:

- 20 - Sabor rico y cremoso  
- Buena fuente de vitaminas y minerales esenciales

Ingredientes:

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

Proteína:

35 La fuente de proteína es una mezcla de dos proteínas de alto valor biológico: caseína y soja

Caseinatos de sodio y calcio	84%
Aislado de proteína de soja	16%

Grasa:

40 La fuente de grasa es aceite de maíz

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

Carbohidratos:

45 ENSURE PLUS contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El dulzor moderado y la diversidad de sabores (vainilla, chocolate, fresa, café, mantequilla de pacana y ponche de huevo) más VARI-FLAVORS® Flavor  
50 Pacs en pacana, cereza, fresa, limón y naranja, ayudan a prevenir el cansancio del sabor y contribuyen a la conformidad del paciente.

Sabores de vainilla, fresa, mantequilla de pacana y café:

Jarabe de maíz	39%
Maltodextrina	38%
Sacarosa	23%

Sabores de chocolate y ponche de huevo:

55

## ES 2 377 198 T3

Jarabe de maíz	36%
Maltodextrina	34%
Sacarosa	30%

### Vitaminas y minerales:

- 5 Una ración de 236,59 ml (8-fl-oz) de ENSURE PLUS proporcional al menos el 15% de las CDR para 25 vitaminas y minerales clave.

### Cafeína:

- 10 El sabor chocolate contiene 3,1 mg de cafeína/236,59 ml (8 fl oz). El sabor café contiene cantidades traza de cafeína.

### F. ENSURE PLUS® HN

- 15 Uso: ENSURE PLUS HN es un alimento líquido nutricionalmente completo altamente calórico y de alto contenido en nitrógeno diseñado para personas con mayores necesidades calóricas y proteicas o una tolerancia a volumen limitada. Puede usarse para complementación oral o para un mantenimiento nutricional total mediante tubo. ENSURE PLUS HN carece de lactosa y de gluten.

### 20 Condiciones del paciente:

- Para pacientes con necesidades calóricas y proteicas aumentadas, tal como después de una cirugía o lesión.
- Para pacientes con una tolerancia a volumen limitada y saciedad temprana.

### 25 Características:

- Para nutrición complementaria o total.
  - Para suministro oral o mediante tubo.
  - 1,5 Cal/ml.
- 30
- Alto contenido en nitrógeno.
  - Calóricamente denso.

### Ingredientes:

- 35 Vainilla: -D Agua, Maltodextrina (Maíz), Caseinatos de Sodio y Calcio, Aceite de Maíz, Azúcar (Sacarosa), Aislado de Proteína de Soja, Cloruro de Magnesio, Citrato de Potasio, Fosfato Cálcico Tribásico, Lecitina de Soja, Aromas Naturales y Artificiales, Citrato Sódico, Cloruro de Colina, Ácido Ascórbico, Taurina, L-carnitina, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Niacinamida, Carragenina, Pantotenato Cálcico, Sulfato de Manganeso, Sulfato Cúprico, Clorhidrato de Cloruro de Tiamina, Clorhidrato de Piridoxina, Riboflavina, Palmitato de Vitamina A, Ácido Fólico, Biotina, Cloruro de Cromo, Molibdato Sódico, Yoduro de Potasio, Selenito Sódico, Filoquinona, Cianocobalamina y Vitamina D3.
- 40

### G. ENSURE® EN POLVO:

- 45 Uso: ENSURE EN POLVO (reconstituido con agua) es un alimento líquido bajo en residuos diseñado principalmente como complemento nutricional oral a usar con o entre las comidas. ENSURE EN POLVO carece de lactosa y gluten y es adecuado para su uso en dietas modificadas, incluyendo dietas bajas en colesterol.

### Condiciones del paciente:

- 50
- Para pacientes con dietas modificadas.
  - Para pacientes mayores en riesgo nutricional.
  - Para pacientes que se recuperan de una enfermedad/cirugía.
  - Para pacientes que necesitan una dieta baja en residuos.
- 55

### Características:

- Práctico, fácil de mezclar.
  - Bajo en grasas saturadas.
- 60
- Contiene 9 g de grasa total y <5 mg de colesterol por ración.
  - Rico en vitaminas y minerales.

## ES 2 377 198 T3

- Para dietas bajas en colesterol.
- Sin lactosa, fácil de digerir.

5 Ingredientes: -D Jarabe de Maíz, Maltodextrina (Maíz), Azúcar (Sacarosa), Aceite de Maíz, Caseinatos de Sodio y Calcio, Aislado de Proteína de Soja, Aroma Artificial, Citrato de Potasio, Cloruro de Magnesio, Citrato Sódico, Fosfato Cálcico Tribásico, Cloruro de Potasio, Lecitina de Soja, Ácido Ascórbico, Cloruro de Colina, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Niacinamida, Pantotenato Cálcico, Sulfato de Manganeso, Clorhidrato de Cloruro de Tiamina, Sulfato Cúprico, Clorhidrato de Piridoxina, Riboflavina, Palmitato de Vitamina A, Ácido Fólico, Biotina, Molibdato Sódico, Cloruro de Cromo, Yoduro de Potasio, Selenato Sódico, Filoquinona, Vitamina D3 y

10 Cianocobalamina.

### Proteína:

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

Caseinatos de sodio y calcio	84%
Aislado de proteína de soja	16%

### Grasa:

20 La fuente de grasa es aceite de maíz.

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

### Carbohidrato:

25 ENSURE EN POLVO contiene una combinación de jarabe de maíz, maltodextrina y sacarosa. El dulzor moderado de ENSURE EN POLVO más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pacana, cereza, fresa, limón y naranja ayuda a prevenir el cansancio del sabor y contribuye a la conformidad del paciente.

### Vainilla:

30

Jarabe de maíz	35%
Maltodextrina	35%
Sacarosa	30%

## H. ENSURE® PUDDING

35 Uso: ENSURE PUDDING es un complemento denso en nutrientes que proporciona una nutrición equilibrada de una forma no líquida a usar con o entre las comidas. Es apropiado para dietas de consistencia modificada (por ejemplo, blandas, en puré o totalmente líquidas) o para personas con alteraciones de la deglución. ENSURE PUDDING carece de gluten.

### Condiciones del paciente:

40

- Para pacientes con dietas de consistencia modificada (por ejemplo, blanda, en puré o totalmente líquida).
- Para pacientes con alteraciones de la deglución.

### Características:

45

- Buen sabor, rico y cremoso.
- Buena fuente de vitaminas y minerales esenciales.
- Práctico, no requiere refrigeración.
- Sin gluten.

50

Perfil de nutrientes por 141,75 g (5 oz): Calorías 250, Proteína 10,9%, Grasa Total 34,9%, Carbohidratos 54,2%.

### Ingredientes:

55 Vainilla: -D Leche Desnatada, Agua, Azúcar (Sacarosa), Aceite de Soja Parcialmente Hidrogenado, Almidón Alimenticio Modificado, Sulfato de Magnesio, Estearoil Lactilato Sódico, Fosfato Sódico Dibásico, Aroma Artificial, Ácido Ascórbico, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Cloruro de Colina, Niacinamida,

## ES 2 377 198 T3

Sulfato de Manganeso, Pantotenato Cálcico, Amarillo N° 5 FD&C, Citrato Potásico, Sulfato Cúprico, Palmitato de Vitamina A, Clorhidrato de Cloruro de Tiamina, Clorhidrato de Piridoxina, Riboflavina, Amarillo N° 6 FD&C, Ácido Fólico, Biotina, Filoquinona, Vitamina D3 y Cianocobalamina.

### 5 Proteína:

La fuente de proteína es leche desnatada.

Leche desnatada 100%

10

### Grasa:

La fuente de grasa es aceite de soja hidrogenado.

Aceite de soja hidrogenado 100%

15

### Carbohidratos:

ENSURE PUDDING contiene una combinación de sacarosa y almidón alimenticio modificado. El dulzor moderado y la diversidad de sabores (vainilla, chocolate, dulce de azúcar y tapioca) ayudan a prevenir el cansancio del sabor. El producto contiene 9,2 gramos de lactosa por ración.

20

Vainilla y otros sabores distintos del chocolate:

Sacarosa 56%

Lactosa 27%

Almidón alimenticio modificado 17%

### 25 Chocolate:

Sacarosa 58%

Lactosa 26%

Almidón alimenticio modificado 16%

## I. ENSURE® CON FIBRA:

30 Uso: ENSURE CON FIBRA es un alimento líquido nutricionalmente completo que contiene fibra diseñado para personas que pueden beneficiarse de un aumento de fibra y nutrientes en la dieta. ENSURE CON FIBRA es adecuado para personas que no requieren una dieta baja en residuos. Puede suministrarse por vía oral o mediante tubo y puede usarse como complemento nutricional de una dieta normal o, en cantidades apropiadas, como sustituto de comidas. ENSURE CON FIBRA carece de lactosa y de gluten y es adecuado para su uso en dietas modificadas, 35 incluyendo dietas bajas en colesterol.

Condiciones del paciente:

40 - Para pacientes que pueden beneficiarse de un aumento de fibra y nutrientes en la dieta.

Características:

- 45 - Nueva fórmula avanzada baja en grasa saturada con mayor contenido en vitaminas y minerales.
- Contiene 6 g de grasa total y <5 mg de colesterol por ración.
- Sabor rico y cremoso.
- Buena fuente de fibra.
- Excelente fuente de vitaminas y minerales esenciales.
- Para dietas bajas en colesterol.
- Sin lactosa ni gluten.

50

Ingredientes:

Vainilla: -D Agua, Maltodextrina (Maíz), Azúcar (Sacarosa), Caseinatos de Sodio y Calcio, Fibra de Avena, Aceite de Cártamo Rico en oleico, Aceite de Colza, Aislado de Proteína de Soja, Aceite de Maíz, Fibra de Soja, Fosfato

## ES 2 377 198 T3

5 Cálculo Tribásico, Cloruro de Magnesio, Citrato de Potasio, Gel de Celulosa, Lecitina de Soja, Fosfato Potásico Dibásico, Citrato Sódico, Aromas Naturales y Artificiales, Cloruro de Colina, Fosfato de Magnesio, Ácido Ascórbico, Goma de Celulosa, Cloruro de Potasio, Carragenina, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Sulfato de Cinc, Niacinamida, Sulfato de Manganeso, Pantotenato Cálcico, Sulfato Cúprico, Palmitato de Vitamina A, Clorhidrato de Cloruro de Tiamina, Clorhidrato de Piridoxina, Riboflavina, Ácido Fólico, Cloruro de Cromo, Biotina, Molibdato Sódico, Yoduro de Potasio, Selenato Sódico, Filoquinona, Vitamina D3 y Cianocobalamina.

### Proteína:

10 La fuente de proteína es una mezcla de dos proteínas de alto valor biológico - caseína y soja.

Caseinatos de sodio y calcio	80%
Aislado de proteína de soja	20%

### Grasa:

15 La fuente de grasa es una mezcla de tres aceites: cártamo rico en oleico, colza y maíz.

Aceite de cártamo rico en oleico	40%
Aceite de colza	40%
Aceite de maíz	20%

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

### Carbohidratos:

25 ENSURE CON FIBRA contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El dulzor moderado y la diversidad de sabores (vainilla, chocolate y mantequilla de pacana) más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pacana, cereza, fresa, limón y naranja ayudan a prevenir el cansancio del sabor y contribuyen a la conformidad del paciente.

30 Sabores de vainilla y otros distintos del chocolate:

Maltodextrina	66%
Sacarosa	25%
Fibra de avena	7%
Fibra de soja	2%

### Chocolate:

Maltodextrina	55%
Sacarosa	36%
Fibra de avena	7%
Fibra de soja	2%

35 Fibra:

40 La mezcla de fibra usada en ENSURE CON FIBRA consiste en fibra de avena y polisacárido de soja. Esta mezcla da como resultado aproximadamente 4 gramos de fibra dietética total por lata de 236,59 ml (8-fl. oz). La proporción de fibra insoluble respecto a soluble es de 95:5.

Los diversos complementos nutricionales descritos anteriormente y conocidos por otros expertos en la materia pueden sustituirse y/o complementarse con los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención.

45 J. Producto nutricional Oxepa™

Oxepa es un producto nutricional enteral de bajo contenido en carbohidratos y calóricamente denso diseñado para la gestión dietética de pacientes con o en riesgo de ARDS. Tiene una combinación única de ingredientes, incluyendo una mezcla de aceite patentada que contiene ácido eicosapentaenoico (EPA de aceite de pescado), ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA de aceite de borraja) y niveles elevados de antioxidantes.

5 Distribución calórica:

La densidad calórica es elevada a 1,5 Cal/ml (355 Cal/8 fl oz) para minimizar el volumen necesario para satisfacer las necesidades energéticas. La distribución de calorías en Oxepa se muestra en la Tabla A.

10

Tabla A. Distribución Calórica de Oxepa

	Por 236,59 ml (8 fl oz).	por litro	% de Cal
Calorías	355	1.500	---
Grasa (g)	22,2	93,7	55,2
Carbohidratos (g)	(g)	25	105,528,1
Proteína (g)	14,8	62,5	16,7
Agua (g)	186	785	---

Grasa:

15

- Oxepa contiene 22,2 g de grasa por ración de 8-fl oz (93,7 g/l).
- La fuente de grasa es una mezcla de aceites de aceite de colza al 31,8%, triglicéridos de cadena media (MCT) al 25%, aceite de borraja al 20%, aceite de pescado al 20% y lecitina de soja al 3,2%. El perfil de ácidos grasos típico del Oxepa se muestra en la Tabla B.

