

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 806**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02	(2006.01)	A61K 38/38	(2006.01)
C12N 15/82	(2006.01)		
C12N 15/53	(2006.01)		
C12N 5/10	(2006.01)		
C12N 5/14	(2006.01)		
A61K 38/44	(2006.01)		
A61P 3/10	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 9/00	(2006.01)		
A61K 9/16	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2001 E 10150355 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 2166087**

54 Título: **Miembro de la familia de desaturasa de ácido graso fad6 y usos del mismo**

30 Prioridad:

28.09.2000 US 236303 P
12.06.2001 US 297562 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2013

73 Titular/es:

BIORIGINAL FOOD & SCIENCE CORP. (100.0%)
102 MELVILLE STREET
SASKATOON,SASKATCHEWAN S7J 0R1, CA

72 Inventor/es:

QUI, XIAO y
HONG, HAIPING

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 399 806 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

Miembro de la familia de desaturasa de ácido graso fad6 y usos del mismo

Antecedentes de la Invención

5 Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con grupos laterales de hidrocarburo de cadena larga y cumplen una función fundamental en muchos procesos biológicos. Los ácidos grasos son raramente libres en la naturaleza pero, en cambio, ocurren en forma esterificada como el componente principal de los lípidos. Los ácidos grasos/ lípidos son fuentes de energía (por ejemplo, oxidación β) y son una parte integral de las membranas de célula que son indispensables para procesar la información biológica o bioquímica.

10 Los ácidos grasos se pueden dividir en dos grupos: los ácidos grasos saturados y los ácidos grasos insaturados que contienen uno o más enlaces dobles de carbono en la configuración *cis*. Los ácidos grasos insaturados se producen por desaturasas terminales que pertenecen a la clase de enzimas sin hemo-hierro. Cada una de estas enzimas son parte de un sistema de transporte de electrones que contiene dos de otras proteínas, a saber citocromo b5 y NADH-citocromo b5 reductasa. Específicamente, dichas enzimas catalizan la formación de enlaces dobles entre los átomos de carbono de una molécula de ácido graso. El humano y otros mamíferos tienen un espectro limitado de estas desaturasas que se requieren para la formación de enlaces dobles particulares en los ácidos grasos insaturados. Sin embargo, los humanos toman algunos ácidos grasos, a través de su dieta. Dichos ácidos grasos esenciales, por ejemplo, son ácido linoleico (C18:2); ácido linolénico (C18:3), ácido araquidónico (C20:4). En contraste, los insectos y plantas son capaces de sintetizar una variedad mucho mayor de ácidos grasos insaturados y sus derivados.

20 Los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (LCPUFA) tal como ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6(4,7,10,13,16,19)) son componentes esenciales de las membranas celulares de diversos tejidos y organelos en los mamíferos (células inmunes, nervio, retina y cerebro). Por ejemplo, más de 30 % de los ácidos grasos en fosfolípidos en el cerebro son 22:6 (n-3) y 20:4 (n-6). (Crawford, M.A., et al., (1997) Am. J. Clin. Nutr. 66: 1032S-1041S). En la retina, el DHA cuenta más de 60 % de los ácidos grasos totales en el segmento externo de los bastones, la parte fotosensible de la célula fotorreceptora. (Giusto, N.M., et al. (2000) Prog. Lipid Res. 39: 315-391).
 25 Los estudios clínicos han mostrado que el DHA es esencial para el crecimiento y desarrollo del cerebro en los niños, y para el mantenimiento de la función cerebral normal en los adultos (Martinetz, M. (1992) J. Pediatr. 120:S129-S138). El DHA también tiene efectos significativos en la función fotorreceptora implicada en el proceso de transducción de señal, la activación de rodopsina, y el desarrollo de bastones y conos (Giusto, N.M., et al. (2000) Prog. Lipid Res. 39: 315-391). Adicionalmente, también se encuentran algunos efectos positivos del DHA en enfermedades tales como hipertensión, artritis, aterosclerosis, depresión, trombosis y cánceres (Horrocks, L.A. y Yeo, Y.K. (1999) Pharmacol. Res. 40:211-215). Por lo tanto, el suministro dietario apropiado del ácido graso es importante para los humanos para permanecer saludables. Es particularmente importante para los niños, jóvenes y ciudadanos mayores absorber adecuadamente estos ácidos grasos de la dieta debido a que no se pueden sintetizar eficientemente en su cuerpo ni se pueden complementar por los alimentos (Spector, A.A. (1999) Lipids 34: S1-S3).