20

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

- Triglicéridos de cadena media (MCT) -- 25% de la mezcla de grasa -- contribuyen al vaciado gástrico debido a que se absorben por el tracto intestinal sin emulsión por los ácidos biliares.

25

Los diversos componentes de ácidos grasos del producto nutricional Oxepa™ pueden sustituirse y/o complementarse con los PUFA producidos de acuerdo con esta invención.

Tabla B. Perfil de ácidos grasos típico

Ácidos grasos	% Total	g/236,59 ml (8 fl oz)*	g/l*
Caproico (6:0)	0,2	0,04	0,18
Caprílico (8:0)	14,69	3,1	13,07
Cáprico (10:0)	11,06	2,33	9,87
Palmitico (16:0)	5,59	1,18	4,98
Palmitoleico	1,82	0,38	1,62
Esteárico	1,94	0,39	1,64
Oleico	24,44	5,16	21,75
Linoleico	16,28	3,44	14,49
$\alpha$ -Linolénico	3,47	0,73	3,09
$\gamma$ -Linolénico	4,82	1,02	4,29
Eicosapentaenoico	5,11	1,08	4,55
n-3-Docosapentaenoico	0,55	0,12	0,49
Docosahexaenoico	2,27	0,48	2,02
Otros	7,55	1,52	6,72

30

Los ácidos grasos equivalen a aproximadamente el 95% de la grasa total.

Tabla C. Perfil de grasa de Oxepa.

% de calorías totales de la grasa	55,2
Ácidos grasos poliinsaturados	31,44 g/l
Ácidos grasos monoinsaturados	25,53 g/l
Ácidos grasos saturados	32,38 g/l
Proporción de n-6 respecto a n-3	1,75:1
Colesterol	9,49 mg/236,59 ml (8 fl oz), 40,1 mg/l

Carbohidratos:

- El contenido de carbohidratos es de 25,0 g por ración de 236,59 ml (8-fl-oz) (105,5 g/l).
- 5 - Las fuentes de carbohidratos son maltodextrina al 45% (un carbohidrato complejo) y sacarosa al 55% (un azúcar sencillo), digiriéndose y absorbiéndose ambos fácilmente.
- El alto contenido en grasa y bajo contenido en carbohidratos del Oxepa está diseñado para minimizar la producción de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Altos niveles de CO<sub>2</sub> pueden complicar la retirada gradual del respirador en pacientes dependientes de respirador. El bajo nivel de carbohidratos también puede ser útil para
- 10 los pacientes que hayan desarrollado hiperglucemia inducida por estrés.
- El Oxepa carece de lactosa.

Los carbohidratos de la dieta, los aminoácidos de las proteínas y los restos glicerol de las grasas pueden convertirse en glucosa dentro del cuerpo. A lo largo de este proceso se satisfacen las necesidades de carbohidratos de los tejidos dependientes de glucosa (tales como el sistema nervioso central y los eritrocitos). Sin embargo, una dieta sin

15 carbohidratos puede conducir a cetosis, excesivo catabolismo de proteínas tisulares y pérdida de fluidos y electrolitos. Estos efectos pueden prevenirse mediante la ingestión diaria de 50 a 100 g de carbohidratos digeribles, si la ingesta calórica es adecuada. El nivel de carbohidratos en Oxepa también es suficiente para minimizar la gluconeogénesis, si se están satisfaciendo las necesidades energéticas.

20 Proteína:

- Oxepa contiene 14,8 g de proteína por ración de 236,59 ml (8-fl-oz) (62,5 g/l).
- La proporción total de calorías/nitrógeno (150:1) satisface las necesidades de pacientes estresados.
- El Oxepa proporciona suficiente proteína para promover el anabolismo y el mantenimiento de la masa corporal
- 25 magra sin precipitar problemas respiratorios. Altas ingestas de proteína son una preocupación en pacientes con insuficiencia respiratoria. Aunque la proteína tiene escasos efectos sobre la producción de CO<sub>2</sub>, una dieta rica en proteínas aumentará el impulso respiratorio.
- Las fuentes de proteína del Oxepa son caseinato sódico al 86,8% y caseinato cálcico al 13,2%.
- El perfil de aminoácidos del sistema de proteínas en Oxepa satisface o supera la norma para proteína de alta
- 30 calidad fijada por la National Academy of Sciences.

\* Oxepa carece de gluten.

**Tabla 1**

35

Expresión de desaturasa de <i>Saprolegnia diclina</i> (ATCC 56851) en levadura de panadería			
CLON	TIPO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	% CONVERSIÓN DE SUSTRATO	
pRSP1 (Δ6 desaturasa de <i>S. diclina</i> )	Δ9	0	(18:0 en 18:1n-9)*
	Δ12	0	(18:1 en 18:2n-6)
	Δ15	0	(18:2n-6 en 18:3n-3)
	Δ6	28	(18:2n-6 en 18:3n-6)
	Δ6	37	(18:3n-3 en 18:4n-3)
	Δ5	0	(20:3n-6 en 20:4n-6)
pRSP3 (Δ5 desaturasa de <i>S. diclina</i> )	Δ9	0	(18:0 en 18:1n-9)
	Δ12	0	(18:1 en 18:2n-6)
	Δ15	0	(18:2n-6 en 18:3n-3)
	Δ6	0	(18:2n-6 en 18:3n-6)
	Δ6	0	(18:3n-3 en 18:4n-3)
	Δ5	27	(20:3n-6 en 20:4n-6)

**\*por encima de la actividad endógena de Δ9**

**Tabla 2**  
Ácido graso como porcentaje del lípido total extraído de levadura

Clon	18:1* Presente	18:2 (n-3) Producido	18:2 (n-6) Incorporado	18:3 (n-3) Producido	18:3 (n-6) Producido	18:3 (n-3) Incorporado	18:4 (n-3) Producido	20:3(n-6) Incorporado	20:4 (n-6) Producido
pYX242 (control)	15,07	0	11,14	0	0	11,35	0	11,55	0
pRSP1 (Δ6)	14,41	0	6,31	0	2,44	7,95	4,63	13,70	0
pRSP3 (Δ5)	15,34	0,08	10,72	0	0	10,43	0	20,69	7,74

Añadido sustrato 50 μM  
\*18:1 es un ácido graso endógeno en levaduras

Clave:

18:1 = Ácido oleico  
 18:2 (n-6) = Ácido linoleico  
 18:3 (n-3) = Ácido α-linolénico  
 18:3 (n-6) = Ácido γ-linolénico  
 18:4 (n-3) = Ácido estearidónico  
 20:3 (n-6) = Ácido dihomo-γ-linolénico  
 20:4 (n-6) = Ácido araquidónico

**Tabla 3**  
Ácido graso como porcentaje del lípido total extraído de levadura

Clon	Plásmido en levadura (enzima)	18:2 (n-6) Incorporado	18:3 (n-6) Producido	20:3 (n-6) Producido	% de conversión	18:3 (n-3) Incorporado	18:4 (n-3) Producido	20:4 (n-3) Producido	% de conversión
Control	pYX242 + pYES2	6,46	0	0	0	13,26	0	0	0
pRSP5	pRSP1 (Δ6) + pRAE73-A3 (elongasa humana)	4,62	1,95	0,8	37,3	7,00	2,47	1,20	34,39
pRSP8	pRSP1 (Δ6) + pRPB2 (elongasa de <i>M. alpina</i> )	4,08	2,31	0,63	41	5,93	2,01	0,85	32,53

Añadido sustrato 50 μM

Clave:

18:2 (n-6) = Ácido linoleico  
 18:3 (n-3) = Ácido α-linolénico  
 18:3 (n-6) = Ácido γ-linolénico  
 18:4 (n-3) = Ácido estearidónico  
 20:3 (n-6) = Ácido dihomo-γ-linolénico  
 20:4 (n-3) = Ácido eicosatetraenoico

**% de conversión =  $\frac{[\% \text{ Producto 1} + \% \text{ Producto 2}]}{[\% \text{ sustrato} + \% \text{ Producto 1} + \% \text{ Producto 2}]}$**

**Tabla 4**  
Ácido graso como porcentaje del lípido total extraído de levadura

Clon	Plásmido en levadura (enzima)	18:3 (n-6) Incorporado	20:3 (n-6) Producido	20:4 (n-6) Producido	% de conversión	18:4 (n-3) Incorporado	20:4 (n-3) Producido	20:5 (n-3) Producido	% de conversión
Control	pYX242 + pYES2	8,17	0	0	0	5,61	0	0	0
pRSP7	pRSP3 (Δ5) + pRAE73-A3 (elongasa humana)	6,25	2,30	1,63	38,6	4,12	1,98	1,56	46,2
pRSP10	pRSP3 (Δ5) + pRPB2 (elongasa de <i>M. alpina</i> )	7,00	2,07	1,35	32,82	4,66	1,50	1,61	40,02

Añadido sustrato 50 μM

Clave:

18:3 (n-6) = Ácido γ-linolénico  
 18:4 (n-3) = Ácido estearidónico  
 20:3 (n-6) = Ácido dihomo-γ-linolénico  
 20:4 (n-6) = Ácido araquidónico  
 20:4 (n-3) = Ácido eicosatetraenoico  
 20:5 (n-3) = Ácido eicosapentanoico

**% de conversión =  $\frac{[\% \text{ Producto 1} + \% \text{ Producto 2}]}{[\% \text{ sustrato} + \% \text{ Producto 1} + \% \text{ Producto 2}]}$**

**Tabla 5 (comparativa)**

Expresión de desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) en levadura de panadería

CLON	TIPO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	% CONVERSIÓN DE SUSTRATO	
PRTA4	$\Delta 9$	0	(18:0 en 18:1n-9)*
(Δ5 desaturasa de <i>T. aureum</i> )	$\Delta 12$	0	(18:1 en 18:2n-6)
	$\Delta 15$	0	(18:2n-6 en 18:3n-3)
	$\Delta 6$	0	(18:2n-6 en 18:3n-6)
	$\Delta 6$	0	(18:3n-3 en 18:4n-3)
	$\Delta 5$	23,7	(20:3n-6 en 20:4n-6)
	$\Delta 17$	0	(20:4n-6 en 20:5n-3)
	$\Delta 19$	0	(22:4n-6 en 22:5n-3)
	$\Delta 4$	0	(22:4n-6 en 22:5n-6)
	$\Delta 4$	0	(22:5n-3 en 22:6n-3)

\*por encima de la actividad endógena de  $\Delta 9$

**Tabla 6 (comparativa)**

Ácido graso como porcentaje del lípido total extraído de levadura									
Clon	18:1* Presente	18:2 (n-3) Producido	18:2 (n-6) Incorporado	18:3 (n-6) Producido	18:3 (n-6) Producido	18:3 (n-3) Incorporado	18:4 (n-3) Producido	20:3(n-6) Incorporado	20:4 (n-6) Producido
PYX242 (control)	32,13	0	8,68	0	0	54,42	0	4,3	0
PRTA4 (Δ5)	29:67	0	11,18	0	0	9,93	0	21,94	6,84

Añadido sustrato 50 μM  
 \*18:1 es un ácido graso endógeno en levaduras

Clave:  
 18:1 = Ácido oleico  
 18:2 (n-6) = Ácido linoleico  
 18:3 (n-3) = Ácido α-linolénico  
 18:3 (n-6) = Ácido γ-linolénico  
 18:4 (n-3) = Ácido estearidónico  
 20:3 (n-6) = Ácido dihomo-γ-linolénico  
 20:4 (n-6) = Ácido araquidónico

**Tabla 7 (comparativa)**

<u>Ácido graso como porcentaje del lípido total extraído de levadura</u>				
<b>Clon</b>	<b>20:3 Incorporado</b>	<b>20:4 Producido</b>	<b>22:4 Producido</b>	<b>Conversión en productos</b>
PYX242/PYES2 (control)	41,98	0	0	0
PRTA4( $\Delta$ 5)/PRAE73-A3 (elongasa humana)	15,59	4,2	6,28	16,7
<p>Añadido sustrato 100 <math>\mu</math>M            *18:1 es un ácido graso endógeno en levaduras</p> <p>Clave:</p> <p><math>\gamma</math>-18:3 = Ácido <math>\gamma</math>-linolénico            20:3 = Ácido dihomo-<math>\gamma</math>-linolénico            20:4 = Ácido araquidónico            22:4 = Ácido adrénico</p>				

Tabla 8 Perfiles de ácidos grasos de levaduras que contienen pRAT-2c, pYX242, pRAT-2c/pRAE-73-A3 o pYX242/pYES2, cultivadas en presencia de diversos ácidos grasos.

Plásmido 100 µM	pRAT-2c DGLA	pYX242 DGLA	pRAT-2c pRAE-73 LA	pYX242 pYES2 LA	pRAT-2c pRAE-73 ALA	pYX242 pYES2 ALA	pRAT-2c pRAE-73 GLA	pYX242 pYES2 GLA
g/100 g ácido graso								
C18:2n-6			13,98	18,49				
C18:3n-6							15,97	15,1
C18:3n-3					10,27	14,14		
C18:4n-3								
C20:2n-6			0,59	0,27				
C20:3n-6	33,37	32,4					1,25	
C20:4n-6	22,98						0,83	
C20:3n-3					1,58	0,25		
C20:4n-3								
<b>% de conversión = [producto/(sustrato + producto)] x 100</b>								
elongasa			4,0%	1,4%	13,3%	1,7%		11,5%
Δ5	40,8%							39,9%



Tabla 10 (comparativa)

Ácido graso como porcentaje del lípido total extraído de levadura								
Clon	18:3n-3	18:4n-3 Producido	20:3n-6	20:4n-6 Producido	Porcentaje de conversión	20:4n-3	20:5n-3 Producido	Porcentaje de conversión
PYX242 (control)	2,65	0	72	0	0	11,36	0,38	3,2
PRIG1 (Δ5)	2,28	0	12,17	10,12	45,4	8,43	12,59	59,75
Añadido sustrato 50 μM								
Clave:								
18:3n-3 = Ácido α-linolénico								
18:4n-3 = Ácido estearidónico								
20:3n-6 = Ácido dihomo-γ-linolénico								
20:4n-6 = Ácido araquidónico								
20:4n-3 = n-3 Ácido eicosatetraenoico								
20:5n-3 = Ácido eicosapentaenoico								
<p><b>Porcentaje de conversión= <math>\frac{\text{producto}}{\text{sustrato} + \text{producto}} \times 100</math></b></p>								

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Abbott Laboratorios  
Mukerji, Pradip  
Huang, Yung-Sheng  
Das, Tapas  
Thurmond, Jennifer M.  
Pereira, Suzette L.
- 10 <120> GENES DE DESATURASA Y USOS DE LOS MISMOS  
  
<130> 6763.PC.O1
- 15 <140> No asignado todavía  
<141 > 23-01-2002  
  
<150> US no asignado todavía  
<151 > 22-01-2002
- 20 <150> US 09/769.863  
<151> 25-01-2001  
  
<160> 55
- 25 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0  
  
<210> 1  
<211> 42  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador R0834
- 35 <221> misc\_feature  
<222> (3)...(3)  
<223> b = g o c o t/u en posición 3
- 40 <221> misc\_feature  
<222> (6)...(6)  
<223> y = t/u o c en posición 6
- 45 <221> misc\_feature  
<222> (9)...(9)  
<223> y = t/u o c en posición 9
- 50 <221> misc\_feature  
<222> (12)... (12)  
<223> b = g o c o t/u en posición 12
- <221> misc\_difference  
<222> (18)...(18)  
<223> r = g o a en posición 18
- 55 <221> misc\_feature  
<222> (24)...(24)  
<223> b = g o c o t/u en posición 24
- 60 <221> misc\_feature  
<222> (30)...(30)  
<223> b = g o c o t/u en posición 30
- 65 <221> misc\_feature  
<222> (33)...(33)  
<223> y = t/u o c en posición 33

<221> misc\_feature  
 <222> (36)...(36)  
 <223> y = t/u o c en posición 36

5

<221> misc\_feature  
 <222> (39)...(39)  
 <223> h = a o c o t/u en posición 39

10

<221> misc\_feature  
 <222> (42)...(42)  
 <223> h = a o c o t/u en posición 42

15

<400> 1  
 gtbtagyag tbaccgartg ggtbaagcgy cayccbghg gh 42

<210> 2  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Cebador directo R0835

25

<221> misc\_feature  
 <222> (3)...(3)  
 <223> h = a o c o t/u en posición 3

30

<221> misc\_feature  
 <222> (6)...(6)  
 <223> y = t/u o c en posición 6

35

<221> misc\_feature  
 <222> (12)...(12)  
 <223> y = t/u o c en posición 12

40

<221> misc\_feature  
 <222> (27)...(27)  
 <223> y = t/u o c en posición 27

45

<221> misc\_feature  
 <222> (33)...(33)  
 <223> y = tu o c en posición 33

50

<221> misc\_feature  
 <222> (39)...(39)  
 <223> b = g o c o t/u en posición 39

55

<221> misc\_feature  
 <222> (41)...(41)  
 <223> y = t/u o c en posición 41

<221> misc\_feature  
 <222> (45)...(45)  
 <223> y = t/u o c en posición 45

60

<400> 2  
 gghgcytccg cyaactggtg gaagcaycag cayaactgbc ayca 45

<210> 3  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65

<220>  
 <223> Cebador inverso R0836

<221> misc\_feature  
 <222> (1)...(1)  
 <223> r = g o a en posición 1

5

<221> misc\_feature  
 <222> (4)...(4)  
 <223> r = g o a en posición 4

10

<221> misc\_feature  
 <222> (7)...(7)  
 <223> v = a o g o c en posición 7

15

<221> misc\_feature  
 <222> (13)...(13)  
 <223> r = g o a en posición 13

20

<221> misc\_feature  
 <222> (19)...(19)  
 <223> r = g o a en posición 19

25

<221> misc\_feature  
 <222> (34)...(34)  
 <223> r = g o a en posición 34

30

<221> misc\_feature  
 <222> (40)...(40)  
 <223> r = g o a en posición 40

35

<221> misc\_feature  
 <222> (43)...(43)  
 <223> d = a o g o t/u en posición 43

<400> 3  
 rtgrtgvacg ttrtgctgrt gcttcacca gttrgcggar gcdcc 45

40

<210> 4  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Cebador inverso R0838

50

<221> misc\_feature  
 <222> (6)...(6)  
 <223> r = g o a en posición 6

55

<221> misc\_feature  
 <222> (12)...(12)  
 <223> r = g o a en posición 12

60

<221> misc\_feature  
 <222> (15)...(15)  
 <223> y = t/u o c en posición 15

65

<221> misc\_feature  
 <222> (18)...(18)  
 <223> r = g o a en posición 18

<221> misc\_feature  
 <222> (21)...(21)  
 <223> r = g o a en posición 21

<221> misc\_feature  
 <222> (24)...(24)

<223> s = g o c en posición 24  
 <221> misc\_feature  
 <222> (27)...(27)  
 5 <223> r = g o a en posición 27  
 <221> misc\_feature  
 <222> (30)...(30)  
 10 <223> v = a o g o c en posición 30  
 <400> 4  
 ttgatrgtct arctygrtgt rgasaarggv tggtag 36  
 <210> 5  
 15 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Cebador R0753  
 <221> misc\_feature  
 <222> (10)...(10)  
 25 <223> n = a o g o c o t/u, desconocido u otro en posición 10  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)...(13)  
 <223> r = g o a en posición 13  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> (16)...(16)  
 <223> n = a o g o c o t/u, desconocido u otro en posición 16  
 35 <221> misc\_feature  
 <222> (18)...(19)  
 <223> r = g o a en posiciones 18-19  
 <221> misc\_feature  
 <222> (22)...(22)  
 40 <223> r = g o a en posición 22  
 <400> 5  
 catcatcatn ggraanarrt grtg 24  
 45 <210> 6  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Cebador R0754  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)...(15)  
 55 <223> y = t/u o c en posición 15  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)...(18)  
 <223> y = t/u o c en posición 19  
 60 <221> misc\_feature  
 <222> (21)...(21)  
 <223> n = a o g o c o t/u, desconocido u otro en posición 21  
 65 <221> misc\_feature

<222> (24)...(24)  
 <223> y = t/u o c en posición 24

5 <221> misc\_feature  
 <222> (27)...(27)  
 <223> n = a o g o c o t/u, desconocido u otro en posición 27

10 <221> misc\_feature  
 <222> (30)...(30)  
 <223> y = t/u o c en posición 30

<400> 6  
 ctactactac tacaycayac ntayacnaay 30

15 <210> 7  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador R0923

<400> 7  
 cggtgcagtg gtggaagaac aagcacaac 29

25 <210> 8  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador RO899

<400> 8  
 35 agcggataac aatttcacac aggaaacagc 30

<210> 9  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador R0939

<400> 9  
 45 cgtagtactg ctcgaggagc ttgagcgccg 30

<210> 10  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador R0898

<400> 10  
 55 cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca g 31

<210> 11  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial

ES 2 377 198 T3

<220>  
<223> Cebador RO951

5 <400> 11  
tcaacagaat tcatggtcca ggggcaaaag gccgagaaga tctcg 45

<210> 12  
<211> 47  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador R0960  
15 <400> 12  
atacgtgaagc ttttcatgag cgggaaactc cttgaagaac tcgatcg 47

<210> 13  
<211> 1362  
20 <212> ADN  
<213> Saprolegnia diclina

<400> 13

```

atggtccagg ggcaaaaggc cgagaagatc tcgtgggcca ccatccgtga gcacaaccgc 60
caagacaacg cgtggatcgt gatccaccac aaggtgtacg acatctcggc ctttgaggac 120
caccocggcg gcgtcgtcat gtteacgcag gcocggcgaag acgcgaccga tgcgttcgct 180
gtcttccacc cgagctcggc gctcaagctc ctcgagcagt actacgtcgg cgacgtcgcac 240
cagtcgacgg cggccgtcga cacgtcgatc tcggacgagg tcaagaagag ccagtcggac 300
ttcattgcgt cgtaccgcaa gctgcgcctt gaagtcaagc gcctcggctt gtacgactcg 360
agcaagctct actaccteta caagtgcgcc tcgacgctga gcattgcgct tgtgtcggcg 420
gccatttgcc tccactttga ctogacggcc atgtacatgg tcgcggctgt catccttggc 480
ctcttttacc agcagtgcgg ctggctcggc catgactttc tgcaccacca agtgtttgag 540
aaccacttgt ttggcgacct cgtcggcgctc atggtcggca acctctggca ggccttctcg 600
gtgcagtggt ggaagaacaa gcacaacacg caccatgcga tccccaaact ccacgcgacg 660
cccagatcgc ccttccacgg cgaccoggac attgacacga tgccgattct cgcgtggtcg 720
ctcaagatgg cgcagcacgc ggtogactcg cccgtcgggc tcttcttcat gogctaccaa 780
gcgtacctgt actttcccat cttgctcttt gcgcgtatct cgtgggtgat ccagtcggcc 840
atgtacgcct tctacaacgt tgggcccggc ggcaccttg acaaggtcca gtaccgcgtg 900
ctcgagcgcg ccggcctcct cctotactac ggctggaacc tcggccttgt gtacgcagcc 960
aacatgtcgc tgcctcaagc ggctgcgctc ctcttttga gccaggcgctc gtgcggcctc 1020
ttcctcgcga tggctctttag cgtcggccac aacggcatgg aggtctttga caaggacagc 1080
aagcccgatt tttggaagct gcaagtgcct tcgaocgcga acgtgacgct gtcgctctgg 1140
atcgactggt tcatgggagg cctcaactac cagatcgacc accacttgtt cccgatggtg 1200
ccccggcaca acctcccggc gctcaacgtg ctcgtcaagt cgctctgcaa gcagtacgac 1260
atccataacc acgagacggg cttoatcgcg ggcatggccg aggtcgtcgt gcacctcgag 1320
cgcactctga tcgagttctt caaggagttt cccgccatgt aa 1362

```

25 <210> 14  
<211> 453  
<212> PRT  
30 <213> Saprolegnia diclina

<400> 14

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

ES 2 377 198 T3

<210> 15  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
5  
<220>  
<223> Cebador R0851  
<400> 15  
10 ccatcaagac gtacctgcg atc 23  
<210> 16  
<211> 28  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador RO941  
20 <400> 16  
gctgaacggg tggtagagt cgaacgtg 28  
<210> 17  
<211> 42  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador R0953  
30 <400> 17  
acgagagaat tcatggcccc gcagacggag ctcccagc gc 42  
<210> 18  
<211> 46  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
40 <223> Cebador R0956  
<400> 18  
aaaagactcg agttagccca tgtggatcgt ggcggcgatg ccctgc 46  
45 <210> 19  
<211> 1413  
<212> ADN  
<213> Saprolegnia diclina  
50 <400> 19

ES 2 377 198 T3

```

atggccccgc agacggagct ccgccagcgc cagccgcgcg tcgccgagac gccggtggcc 60
ggcaagaagg cctttacatg gcaggaggtc ggcagcaca acacggcggc ctoggcctgg 120
atcattatcc gcggcaaggt ctacgacgtg accgagtggg ccaacaagca ccccgcggc 180
cgcgagatgg tgctgctgca cgcgggtcgc gaggccaccg acaegttcga ctcgtaccac 240
ccgttcagcg acaaggccga gtcgatcttg aacaagtatg agattggcac gttcacgggc 300
ccgtccgagt ttccgacctt caagccggac acgggcttct acaaggagtg ccgcaagcgc 360
gttggcgagt acttcaagaa gaacaacctc catccgcagg acggcttccc gggcctctgg 420
cgcgatgatgg tcgtgtttgc ggtgcgcggc ctgccttgt acggcatgca cttttcgact 480
atctttgcgc tgcagctcgc ggcgcggcg ctctttggcg tctgccaggc gctgcccgtg 540
ctccacgtoa tgcacgactc gtgcgacgog tcgtacacca acatgccgtt cttccattac 600
gtcgtcggcc gctttgccat ggactggttt gccggcggct cgatggtgtc atggtcaac 660
cagcacgtcg tgggccacca catctacacg aacgtcggg gctcggacc ggatcttccg 720
gtcaacatgg acggcgacat ccgcgcgctc gtgaaccgcc aggtgttcca gcccatgtac 780
gcattccagc acatctacct tccgcgctc tatggcgtgc ttggcctcaa gttccgcate 840
caggacttca ccgacacggt cggctcgcac acgaaccggc cgatccgcgt caaccgcac 900
gcgctctoga cgtggatggc catgatcagc tccaagtcgt tctggcctt ctaccgcgtg 960
taccttccgc ttgccgtgct ccagatgcc atcaagacgt accttgcgat cttcttcctc 1020
gccgagttg tcacgggctg gtacctcgcg ttcaacttcc aagtaagcca tgtctcgacc 1080
gagtgcggct acccatgcgg cgacgaggcc aagatggcgc tccaggacga gtgggcagtc 1140

```

```

tcgcaggtea agacgtcggc cgactacgcc catggtcgt ggatgacgac gttccttgcc 1200
ggcgcgctca actaccaggt cgtgcaccac ttgttcccc gegtgtcgca gtaccactac 1260
ccggcgatcg cgcctatcat cgtcgacgtc tgcaaggagt acaacatcaa gtacgccatc 1320
ttgccggact ttacggcggc gttcgttgcc cacttgaago acctccgcaa catgggccag 1380
cagggcatcg ccgccacgat ccacatgggc taa 1413

```

5 <210> 20  
 <211> 470  
 <212> PRT  
 <213> Saprolegnia diclina

10 <400> 20

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

ES 2 377 198 T3

<210> 21  
 <211> 914  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 21

```

atggaacatt ttgatgcac acttagtacc tatttcaagg cattgctagg ccctcgagat 60
actagagtaa aaggatggtt tcttctggac aattatatac ccacatttat ctgctctgtc 120
atatatttac taattgtatg gctgggacca aaatacatga ggaataaaca gccattctct 180
tgccggggga ttttagtggg gtataacett ggactcacac tgctgtctct gtatatgttc 240
tgtgagttag taacaggagt atgggaaggc aaatacaact tcttctgtca gggcacacgc 300
accgcaggag aatcagatat gaagattatc cgtgtcctct ggtggtacta cttctccaaa 360
ctcatagaat ttatggacac tttcttcttc atcctgcgca agaacaacca ccagatcacg 420
gtcctgcacg tctaccacca tgccctgatg ctgaacatct ggtggtttgt gatgaactgg 480
gtcccctgag gccactctta ttttggtgcc aacttaata gcttcatcca cgtcctcatg 540
tactcttact atggtttgtc gtcagtcctt tccatgcgtc catacctctg gtggaagaag 600
tacatcactc aggggcagct gcttcagttt gtgctgacaa tcatccagac cagctgctgg 660
gtcatctggc cgtgcacatt ccctcttggg tggttgattt tccagattgg atacattatt 720
tcctgattg ctctcttcaac aaacttctac attcagacct acaacaagaa aggggcctcc 780
cgaaggaaa accacctgaa ggaccaccag aatgggtccg tggctgctgt gaatggacac 840
accaacagct tttcacccct ggaaaacaat gtgaagccaa ggaagctgag gaaggattga 900
agtcaaaaga ttga
    
```

10

<210> 22  
 <211> 957  
 <212> ADN  
 <213> Mortierella alpina

15

<400> 22

```

atggagtcca ttgcgccatt cctcccatca aagatgccgc aagatctggt tatggacctt 60
gccaccgcta tgggtgtccg ggccgcgccc tatgtcgatc ctctcgaggc cgcgctgggtg 120
gccaggcccg agaagtaacat ccccacgatt gtccatcaca cgcgtgggtt cctggctcgcg 180
gtggagtccg ctttggcccc tgagctgccg ttgatgaacc cgttccacgt gctgttgatc 240
gtgctcgctt atttggtcac ggtctttgtg ggcatgcaga tcatgaagaa ctttgagcgg 300
ttcgaggcca agacgttttc gtcctgcac aacttttgtc tggctctgat cagcgcctac 360
atgtgcgggtg ggatcctgta cgaggcttat caggccaact atggactggt tgagaacgct 420
gctgatcata cettcaaggg tcttctatg gccaatgta tctggctctt ctacttctcc 480
aagatcatgg agtttgtcga caccatgatc atggtcctca agaagaacaa ccgccagatc 540
tccttcttgc acgtttacca ccacagctcc atcttcaeca tctggtgggt ggtcaccttt 600
gttgcaccca acggtgaagc ctacttctct gctgcgttga actcgttcat ccatgtgatc 660
    
```

```

atgtacggct actacttctt gtcggccttg ggettcaagc aggtgtcgtt catcaagttc 720
tacatcacgc gctcgcagat gacacagttc tgcattgatg cggctccagtc ttcttgggac 780
atgtacgcca tgaaggtcct tggccgcccc ggataccctt tcttcatcac ggctctgctt 840
tggttctaca tgtggaccat gctcggctct ttctacaact tttacagaaa gaacgccaag 900
ttggccaagc aggccaaggc cgacgctgcc aaggagaagg caaggaagtt gcagtaa 957
    
```

20

<210> 23  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Cebador R0936

<400> 23  
 gtccggcaag gcggaaaagt acctcaagag 30

ES 2 377 198 T3

<210> 24  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
5  
<220>  
<223> Cebador RO937  
<400> 24  
10 aaacctgtag acaatgtgga ggggcgtggg 30  
<210> 25  
<211> 42  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador R0972  
20 <400> 25  
atacttgaat tcattgggacg cggcggcgaa ggtcaggtga ac 42  
<210> 26  
<211> 39  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador R0949  
30 <400> 26  
cttatactcg agctaagcgg ccttgccgc cgctggcc 39  
<210> 27  
<211> 41  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador R0950  
40 <400> 27  
cttatactcg agtaaaggc tcgcgaggcg aagcgagtgg c 41  
45 <210> 28  
<211> 1320  
<212> ADN  
<213> Thraustochytrium aureum  
50 <400> 28

ES 2 377 198 T3

```

atgggaocgq gcggcgaagg tcaggtgaac agcgcgcagg tggcacaagg cgggtcggga 60
acgcgaaaga cgatcctgat cgagggcgag gtctacgat tcaccaactt taggcacccc 120
ggcgggtcga tcatcaagt tctcaccgacc gacggcaccg aggctgtgga cgcgacgaac 180
gcgtttcgcg agtttcactg cgggtcgggc aaggcggaaa agtacctcaa gagcctgcc 240
aagctcggcg cgcgagcaa gatgaagttt gacgccaagg agcaggcccg ggcgacgcg 300
atcacgcgag actacgtcaa gctgcgcgag gagatggtgg ccgaggcctt ctcaagccc 360
gcgcccctcc acattgtcta caggtttgcg gagatgcag cctgttgcg ggcctcgttc 420
tacctgtttt cgatgcgcgg aaacgtgttc gccacgctcg cggccatcgc agtcgggggc 480
atcgcgcagg gccgctgcgg ctggctcatg cagcagtgog gacacttctc gatgacggg 540
tacatcccgc ttgacgtgcg cctgcaggag ctggtgtacg gcgtggggtg ctcgatgtcg 600
gcgagctggt ggcgcgttca gcacaacaag caccacgcga ccccgagaa actcaagcac 660
gacgtogacc tcgacacct gccgctcgtt gcgttcaacg agaagatcgc cgcgaagggtg 720
cgccccggct cgttccagc caagtggctc tcggcgcagg cgtacatttt tgocccggtg 780
tctgtctcc tggttggtct cttctggacc ctgtttctgc acccgcgcca catgccgcgc 840
acgagccact ttgctgagat ggccgcgcgc gcggtgcgcg tcgtgggctg ggccggcctc 900
atgcaactcgt tcgggtacag cgggagcgac tcgttcggtc tctacatggc cacctttggc 960
tttggctgca cctacatctt caccaacttt gcggtcagcc acacgcacct cgacgtcacc 1020
gagccggacg agttcctgca ctgggtcgag tacgcgcgc tgcacacgac caacgtgtcc 1080
aacgactcgt ggttcatcac ctggtggatg tcgtacctca actttcagat cgagcaccac 1140
ctotttccgt cgtgcccca gctcaacgcc ccgcgcgtcg ccccgcgct cgcgcctc 1200
ttcgagaagc acggcatggc ttacgacgag cgcccgctacc ttaccgcgct tggcgacacg 1260
tttgccaacc tgcacgcctg gggccaaaac gcgggcccagg cggcgcccaa ggccgcttag 1320

```

<210> 29

<211> 439

5 <212> PRT

<213> *Thraustochytrium aureum*

<400> 29

ES 2 377 198 T3

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

<210> 30  
 <211> 1338

ES 2 377 198 T3

<212> ADN  
 <213> Thraustochytrium aureum

<400> 30

5

```

gaattcacca tgggtcgcgg agcacaggga gagccaagge aggccacaga gctgaagage      60
agcccaagtg agcagcgtaa ggtggtgctc attgacgggc agctgtacga tgcaaccaac      120
ttcaggcatc ctggtggctc catcatcaaa tatttgtgca cccgatggcaa ggaggtagtt      180
gatgcaaccg aagcgtacaa ggagttccac tgcagatcct cgaaggcggg caagtacctc      240
aactccctgc caaagatcga cggcccaatc aagtacaaat acgacgcaaa ggagcaggct      300
cgccatgaca aactcacgag ggagtatgta gctctccgcg aacagctcgt caaggaggga      360
tactttgacc ccagcccget ccacattatc tacagatgcy ccgagttggc agccatgttc      420
gctctctcgt tetacctttt ctcttcaag ggtaacgtca tggccactat tgotgcatc      480
gtgattgggg ggtgcgtgca gggtcgttgt ggggtggctca tgcatagaag tggccactac      540
agcatgaccg gaaacatccc tgttgacttg cgccttcaag agtttttcta cgggaattggg      600
    
```

```

tgtggcatga gcggggcttg gtggagaagc cagcacaaca agcaccacgc cccccccaa      660
aagctcaagc atgacgttga tttggacact ctctctcttg tcgcctggaa cgagaaaatt      720
gcccgtcgcy tcaagccagg tagcttccag gcaaagtggc ttcattctca gggatacatc      780
tttgcccag tctcctgcct tctcgttgtt ctcttctgga ctttgtactt gcacctcgc      840
cacatgatcc gcaccaagcg caacttcgag atattttctg tcgctctgcy ctacgtatgc      900
tggttctcgc ttcttttgag catgggctac actgtcggag agtctctggg tctctatgtg      960
cttacttttg gacttggctg tacctacatc tttacgcatt ttgctgtaag ccacaccac      1020
ttgccagtgt ccgaggagga cgagtacctg cactgggtcg agtacgctgc gctgcacacc      1080
acgaacgttg ccacgcactc gtacgttctc acctggctga tgagctacct caactttcag      1140
atcgagcacc acttgttccc ttgetgcccg cagtccgcc accctgcaat ctctctcgc      1200
gtcaagaaac ttttcgagga caatggtctg gtatacgacy cccgctcata cgtccaggcy      1260
ctcaaggata ccttcggcaa cctacacgaa gtgggcgtca acgctggcca agctgccaag      1320
agcgagtaag atctcgag                                     1338
    
```

<210> 31  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Thraustochytrium aureum

10

<400> 31

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

<210> 32  
<211> 1381

ES 2 377 198 T3

<212> ADN  
 <213> Thraustochytrium aureum

<400> 32

5

```

ccatgggccc cggcggcgag aaaagcgagg tggaccaggt gcagccacaa aagaccgagc      60
agctccagaa ggccaagtgg gaggatgttg ttgcgcatcaa tggagtcgaa tacgacgtca      120
cggactatct cagaaaacac cctggtggca gcgtgatcaa gtacgggctt gccaacaccg      180
gcgctgatgc cacgtccctc tttgaagcgt tccacatgcg ctcaaagaag gctcagatgg      240
tgctcaagtc tctccaaaag cgtgctccgg tcctcgagat ccagccaaac cagcttcag      300
aggagcagac caaggaggcg gagatgctgc gtgattttaa aaaatttgag gatgagattc      360
gccgggatgg attgatggaa ccttcctctt ggcatcgcgc ttacagatta tcagagcttg      420
taggtatgtt cacgctcggc ctctacctct tctcgttaa cactcctctg tctattgctg      480
ctgggtcctt cgtccacggg ctctttgggt cattctgtgg atggtgccag catgaggcag      540
gccacggctc ctttttttac agcctttggt ggggcaagcg tgtacaggcc atgttgatcg      600
ggtttggtct aggaacatcc ggcgacatgt ggaacatgat gcacaacaag catcatgctg      660
ccacccaaaa ggttcatcac gaccttgaca ttgacacaa cctttttgta gctttcttca      720
aactgcatc tgagaaaaac agatggaagg gcttttccaa ggcttgggct cgctttcagg      780
ctttcacgtt cattcctgtc accagcggca tgatcgatcat gctgttctgg ctgtttttc      840
tccaccctcg ccgctcgtt caaaagaaga actttgagga gggtttttgg atgctgtcga      900
gccacattgt ggcacacct ctctccacc ttgtgaccgg ctgggagagc ctcgctgcat      960
gctacctgtt tgggtattgg gcgtgcatgt ggggtgcccg tatgtatttg tttggccact     1020
tttcgctctc ccacactcat atggacattg tggaggcggc cgtgcataag aactgggtca     1080
ggtacgctgt tgaccacact gttgacatca gcccatccaa cccgctcgtg tgcggtgca     1140
tgggttacct caacatgcag accatccacc acttgtggcc tgccatgcc cagtaccacc     1200
aggtcgaggt ctacgcccgc tttgccatct tcgccaaaa acacggcctc aactaccgcg     1260
tcgtctctta ctttgaggct tggcgcctga tgctccaaaa tcttgctgac gtcggttccc     1320
actaccatga gaacggtgtc aagcgcgccc caaagaaagc caaggcgcag tagaaagcta     1380
t
    
```

<210> 33  
 <211> 456  
 <212> PRT  
 <213> Thraustochytrium aureum

10

<400> 33

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

450

455

<210> 34  
 <211> 1329

ES 2 377 198 T3

<212> ADN  
 <213> Isochrysis galbana

<400> 34

5

```

atggtggcag gcaaatcagg cgctgcgccg cacgtgactc acagctcgac attgcccgt      60
gagtaccatg gcgcgaccaa cgactcgcgc tctgaggcgg ccgacgtcac cgtctctagc      120
atcgatgctg aaaaggagat gatcatcaac ggccgcgtgt atgacgtgtc gtcatttgtg      180
aagcggcacc caggtggctc ggtgatcaag ttccagctgg gcgccgacgc gagcgacgcg      240
tacaacaact ttcacgtccg ctccaagaag gcggacaaga tgctgtatcc gctcccgtcc      300
cggccggccg aggccggcta cgcccaggac gacatctccc gcgactttga gaagctgccc      360
ctcgagctga aggaggaggg ctacttcgag cccaacctgg tgcacgtgag ctacaggtgt      420
gtggaggttc ttgocatgta ctgggctggc gtccagctca tctggtcggg gtactggttc      480
ctcggcgoga tcgtggccgg cattgcgcag ggccgctcgc gctggctcca gcatgagggt      540
ggcactact cgctcaccgg caacatcaag atcgaccggc atctgcagat ggccatctat      600
aggcttgctc gcggcatgtc gggctgctac tggcgcaacc agcaacaaca gcaccacgcc      660
acgccgcaga agctcgggac cgaccccgac ctgcagacga tgccgctggt ggccttccac      720
aagatcgtcg gcgccaaggc gcgaggcaag ggcaaggcgt ggctggcgtg gcaggcgcg      780
ctcttctttg gcgggatcat ctgctcgtc gtctctttcg gctggcagtt cgtgctccac      840
cccaaccacg cgctgcgcgt gcacaatcac ctggagctcg cgtacatggg cctgcggtac      900
gtgctgtggc acctggcctt tggccacctc gggctgctga gctcgtccc cctgtacgcc      960
ttttacgtgg ccgtggcgcg cacctacatc ttaccaact tegccgtctc gcacaccac      1020
aaggacgtcg tcccgccac caagcacatc tcgtgggcac tctactcggc caaccacacg      1080
accaactgct ccgactcgc ctttgtcaac tggtgatgg cctacctcaa ctccagatc      1140
gagcaccacc tcttcccgtc gatgccgcag tacaaccacc ccaagatcgc ccgcgggtg      1200
cgcgctctct tcgagaagca cggggtcgag tatgacgtcc ggccatacct ggagtgttt      1260
cgggtcacgt acgtcaacct gctcgccgta ggcaaccggc agcactccta ccacgagcac      1320
acgcactag
    
```

<210> 35  
 <211> 442  
 <212> PRT  
 <213> Isochrysis galbana

10

<400> 35

Met Val Ala Gly Lys Ser Gly Ala Ala Ala His Val Thr His Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Pro Arg Glu Tyr His Gly Ala Thr Asn Asp Ser Arg Ser Glu  
 20 25 30  
 Ala Ala Asp Val Thr Val Ser Ser Ile Asp Ala Glu Lys Glu Met Ile  
 35 40 45  
 Ile Asn Gly Arg Val Tyr Asp Val Ser Ser Phe Val Lys Arg His Pro  
 50 55 60  
 Gly Gly Ser Val Ile Lys Phe Gln Leu Gly Ala Asp Ala Ser Asp Ala  
 65 70 75 80  
 Tyr Asn Asn Phe His Val Arg Ser Lys Lys Ala Asp Lys Met Leu Tyr  
 85 90 95  
 Ser Leu Pro Ser Arg Pro Ala Glu Ala Gly Tyr Ala Gln Asp Asp Ile  
 100 105 110  
 Ser Arg Asp Phe Glu Lys Leu Arg Leu Glu Leu Lys Glu Glu Gly Tyr  
 115 120 125  
 Phe Glu Pro Asn Leu Val His Val Ser Tyr Arg Cys Val Glu Val Leu  
 130 135 140  
 Ala Met Tyr Trp Ala Gly Val Gln Leu Ile Trp Ser Gly Tyr Trp Phe

145 150 155 160  
 Leu Gly Ala Ile Val Ala Gly Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Leu  
 165 170 175  
 Gln His Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Asn Ile Lys Ile Asp  
 180 185 190  
 Arg His Leu Gln Met Ala Ile Tyr Gly Leu Gly Cys Gly Met Ser Gly  
 195 200 205  
 Cys Tyr Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys  
 210 215 220  
 Leu Gly Thr Asp Pro Asp Leu Gln Thr Met Pro Leu Val Ala Phe His  
 225 230 235 240  
 Lys Ile Val Gly Ala Lys Ala Arg Gly Lys Gly Lys Ala Trp Leu Ala  
 245 250 255  
 Trp Gln Ala Pro Leu Phe Phe Gly Gly Ile Ile Cys Ser Leu Val Ser  
 260 265 270  
 Phe Gly Trp Gln Phe Val Leu His Pro Asn His Ala Leu Arg Val His  
 275 280 285  
 Asn His Leu Glu Leu Ala Tyr Met Gly Leu Arg Tyr Val Leu Trp His  
 290 295 300  
 Leu Ala Phe Gly His Leu Gly Leu Leu Ser Ser Leu Arg Leu Tyr Ala  
 305 310 315 320  
 Phe Tyr Val Ala Val Gly Gly Thr Tyr Ile Phe Thr Asn Phe Ala Val  
 325 330 335  
 Ser His Thr His Lys Asp Val Val Pro Pro Thr Lys His Ile Ser Trp  
 340 345 350  
 Ala Leu Tyr Ser Ala Asn His Thr Thr Asn Cys Ser Asp Ser Pro Phe  
 355 360 365  
 Val Asn Trp Trp Met Ala Tyr Leu Asn Phe Gln Ile Glu His His Leu  
 370 375 380  
 Phe Pro Ser Met Pro Gln Tyr Asn His Pro Lys Ile Ala Pro Arg Val  
 385 390 395 400  
 Arg Ala Leu Phe Glu Lys His Gly Val Glu Tyr Asp Val Arg Pro Tyr  
 405 410 415  
 Leu Glu Cys Phe Arg Val Thr Tyr Val Asn Leu Leu Ala Val Gly Asn  
 420 425 430  
 Pro Glu His Ser Tyr His Glu His Thr His  
 435 440

<211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Cebador R0838

<221> misc\_feature  
 <222> (7)...(7)  
 10 <223> v = a o g o c en posición 7

<221> misc\_feature  
 <222> (10)...(10)  
 15 <223> r = g o a en posición 10

<221> misc\_feature  
 <222> (13)...(13)  
 <223> s = g o c en posición 13

20 <221> misc\_feature  
 <222> (16)...(16)  
 <223> r = g o a en posición 16

25 <221> misc\_feature  
 <222> (19)...(19)  
 <223> r = g o a en posición 19

30 <221> misc\_feature  
 <222> (22)...(22)  
 <223> y = t/u o c en posición 22

<221> misc\_feature  
 <222> (25)...(25)  
 35 <223> r = g o a en posición 25

<221> misc\_feature  
 <222> (31)...(31)  
 <223> r = g o a en posición 31

40 <400> 36  
 catggtvggr aasagrtgrt gytcratctg rtagtt 36

45 <210> 37  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 50 <223> Cebador RO1065

<400> 37  
 cgacaagagg aagagtgcc aaatc 25

55 <210> 38  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Cebador RO1064

<400> 38  
 cgcctcaag agtitttga cggaattggg 30

<210> 39  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador R01097  
 <400> 39  
 10 cttgtaccat gggtcgcgga gcacagggag 30  
 <210> 40  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador RO1098  
 20 <400> 40  
 tgaagcttac tcgctcttg cagcttgcc 30  
 <210> 41  
 <211> 30  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador RO1107  
 30 <400> 41  
 ttaaccatg ggccgcgcg gcgagaaaag 30  
 <210> 42  
 <211> 36  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> Cebador RO1108  
 <400> 42  
 ggaagaagc ttctactgc gcctggctt tottg 36  
 45 <210> 43  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Cebador RO1235  
 <400> 43  
 55 cgaagtggg gaagatgtag gtgccg 26  
 <210> 44  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador RO1232  
 <400> 44

gagcgacgcg tacaacaact ttcacgt 27

5 <210> 45  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Cebador

<400> 45  
cgactggagc acgaggacac tga 23

15 <210> 46  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Cebador 3 prima de GeneRacer

<400> 46  
gctgtcaacg atacgctacg taacg 25

25 <210> 47  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Cebador anidado RO1234

35 <400> 47  
agctccaggt gattgtgcac gcgcag 26

40 <210> 48  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Cebador RO1233

<400> 48  
gacttgaga agctgcgcct cgagctg 27

50 <210> 49  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Cebador 5 prima anidado

<400> 49  
ggacactgac atggactgaa ggagta 26

60 <210> 50  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador 3 prima anidado

ES 2 377 198 T3

<400> 50  
 cgctacgtaa cggcatgaca gtg 23

5 <210> 51  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador RO1309

<400> 51  
 atgatggaat tcatggtggc aggcaaatca ggcgc 35

15 <210> 52  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador RO1310

<400> 52  
 aataatgtcg acctagtgcg tgtgctcgtg gtagg 35

25 <210> 53  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia peptídica de consenso

<400> 53

35 Val Tyr Asp Val Thr Glu Trp Val Lys Arg His Pro Gly Gly  
 1 5 10

<210> 54  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Secuencia peptídica de consenso

<400> 54

45 Gly Ala Ser Ala Asn Trp Trp Lys His Gln His Asn Val His His  
 1 5 10 15

<210> 55  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Secuencia peptídica de consenso

55 <400> 55

Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met  
 1 5 10

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ácido nucleico aislado que comprende o es complementario a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa, en el que la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 14 y la SEC ID N°: 20.
- 10 2. Una secuencia de nucleótidos aislada que comprende o es complementaria a al menos el 90% de la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 13 y la SEC ID N°: 19.
- 15 3. La secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 2, en la que dicha secuencia se selecciona del grupo que consiste en la SEC ID N°: 13 y la SEC ID N°: 19.
- 15 4. La secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 2 ó 3, en la que dicha secuencia codifica una desaturasa funcionalmente activa que utiliza un ácido graso poliinsaturado como sustrato.
- 20 5. La secuencia de nucleótidos de la reivindicación 4, en la que la SEC ID N°: 13 y la SEC ID N°: 19 proceden de *Saprolegnia diclina*.
- 20 6. Un polipéptido purificado codificado por dicha secuencia de nucleótidos de la reivindicación 1, 2 ó 3.
- 25 7. Un polipéptido purificado que desatura ácidos grasos poliinsaturados en el carbono 5 y que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 90% con una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEC ID N°: 20.
- 25 8. Un polipéptido purificado que desatura ácidos grasos poliinsaturados en el carbono 6 y que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 90% con una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEC ID N°: 14.
- 30 9. Un método de producción de una desaturasa, que comprende las etapas de:
- 30 a) aislar una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 13 y la SEC ID N°: 19;
- 35 b) construir un vector que comprenda: i) dicha secuencia de nucleótidos aislada unida operativamente a ii) una secuencia reguladora;
- 35 c) introducir dicho vector en una célula hospedadora durante un tiempo y en condiciones suficientes para la expresión de dicha desaturasa.
- 40 10. Un vector que comprende: a) una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 13 y la SEC ID N°: 19, unida operativamente a b) una secuencia reguladora.
- 40 11. Una célula hospedadora no humana que comprende dicho vector de la reivindicación 10.
- 45 12. Una célula de mamífero no humano que comprende dicho vector de la reivindicación 10, en la que la expresión de dicha secuencia de nucleótidos de dicho vector da como resultado la producción de niveles alterados de AA, EPA, GLA o STA cuando dicha célula se cultiva en un medio de cultivo que comprende al menos un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en LA, ALA, DGLA y ESP.
- 50 13. Una célula vegetal, planta o tejido vegetal que comprende dicho vector de la reivindicación 10, en la que 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.
- 55 14. La célula vegetal, planta o tejido vegetal de la reivindicación 13, en la que dicho ácido graso poliinsaturado se selecciona del grupo que consiste en AA, EPA, GLA y STA.
- 55 15. Una planta transgénica que comprende dicho vector de la reivindicación 10, en la que la expresión de dicha secuencia de nucleótidos de dicho vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado en semillas de dicha planta transgénica.
- 60 16. Un método para producir un ácido graso poliinsaturado, que comprende las etapas de;
- 65 a) aislar una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEC ID N°: 19;
- b) construir un vector que comprende dicha secuencia de nucleótidos aislada;
- c) introducir dicho vector en una célula hospedadora durante un tiempo y en condiciones suficientes para la expresión de enzima  $\Delta 5$ -desaturasa; y
- d) exponer dicha enzima  $\Delta 5$ -desaturasa expresada a un ácido graso poliinsaturado sustrato para convertir dicho sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho ácido graso poliinsaturado sustrato es DGLA o 20:4n-3 y dicho ácido graso poliinsaturado producto es AA o EPA, respectivamente.
- 5 18. El método de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende además la etapa de exponer dicho ácido graso poliinsaturado producto a una elongasa para convertir dicho ácido graso poliinsaturado producto en otro ácido graso poliinsaturado.
- 10 19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho ácido graso poliinsaturado producto es AA o EPA y dicho otro ácido graso poliinsaturado es ácido adrénico o ácido (n-3)-docosapentaenoico, respectivamente.
20. El método de la reivindicación 18, que comprende además la etapa de exponer dicho otro ácido graso poliinsaturado a una desaturasa adicional para convertir dicho otro ácido graso poliinsaturado en un ácido graso poliinsaturado final.
- 15 21. El método de la reivindicación 20, en el que dicho ácido graso poliinsaturado final es ácido (n-6)-docosapentaenoico o ácido docosahexaenoico (DHA).
22. Un método para producir un ácido graso poliinsaturado, que comprende las etapas de:
- 20 a) aislar una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEC ID N°: 13;  
b) construir un vector que comprende dicha secuencia de nucleótidos aislada;  
c) introducir dicho vector en una célula hospedadora durante un tiempo y en condiciones suficientes para la expresión de enzima  $\Delta 6$ -desaturasa; y  
25 d) exponer dicha enzima  $\Delta 6$ -desaturasa expresada a un ácido graso poliinsaturado sustrato para convertir dicho sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto.
23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en el que dicho ácido graso poliinsaturado sustrato es LA o ALA y dicho ácido graso poliinsaturado producto es GLA o STA, respectivamente.
- 30 24. El método de acuerdo con la reivindicación 22, que comprende además la etapa de exponer dicho ácido graso poliinsaturado producto a una elongasa para convertir dicho ácido graso poliinsaturado producto en otro ácido graso poliinsaturado.
- 35 25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en el que dicho ácido graso poliinsaturado producto es GLA o STA y dicho otro ácido graso poliinsaturado es DGLA o ETA, respectivamente.
- 40 26. El método de acuerdo con la reivindicación 24, que comprende además la etapa de exponer dicho otro ácido graso poliinsaturado a una desaturasa adicional para convertir dicho otro ácido graso poliinsaturado en un ácido graso poliinsaturado final.
27. El método de la reivindicación 26, en el que dicho ácido graso poliinsaturado final es AA o EPA.

**Figura 1**  
Ruta biosintética de ácido graso

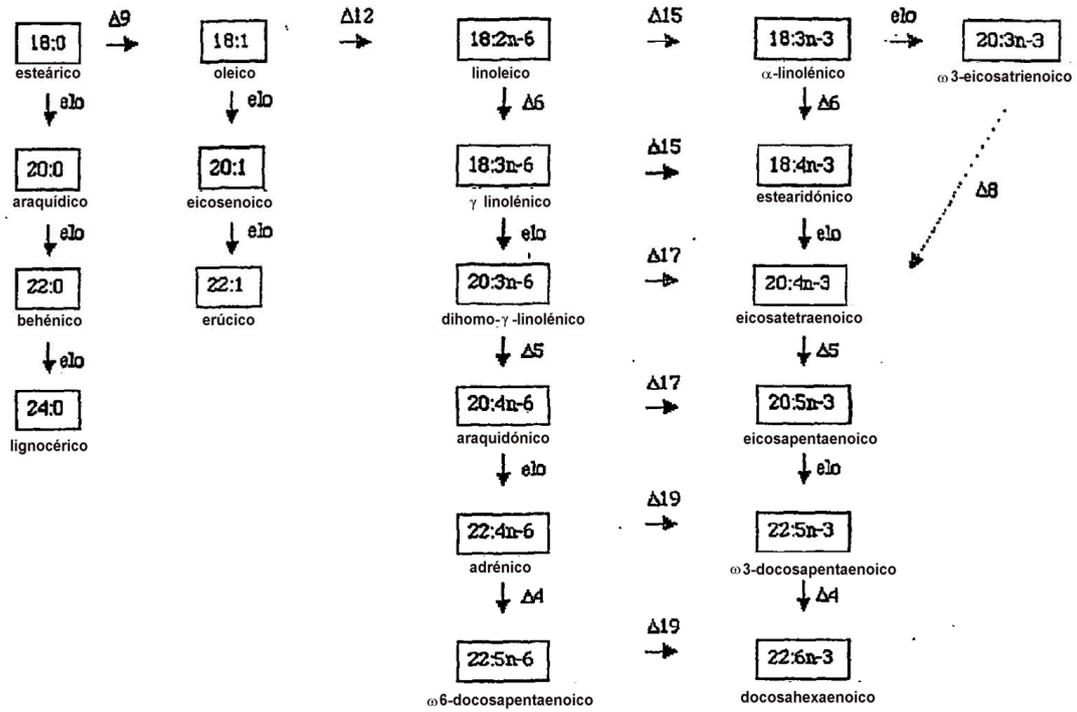


Figura 2

Secuencia génica de delta 6-desaturasa de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851)

```

1   ATGGTCCAGG GGCAAAAGGC CGAGAAGATC TCGTGGGCGA CCATCCGTGA
51  GCACAAACCGC CAAGACAACG CGTGGATCGT GATCCACCAC AAGGTGTACG
101 ACATCTCGGC CTTTGAGGAC CAOCGGGGCG GCGTCTCAT GTTCACSCAG
151 GCCGGCGAAG ACCGACCCSA TGGPTTCGCT GTCTTCCACC GAGCTCCGC
201 GCTCAAGCTC CTCGAGCAGT ACTACGTCCG CGACGTCCAC CAETCSACGG
251 GGGCGTTCGA CAGTCCGATC TCGGACGAGG TCAAGAAAGG CCAGTCCGAC
301 TFCATTGCGT CBTACCSCAA GCTGCGCCTT GAASTCAAGC GCCTCGGCTT
351 GFAOACTCG AGCAAGCTCT ACTACCTCTA CAAGTCCGOC TCGACCTGA
401 GCATTGCSCT TGTGTCCGGG GCCAFTTGCC TCCACTTGA CTCGACSGCC
451 ATGTACATGG TCGCGCTGT CATCCTTGGC CTCTTTTACC AGCASTGCGG
501 CTGGCTCGCC CATGACTTTC TGCACCACCA AGTGTTTGAG AACCACTGT
551 TTGGCGACCT CGTCCGGCTC ATGGTCCGCA ACCTCTGGCA GGGCTTCTCG
601 GTGCAGTGGT GGAAGAACAA SCACAACAGC CACCATGCGA TCCCAAACCT
651 CCAOCGACG CCGAGATCG CCTTCCACGG CGACCCGGAC ATTGACACSA
701 TGCOSATTCT CGGTGGTCC CTCAGATGG CGCAGCACGC GGTCCACTCG
751 CCCGTCCGGC TCTTCTTCAI GCGCTACCAA GCGTACCTGT ACTTTCCCT
801 CTGTCTCTTT GCGGTATCT GGTGGGTGAT CCAGTCCGGC ATGTACGCT
851 TCTAACAGT TGGGCCCGC GGCACCTTG ACAAGGTCCA GTACCCGCTG
901 CTGAGCGCG CCGGCTCCT CCTCTACTAC GGTGGAAAC TCGGCTTGT
951 GTAOCBACC AACATGTCGC TGTCCAAGC GGTGCGTTC CTCTTTGTA
1001 GCCAGGCGTC GTGCGGCTC TTCTCCGCA TGGTCTTTAG CGTCCGCCAC
1051 AACCGCATGG AGGTCTTTGA CAGGACAGC AAGCCCGATT TTTGGAAGCT
1101 GCAGTGTCT TCGACGCSA ACGTACGTC GTGCTCTGG ATCGACTGGT
1151 TCATGGGCG CCTCAACTAC CAGATCGACC ACCACTTGT CCCGATGCTG
1201 CCCGGCACB ACCTCCCGC GCTCAACGTG CTGCTCAAGT CGCTCTGCA
1251 GCAGTACGAC ATCCATACC ACGAGACGG CTTCATCGG GGCATGGCG
1301 AAGTCTGTG GCACCTCGAG GGCATCTCGA TCGAGTCTT CAAGGAGTTT
1351 CCCGCCATGT AA

```

Figura 3

Secuencia de aminoácidos de delta 6-desaturasa de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851)

```

1   MVQSQKAEKI SWATIREHNR QDWMIVDHH KVFDISAEED HGGVVMFTQ
51  AGEDAFDAFA VFKPSAIXL LKQFYVGDVD QSTAAVQTSI SDEVKKSQSD
101 FIASYRKLRL EYKRLGELYDS SKLYYLYKCA SFLSTALVSA ATCEHEDSTA
151 MTRVAAVIIG LFYQCGKLA KHE DHOQVFE NHREGDELGV HVGNDMQSES
201 VQMMNOCNT HCAIPNIGKAF BELAEHGDEP IDTFPILAWG KCPAGKAVDS
251 FVGLFFNRVQ AYLFE DILIE ARISNYIQSA MYAFYVGRG STEDKQVYPL
301 ERASLILYY GNNIG EYVDA NMSLLQAAAF LFYSQASCSL EEMVFSVGN
351 NGMEVEIKDS KDFWKIQVL SERMYTSSLK IDWERGG INY QIDHIE RMV
401 ERNDFPALNY EYKSLCKQVD IYDIE TGFIA GMAEVVMHE RISIEEFKEF
451  PAM*
```

Figura 4  
 Secuencia génica de delta 5- desaturasa de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851)

```

1  ATGGCCCCG  ABACGGAGCT  CCSCCAGCGC  CACGCCGCG  TCGCCGAGAC
51  GCCGCTGGCC  GCAAGAAAG  CCTTTACATG  GCAGGAGGTC  GCGCAGCACA
101 ACACGGCCGC  CTCGGCCTGG  ATCATTATTC  GCGGCAGGAT  CTACGACGTC
151 ACCGAGTGGG  CCAACAGCA  CCCCGGCGGC  GCGGAGATGG  TGTCTCTGCA
201 CGCCGCTCGC  GAGGCCACCG  ACACGTTCSA  CTCGTACCAC  CGSTPCAGCG
251 ACAAGGCCGA  GTCGATCTTG  AACAAATATG  AGATTGGCAC  GTTCAAGGGC
301 CGCTCCGAGT  TTCGACCTTT  CAAGCCGAGC  ACSSGCTTCT  ACAAGGAGTG
351 CCBCAAGCGC  GTTGGCGAGT  ACTTCAAGAA  GACACACCTC  CATCCGCAAG
401 ACGGCTTCCC  GGGCCTCTGG  CGCATGATGG  TCGTGTTTGC  GGTCCGCGGC
451 CTCGCTTGT  ACGGATGCA  CTTTTCGACT  ATCTTTCGCG  TGCAGCTGCG
501 GGGCGGGCG  CTCCTTGGCG  TCTGCCAGGC  GCTGCCGCTG  CTCACGCTCA
551 TGCACGACTC  GTCGACGCG  TCGTACACCA  ACATGCGGTT  CTCCTATTAC
601 GTCGTCGGCC  GCTTGGCCAT  GACTGGTPT  GCGGCGGGCT  CGATGGTGTG
651 ATGGCTCAAC  CAGCAGTCC  TGGCCACCA  CATCTACAG  AACGTCGCGG
701 GTCGAGCC  GATCTTCCG  GTCAGATGG  ACSSGACAT  CGCCGCAATC
751 GTAACCGCC  AGTGTTCGA  GCGCATGTAC  GCATTCAGC  ACATCTACTT
801 TCCGCGCTC  TATGGCTGTC  TTGGCTCAA  GTTCCGATC  CAGGACTTCA
851 CCGACAGCTT  CGCTCGCAC  ACGAACGGC  CGATCGCGCT  CAACCGCAC
901 GCGCTCTCA  GGTGGATGG  CATGATCAG  TCCAGGCTGT  TGTGGGCTTT
951 CTACCGCGTG  TACCTTCCGC  TTGCGGTGCT  CCAGATGCC  ATCAGAGCTT
1001 ACCTTCGAT  CTTCTTCTC  GCGAGTTG  TCACGGGCTG  GTACCTCGCG
1051 TTCAACTTCC  AAGTAAGCCA  TGTCTCGACC  GATGCGGCT  ACCCATGCGG
1101 GAGCAGGCC  AAGATGGCG  TCCAGGACGA  GTGGCAGTC  TCGCAGGTC
1151 ABACGTCGGT  CGACTACGCC  CATGGCTCGT  GATGACGAC  GTTCTTGGC
1201 GCGCGCTCA  ACTACAGGT  GGTGACCCAC  TTGTTCGCA  GCGTGTGCA
1251 GTACACTAC  CCGGCGATCG  GCGCATCAT  GGTGACGTC  TGCAGGAGT
1301 ACAACATCAA  GTAGCCATC  TTGCGGACT  TTACGGCGC  GTTCTTTCG
1351 CACTTGAAGC  ACCTCCCAA  CATGGCCAG  CAGGCAATG  CGCCAGGAT
1401 CCACATGGCC  TAA
    
```

**Figura 5**

Secuencia de aminoácidos de delta 5-desaturasa de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851)

```

1   MAEQTE LRQR HAAYAE TPVA GKKAETWQEV AQHNTAASAM IIRGKV YDV
51  TEWAMKCHPGG REMVLDKAGR EAWDFEDSTH EFSDKAESIL NKYEIGTF TG
101 RSEF PFTEKD TGE YKCRKR YGE YKQMD HPQDGF PGLW RMIVVEAVAG
151 DALYGMHF SF IFAIQ LAASA LFGVCQALP LHVMDSSKA SYEMVEFH Y
201 VVREAMDWF AGS SIVSK IN QHVGSHIYT NVAGSDEDLF VVMDGDIRR I
251 VNRQVF QPMY AFDKI YLPLI YGVLS IKER I QDF TDIFSSH TNG PIRVNRH
301 ALSTMRMIS SKSEHAF YRV YLPLAVLQMP IKTYLAIDF L AEFY TGM YLA
351 ENFQVSHVST FCG YPCDEA KMAIQDF MAV SQVKTSDVYA HG SWMPTFLA
401 GAIN YQVVNH LFPVY SQYHY PAIAPITVDV CKE YN KYVAI LPDF TAEFYA
451 HLGKLRNMSQ QGIAATFHM *
    
```

Figura 6 (comparativa)  
 Secuencia génica de delta 5-desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (KIGC 34304)

```

1   ATGGAACGCG  GCGSCAAGG  FCMSETSAAC  AGCSCGCAAG  TGGCACAAGG
51  CCGTGCAGGA  ACSCSAAGA  CSMFCCFQAT  CGAGGGCGAG  GTCTACBATO
101 TCACCAACTT  TASSCACCCC  GGCGGTCBA  TCAFCAGFT  TCTCACBACC
151 GACGGCAGCG  AGGCTGTGGA  CGCGACFAAC  GCGTTFCGCG  ASITTCAGTG
201 CCGTCCGGC  BAAGCBBAAA  AGTACCTCAA  GGGCTGCCCC  AAGCTCGGCG
251 GCGCAGCAG  GATBAATFT  GAGCCAAAG  AGCAGGCCCG  GCGCBACBCC
301 ATCAGCBAAG  ACTACSTCAA  GCTSCGCBAG  GAGATGATGG  CCGAGGGCCT
351 CTTCAAGCC  GCGCCCTCC  ACGTGTCTA  CAGGTTGCG  BAAATCGCAG
401 CCGTFTCG  GCGCTGFTC  TACTGTFTT  CGATGCGCBG  AAGGTGTTC
451 GCGAGCTCG  CAGCCATCG  AGTGGGGGG  ATCGSCAGG  GCGCTGCGG
501 CTGACTCAT  CAGAGTCCG  GACACTTCT  GATGACGGGG  TACTTCGCC
551 TTGACGTGCG  CCGCAGGAG  CTGATGTAG  GCGTGGGGTG  CTGATGTCC
601 GCGAGCTGG  GCGCGTTCA  GCAACAAGG  CAGCACCGAG  CCGCAGAA
651 ACTCACAGC  GAGTGGAGC  TCGACACCT  GCGCTCGTT  GCGTCAAGG
701 AAGGATGCG  CGCAGGTTG  GCGCCGGCT  GGTTCAGGG  GAGTGGCTC
751 TCGGCGAGG  CGTACATTT  TGCGCGGTT  TCTGCTTCC  TGGTGGCTC
801 CTTCTGAGC  CTGTTCTEC  ACOCGCGCA  CAGCGCGCG  ACGAGCCACT
851 TTGCTGAGT  GCGCCGCTC  GCGGTGCGG  TGTGGGCTG  GCGGGCTTC
901 ATGCGTGGT  TCGGTAAGG  GGGAGCGAG  TGTTCGGTC  TCTACAGGC
951 CAGCTTGGC  TTGGCTGCA  CCTACATCT  CAGCAACTTT  GCGTCAAGC
1001 ACAGCAGCT  CAGCTCAGC  GAGCGGAGG  AGTCTGTCG  CTGGTCAAG
1051 TACCGCGCG  TGCGCAGAG  CAGGTTGTC  AAGACTCGT  GGTTCAGAG
1101 CTGATGAGT  TCGTACTCA  ACTTTCAGT  CGAGCAGAC  CTCTTCCGT
1151 GCGTGGCGA  GCTCAACGC  CGCGCGTCC  GCGCGCGGT  CCGCGCGCT
1201 TTGAGAGAG  ACGGCTGGC  TTGAGAGAG  CGCCGTAGC  TTACCGCGT
1251 TGGGAGAGC  TTGCGAAGC  TGCGCGCGT  GGGCAAGC  GCGCGCGAG
1301 GCGCGCGAG  GCGCGCTAG
    
```

Figura 7 (comparativa)

Secuencia de aminoácidos de delta 5-desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304)

```

1  MSNIGEGQVW  SAGYAGGGBE  TANKTLLGGI  YDVTNEAKS  GSSIDG  LTT
51  DG  VE  KYDAPN  AE  RE  FIKRSG  X  AEN  YLKGEE  K  IGAR  GNGQ  DAK  EQARDA
101  KTRD  YVKRE  E  NYAES  EK  K  A  EN  IV  YATA  E  IAD  EFAS  Y  DF  S  G  NYE
151  A  F  LA  A  E  V  G  S  I  R  G  S  K  E  W  G  M  K  E  C  S  N  E  S  M  T  E  E  I  F  E  D  V  A  L  G  E  L  V  T  S  V  C  S  M  S
201  A  S  H  N  R  V  Q  G  N  K  H  K  A  E  F  Q  K  L  N  H  D  V  D  L  D  F  L  P  D  V  A  I  N  E  K  I  A  A  K  V  A  S  S  E  Q  A  K  I
251  S  A  Q  A  T  T  L  P  V  S  C  Y  L  V  S  E  W  T  L  F  D  E  R  A  M  E  R  T  S  H  T  A  E  H  A  V  A  V  A  V  G  H  A  E
301  M  S  S  Y  G  S  D  S  E  G  L  Y  A  F  Y  G  F  G  C  H  Y  I  E  T  N  E  A  V  S  K  T  H  E  D  V  T  E  E  D  E  F  D  H  V  E
351  Y  A  A  K  T  F  V  S  N  G  S  F  I  T  W  M  S  Y  I  N  E  Q  I  E  H  K  L  F  S  L  E  Q  L  N  A  P  R  V  A  R  V  R  A  L
401  F  E  K  M  G  E  A  Y  D  E  R  P  Y  L  E  L  S  D  F  F  A  N  L  N  A  V  G  Q  H  A  G  Q  A  A  A  A  A
    
```

Figura 8 (comparativa)

1 GAATTCACCA TGGGTCCGG AGCACAGGA GAGCCAAGGC AGGCCACAGA  
 51 GCTGAGAGC AGCCCAAGTG AGCAGCGTAA GGTGTTGCTC ATTGACGGGC  
 101 AGCTGTACGA TGCRAACCAAC TTCAGGCATC CTGGTGGCTC CATCATCAAA  
 151 TATTTGTGCA CCGNTGGCAA GGAGGTAGTT GATGCAACCG AAGCGTACAA  
 201 GGRGTTCCAC TGCAGATCCT CGAAGGCCGT CAAGTACCTC AACTCCCTGC  
 251 CAAAGATCGA CGGCCCAATC AAGTACAAAT AGCAGGCNAA GGAGCAGGCT  
 301 CGCCATGACA AACTCACGAG GGAGTATGTA GCTCTCCGC AACAGCTCGT  
 351 CAAGGAGGA TACTTTGACC CCAGCCCCTT CCACATTATC TACAGATGCG  
 401 CCGAGTTGGC AGCCATGTTT GCTCTCTCGT TCTACCTTTT CTCCTTCRAG  
 451 GGTAACGTCA TGCCCACTAT TGCTGCCATC GTGATTGGGG GGTGGGTGCA  
 501 GGGTCGTTGT GGGTGGCTCA TGCATGAAGC TGCCCACTAC AGCATGACCG  
 551 GAAACATCC TGTTGACTTG CGCCTTCRAG AGTTTGTGA CGGAATTGGG  
 601 TGTGGCATGA GCGGGGCTTG GTGAGRAGC CAGCACAA CA AGCACACGC  
 651 CACCCCCAA ARGCTCAAGC ATGACGTTGA TTTGGACACT CTTCCCTCTTG  
 701 TCGCCTGGAA CGAGAAATTT GCCCGTCGGG TCAAGCCAGG TAGCTTCCAG  
 751 GCAAAGTGGC TTCATCTCCA GGGATACATC TTTGCCCCAG TCTCCTGCCT  
 801 TCTCGTTGGT CTCTTCTGGA CTTTGTACTT GCATCCTCGC CACATGATCC  
 851 GCACCAAGCG CAACTTCGAG ATATTTTCTG TGGCTCTGGC CTACGGTATGC  
 901 TGGTTCCTGC TTCTTTTGG CATGGGCTAC ACTGTGGAG AGTCTCTGGG  
 951 TCTCTATGAG CTTACTTTTG GACTTGGCTG TACCTACATC TTTACGCAAT  
 1001 TTGCTGTAG CCACACCCAC TTGCCAGTGT CCGAGGAGGA CGAGTACCTG  
 1051 CACTGGTTCG AGTACGCTGC GCTGCACACC ACGAACGTTG CCATCGACTC  
 1101 GTACGTTGTC ACCTGGCTGA TTAGCTACCT CAACITTCAG ATCGAGCAC  
 1151 ACTTGTTCCT TTGCTGCCCG CAGTTCGCC ACCCTGCAT CTCTTCTCGC  
 1201 GTCRAGAAAC TTTTCGAGGA CAATGGTCTG GTATACGACG CCCGCTCATA  
 1251 CGTCCAGGCG CTCRAGGATA CCTTCGGCAA CCTACACGAA GTGGGCGTCA  
 1301 ACGTGGCCA AGCTGCCAAG AGCGAGTAAG ATCTCGAG

Figura 9 (comparativa)

1 MGRGAQGEPR QATELKSSPS EQRKVLIDG QLYDATNFRH PGGSIKYLIC  
 51 TDGKEVVDAT EAYKEFHCRS SKAVKYLNSL PKIDGPIKYK YDAKEQARRHD  
 101 KLTREYVALR EQLVKEGYFD PSELHIIYRC AELAAAFALS FYLFSEKGNV  
 151 MATIRAIVIG GCVQGRCGWL MHEAGHSMT GNIPVDLRLQ EFLYGIGCGM  
 201 SCAWRSQHN KHHATPQKIK HDVDLDTLPL VAWNEKIARR VKFGSFOAKW  
 251 LHLQYIFAP VSCLLVGLEW TLYLHPRHMI RTRKNFEIFS VALRYVCWFS  
 301 LLLSMGYTVG ESLGLYVITF GLGCTYIFTH FAVSHTHLEPV SEEDEYLHWV  
 351 EYAALHTNV AIDSYYVTWL MSYLNFOIEH HLFPCCPQER HPAISSRVKK  
 401 LEEDNGLVYD ARSYVQALKD TFGNLHEVGV NAGQARKSE

Figura 10 (comparativa)

1 CCATGGGCCG CGCGCGGAG A~~AA~~AGCGAGG TGGACCAGGT GCAGCCACRA  
 51 AAGACCGAGC AGCTCCAGAA GGCCARGTGG GAGGATGTG TTGCGATCAA  
 101 TGGAGTCGAA TACGACGTCA CGGACTATCT CAGAAACAC CCTGGTGGCA  
 151 GCGTGATCAA GTACGGGCTT GCCAACACCG GCGTGTATGC CACGTCCCTC  
 201 TTTGAAGCGT TCCACATGGC CTCRAAGAAG GCTCAGATGG TGCTCAAGTC  
 251 TCTCCCAAAG CGTGTCCGG TCCTCGAGAT CCAGCCAAAC CAGCTTCCAG  
 301 AAGAGCAGAC CAAGGAGCG GAGATGCTGC GTGATTTTAA AAAATTTGAG  
 351 GATGAGATTC GCCGGATGG ATTGATGAA CCTTCCCTCT GGCAATCGCC  
 401 TTACAGATTA TCAGAGCTTG TAGGATGTT CACGTCGGC CTCTACCTCT  
 451 TCTCGTTAAA CACTCCTCTG TCTAATGCTG CTGGTGTCTT CGTCCACGGT  
 501 CTCCTTTGGT CATTCTGTGG ATGTTGCCAG CATGAGGCAG GCCACGGCTC  
 551 CTTTTTTTAC AGCCTTTGGT GGGCAAGCG TGTACAGGCC ATGTTGATCG  
 601 GGTTTGGTCT AGGAACATCC GGGACATGT GGAACATGAT GCACAAACAAG  
 651 CATCATGCTG CCACCCAAA GGTTCATCAC GACCTTGACA TTGACACAAC  
 701 TCCTTTTGTG GCTTTCTTCA A~~CA~~CTGCATT TGA~~AA~~AAAC AGATGGAAGG  
 751 GCTTTTCCAA GGCTTGGGTC CGCTTTCAGG CTTTACAGTT CAFTTCTGTC  
 801 ACCAGCGGCA TGATCGTCTG GCTGTTCTGG CTGTTTTTC TCCACCTCG  
 851 CCGCGTCGTT CAAAAGAAGA ACTTTGAGGA GGGTTTTTGG ATGCTGTGGA  
 901 GCCACATTGT GCGCACCTAT CTCCTCCACC TTGTGACCCG CTGGGAGAGC  
 951 CTCGCTGCAT GCTACCTTGT TGGTATTTGG GCGTGCATGT GGGTGTCCGG  
 1001 TATGTATTIG TTTGGCCACT TTTGCTCTC CCACACTCAT ATGGACATG  
 1051 TGGAGCGGGA CGTGCATPAG AACTGGGTCA GGTACGCTGT TGACCACACT  
 1101 GTTGACATCA GCCCATCCAA CCGCTCTGTG TGCTGGGTCA TGGGTTACCT  
 1151 CAACATGCAG ACCATCCACC ACTTGTGGCC TGCCATGCCC CAGTACCACC  
 1201 AAGTCGAGGT CTCACGCCGC TTTGCCATCT TCGCCAAAA ACACGGCTC  
 1251 AACTACCGCG TCGTCTCTTA CTTTGAGGCT TGGGCTCTGA TGCTCCAAA  
 1301 TCTTGTGTAC GTCGGTTCCC ACTACCATGA GAACGGTGTG RAGCGGGCCC  
 1351 CA~~AA~~GAAGC CAAGCGCAG TAGAARGCTA T

Figura 11 (comparativa)

1 MGRGGEKSEV DOVQPKTEQ LQKAKWEDVV RINGVEYDVT DYLRKHPGGS  
 51 VIKYGLANTG ADATSLFEAF HMRSKKAQMV LKSLPKRAPV LEIQPNOLPE  
 101 EOTKEAEMLR DEKFEDEIR RDGLMEPEFW HRAYRLESELV GMFTLGLYLE  
 151 SINTPLSIAA GVLVHGLFGA FCGWCQHEAG HGSFFYSLWV GKRVDAMLIG  
 201 FGLTSGDMW NMMHNKHHAA TQKVHHDLDI DTTPEVAFFN TAFEKNRWKG  
 251 ESKAWRFOA FTFTPVTSGM IVMLFWLFFL HPRRVVQKKN FEZGEWMLSS  
 301 HIVRYTLFHL VTGWESLAAC YLVGYWACWV VSGMYLEGFH SLSHTHMDIV  
 351 EADVHNWVR YAVDHTVDIS PSNPLVCWVM GYLANMGTIHH LWPAMPQYHQ  
 401 VEYSRREAF AKKHGLNYRV VSYFEAWRLM LQNLADVGSY YHENGVKRAP  
 451 KKAKAQ

Figura 12 (comparativa)

pRAT-2a	1	M	G	R	G	A	Q	G	E	P	R	Q	A	T	E	L	K	S	S	P	S	E	Q	R	K	V	L	L	I	D	G	Q	L	Y	D	A	T	N	F	R	H	P	G	G	S	I	45
pRAT-2c	1	M	G	R	G	A	Q	G	E	P	R	Q	A	T	E	L	K	S	S	P	S	E	Q	R	K	V	L	L	I	D	G	Q	L	Y	D	A	T	N	F	R	H	P	G	G	S	I	45
pRAT-2a	46	I	K	Y	L	C	T	D	G	K	E	V	D	A	T	E	A	Y	K	E	F	H	C	R	S	S	K	A	D	K	Y	L	N	S	L	P	K	I	D	G	P	I	K	Y	K	90	
pRAT-2c	46	I	K	Y	L	C	T	D	G	K	E	V	D	A	T	E	A	Y	K	E	F	H	C	R	S	S	K	A	D	K	Y	L	N	S	L	P	K	I	D	G	P	I	K	Y	K	90	
pRAT-2a	91	Y	D	A	K	E	Q	A	R	H	D	K	L	T	R	E	Y	V	A	L	R	E	Q	L	V	K	E	G	Y	F	D	P	S	P	L	H	I	I	Y	R	C	A	E	L	A	135	
pRAT-2c	91	Y	D	A	K	E	Q	A	R	H	D	K	L	T	R	E	Y	V	A	L	R	E	Q	L	V	K	E	G	Y	F	D	P	S	P	L	H	I	I	Y	R	C	A	E	L	A	135	
pRAT-2a	136	M	F	A	L	S	F	Y	L	F	S	F	K	G	N	V	A	T	I	A	A	I	V	I	G	G	C	V	Q	G	R	C	G	W	L	M	H	E	A	G	H	Y	S	M	T	180	
pRAT-2c	136	M	F	A	L	S	F	Y	L	F	S	F	K	G	N	V	A	T	I	A	A	I	V	I	G	G	C	V	Q	G	R	C	G	W	L	M	H	E	A	G	H	Y	S	M	T	180	
pRAT-2a	181	G	N	I	P	V	D	L	R	L	Q	E	F	L	Y	G	I	G	C	G	M	S	G	A	W	W	R	R	Q	H	N	K	H	H	A	T	P	Q	K	L	K	H	D	V	D	L	225
pRAT-2c	181	G	N	I	P	V	D	L	R	L	Q	E	F	L	Y	G	I	G	C	G	M	S	G	A	W	W	R	R	Q	H	N	K	H	H	A	T	P	Q	K	L	K	H	D	V	D	L	225
pRAT-2a	228	D	T	L	P	L	V	A	W	N	E	K	I	A	R	R	V	K	P	G	S	F	Q	A	K	W	P	H	L	Q	G	Y	I	F	A	P	V	S	C	L	L	V	G	L	F	W	270
pRAT-2c	228	D	T	L	P	L	V	A	W	N	E	K	I	A	R	R	V	K	P	G	S	F	Q	A	K	W	P	H	L	Q	G	Y	I	F	A	P	V	S	C	L	L	V	G	L	F	W	270
pRAT-2a	271	T	L	Y	L	H	P	R	H	M	I	R	T	K	R	N	F	E	I	F	S	V	A	L	R	Y	V	C	W	F	S	L	L	L	S	M	G	Y	T	V	G	E	S	L	G	L	315
pRAT-2c	271	T	L	Y	L	H	P	R	H	M	I	R	T	K	R	N	F	E	I	F	S	V	A	L	R	Y	V	C	W	F	S	L	L	L	S	M	G	Y	T	V	G	E	S	L	G	L	315
pRAT-2a	316	Y	V	L	T	F	G	L	G	C	T	Y	I	F	T	H	F	A	V	S	H	T	H	L	P	V	S	E	E	D	E	Y	L	H	W	V	E	Y	A	A	L	H	T	T	N	V	360
pRAT-2c	316	Y	V	L	T	F	G	L	G	C	T	Y	I	F	T	H	F	A	V	S	H	T	H	L	P	V	S	E	E	D	E	Y	L	H	W	V	E	Y	A	A	L	H	T	T	N	V	360
pRAT-2a	361	A	I	D	S	Y	V	V	T	W	L	M	S	Y	L	N	F	Q	I	E	H	H	L	F	P	C	C	P	Q	F	R	H	P	A	I	S	S	R	V	K	K	L	F	E	D	N	405
pRAT-2c	361	A	I	D	S	Y	V	V	T	W	L	M	S	Y	L	N	F	Q	I	E	H	H	L	F	P	C	C	P	Q	F	R	H	P	A	I	S	S	R	V	K	K	L	F	E	D	N	405
pRAT-2a	406	G	L	V	Y	D	A	R	S	Y	V	Q	A	L	K	D	T	F	G	N	L	H	E	V	G	V	N	A	G	Q	A	A	K	S	E									439			
pRAT-2c	406	G	L	V	Y	D	A	R	S	Y	V	Q	A	L	K	D	T	F	G	N	L	H	E	V	G	V	N	A	G	Q	A	A	K	S	E									439			

Figura 13 (comparativa)

pRAT-1a	1	MGRGGGEKSEVDQVQPQKTEQLQKAKWEDVVRINGVEYDVTDYLR	44
pRAT-1b	1	MGRGGGEKSEVDQVQPQKTEQLQKAKWEDVVRINGVEYDVTDYLR	44
pRAT-1a	45	KHPGGSVIKYGLANTGADATSLFEAFHMRSKKAQMVLLKSLPKRA	88
pRAT-1b	45	KHPGGSVIKYGLANTGADATSLFEAFHMRSKKAQMVLLKSLPKRA	88
pRAT-1a	89	PVLEIQPNQLPEEQTKEAEMLRDFKFFEDEIRRDGLMEPSFWHR	132
pRAT-1b	89	PVLEIQPNQLPEEQTKEAEMLRDFKFFEDEIRRDGLMEPSFWHR	132
pRAT-1a	133	AYRRLSELVGMFTLGLYLFSLNTPLSIAAGVLVHGLFGAFCGWCQ	176
pRAT-1b	133	AYRRLSELVGMFTLGLYLFSLNTPLSIAAGVLVHGLFGAFCGWCQ	176
pRAT-1a	177	HEAGHGSFFYSLWWGKRVQAMLIGFGLGTSGDMWNMMHNKHHAA	220
pRAT-1b	177	HEAGHGSFFYSLWWGKRVQAMLIGFGLGTSGDMWNMMHNKHHAA	220
pRAT-1a	221	TQKVHHDLIDITTPFFVAFFNATAFEKNRWKGFSAWVRFQAFIFI	264
pRAT-1b	221	TQKVHHDLIDITTPFFVAFFNATAFEKNRWKGFSAWVRFQAFIFI	264
pRAT-1a	265	PVTSGMIVMLFWLFFLHPRRRVVQKKNFEEGFWMSSSHIVRTYLF	308
pRAT-1b	265	PVTSGMIVMLFWLFFLHPRRRVVQKKNFEEGFWMSSSHIVRTYLF	308
pRAT-1a	309	HLVTGWESLAACYLVGYWACMWVSGMYLFGHFSLSHTHMDIVEA	352
pRAT-1b	309	HLVTGWESLAACYLVGYWACMWVSGMYLFGHFSLSHTHMDIVEA	352
pRAT-1a	353	DVHKNWVRYAVDHTVDISPSNPLVCWVMGYLNMQTIHHLWPAMP	395
pRAT-1b	353	DVHKNWVRYAVDHTVDISPSNPLVCWVMGYLNMQTIHHLWPAMP	395
pRAT-1a	397	QYHQVEVSRRFAIFAKKHGLNRYRVVSYFEAWRMLQLNLADVSSH	440
pRAT-1b	397	QYHQVEVSRRFAIFAKKHGLNRYRVVSYFEAWRMLQLNLADVSSH	440
pRAT-1a	441	YHENGVKRAPKKAKAQ	455
pRAT-1b	441	YHENGVKRAPKKAKAQ	455

Figura 14 (comparativa)

```

1  ATGGTGGCAG  GCAAATCAGG  CGCTGCGGCG  CACGTGACTC  ACAGCTCGAC
51  ATTGCCCGT  GAGTACCATG  GCGCGACCAA  CGACTCGCGC  TCTGAGGCGG
101 CCGACGTAC  CGTCTTAGC  ATCGATGCTG  AAAAGGAGAT  GATCATCAAC
151 GGCCCGTGT  ATGACGTGTC  GTCATTTGTG  AAGCGGCACC  CAGGTGGCTC
201 GGTGATCAAG  TTCCAGCTGG  GCGCCGACGC  GAGCGACGCG  TACAACAAC
251 TTCACGTCCG  CTCCAAGAAG  GCGGACAAGA  TGCTGTATTC  GCTCCCGTCC
301 CGGCCGGCCG  AGGCCGGCTA  CGCCAGGAC  GACATCTCCC  GCGACTTTGA
351 GAAGCTGCGC  CTCGAGCTGA  AGGAGGAGGG  CTACTTCGAG  CCCAACCTGG
401 TGCACGTGAG  CTACAGGTGT  GTGGAGGTTT  TTGCCATGTA  CTGGGCTGGC
451 GTCCAGCTCA  TCTGGTCCGG  GTACTGGTTC  CTCGGCGCGA  TCGTGGCCGG
501 CATTGCGCAG  GGCCGCTGCG  GCTGGCTCCA  GCATGAGGGT  GGGCACTACT
551 CGCTCACCGG  CAACATCAAG  ATCGACCGGC  ATCTGCAGAT  GGCCATCTAT
601 GGGCTTGGCT  GCGGCATGTC  GGGCTGCTAC  TGGCGCAACC  AGCACAACAA
651 GCACCAGGCC  ACGCCGCAGA  AGCTCGGGAC  CGACCCCGAC  CTGCAGACGA
701 TGCCGCTGGT  GGCCTTCCAC  AAGATCGTCG  GCGCCAAGGC  GCGAGGCAAG
751 GGCAAGGCGT  GGCTGGCGTG  GCAGGCGCCG  CTCTTCTTTG  GCGGGATCAT
801 CTGCTCGCTC  GTCTCTTTCC  GCTGGCAGTT  CGTGCTCCAC  CCCAACCCAG
851 CGCTGCGCGT  GCACAATCAC  CTGGAGCTCG  CGTACATGGG  CCTGCGGTAC
901 GTGCTGTGGC  ACCTGGCCTT  TGGCCACCTC  GGGCTGCTGA  GCTCGCTCCG
951 CCTGTACGCC  TTTTACGTGG  CCGTGGGCGG  CACCTACATC  TTCACCAACT
1001 TCGCCGTCTC  GCACACCCAC  AAGGACGTCG  TCCCGCCAC  CAAGCACATC
1051 TCGTGGGCAC  TCTACTCGGC  CAACCACACG  ACCAACTGCT  CCGACTCGCC
1101 CTTTGTCAAC  TGGTGGATGG  CCTACCTCAA  CTTCCAGATC  GAGCACCACC
1151 TCTTCCCGTC  GATGCCGCAG  TACAACCACC  CCAAGATCGC  CCCGCGGGTG
1201 CGCGCGCTCT  TCGAGAAGCA  CGGGGTGAG  TATGACGTCC  GGCCATACCT
1251 GGAGTGTFTT  CGGGTCACGT  ACGTCAACCT  GCTCGCCGTA  GGCAACCCGG
1301 AGCACTCCTA  CCACGAGCAC  ACGCACTAG

```

Figura 15 (comparativa)

1 MVAGKSGAAA HVTHSSTLPR EYHGATNDSR SEADVTVSS IDAEKEMIIN  
51 GRVYDVSSFV KRHPGGSVIK FQLGADASDA YNNFHVRSKK ADKMLYSLPS  
101 RPAEAGYAQD DISRDFEKLK LELKEEGYFE PNLVHVSYRC VEVLAMYWAG  
151 VQLIWSGYWF LGAIVAGLAQ GRCGWLQHEG GHVSLTGNIK IDRHLQMAIY  
201 GLGCGMSGCY WRNQHNKCHA TPQKLGTDPD LQTMPLVAFH KIVGAKARGK  
251 GKAWLAWQAP LFFGGIICSL VSFGWQFVLH PNHALRVENH LELAYMGLRY  
301 VLWHLAFGHL GLLSSLRLYA FYVAVGGTYI FTNFAVSETH KDVVPPTKHI  
351 SWALYSANHT TNCSDSEFVN WWMAYLNFQI EHLFPSMPQ YNHPKIAPRV  
401 RALFEKHGVE YDVRPYLECF RVTYVMLLAV GNPEHSYHEH TH