35 El DHA es un ácido graso de la serie n-3 de acuerdo con la ubicación del último enlace doble en el extremo metilo. Este se sintetiza por medio de etapas alternantes de desaturación y elongación. Partiendo de 18:3 (9,12,15), la biosíntesis de DHA implica la desaturación $\Delta 6$ a 18:4 (6,9,12,15), seguido por elongación a 20:4 (8,11,14,17) y desaturación $\Delta 5$ a 20:5 (5,8,11,14,17). Más allá de este punto, existen algunas controversias a cerca de la biosíntesis. La vista convencional es que 20:5 (5,8,11,14,17) se elonga a 22:5 (7,10,13,16,19) y luego se convierte a 22:6 (4,7,10,13,16,19) por la desaturación final $\Delta 4$ (Horrobin, D.F. (1992) Prog. Lipid Res. 31:163-194). Sin embargo, Sprecher et al. sugirió recientemente una ruta alternativa para la biosíntesis de DHA, que es independiente de la desaturasa $\Delta 4$, que implica dos elongaciones consecutivas, una desaturación $\Delta 6$ y un acortamiento de dos carbonos por medio de la oxidación β limitada en peroxisoma (Sprecher, H., et al. (1995) J. Lipid Res. 36:2471-2477; Sprecher, H., et al. (1999) Lipids 34:5153-5156).

45 La producción de DHA es importante debido a su efecto beneficioso en la salud humana. Actualmente las fuentes principales de DHA son aceites de pescado y algas. El aceite de pescado es una fuente tradicional y principal para este ácido graso, sin embargo, se oxida usualmente por el tiempo en el que se vende. Adicionalmente, el suministro del aceite es altamente variable y su fuente está en peligro con la disminución de poblaciones de peces mientras que la fuente de algas es costosa debido a la baja producción y los altos costes de extracción.

50 El EPA y AA son ambos ácidos grasos esenciales $\Delta 5$. Estos forman una clase única de constituyentes de alimentos y comida para humanos y animales. El EPA que pertenece a la serie n-3 con cinco enlaces dobles en la cadena acilo, se encuentra en la comida marina, y es abundante en aceite de pescado en el Atlántico Norte. El AA pertenece a la serie n-6 con cuatro enlaces dobles. La carencia de un enlace doble en la posición ω -3 confiere diferentes propiedades AA que aquellas encontradas en EPA. Los eicosanoides producidos de AA tienen propiedades
 55 agregadas a plaqueta y fuertemente inflamatorias, mientras que aquellos derivados de EPA tienen propiedades

agregadas anti-plaqueta e anti-inflamatorias. Se puede obtener AA de algunos alimentos tal como carne, pescado, y huevos, pero la concentración es baja.

5 El ácido gama-linolénico (GLA) es otro ácido graso esencial encontrado en mamíferos. El GLA es el intermedio metabólico para ácidos grasos n-6 de cadena muy larga y para diversas moléculas activas. En los mamíferos, la formación de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga se limita en índice por la desaturación $\Delta 6$. Muchas afecciones o condiciones patológicas y fisiológicas tal como envejecimiento, estrés, diabetes, eczema, y algunas infecciones han mostrado que reducen la etapa de desaturación $\Delta 6$. Adicionalmente, el GLA se cataboliza fácilmente de la oxidación y división celular rápida asociada con ciertos trastornos, por ejemplo, cáncer o inflamación. Por lo tanto, la complementación dietética con GLA puede reducir los riesgos de estos trastornos. Los estudios clínicos han
10 mostrado que la complementación dietética con GLA es efectiva en tratar algunas afecciones patológicas tal como eczema atópico, síndrome premenstrual, diabetes, hipercolesterolemia, y trastornos cardiovasculares e inflamatorios.

15 Las fuentes predominantes de GLA son aceites de plantas tal como onagra (*Oenothera biennis*), borraja (*Borago officinalis* L.), grosella negra (*Ribes nigrum*), y de microorganismos tal como *Mortierella sp.*, *Mucor sp.*, y *Cyanobacteria*. Sin embargo, estas fuentes GLA no son ideales para complementación dietaria debido a grandes fluctuaciones en la disponibilidad y costes asociados con los procesos de extracción.

20 Las enzimas desaturasa, en particular desaturasa $\Delta 6$, se describen por ejemplo en el documento WO 00/20602, en el documento WO 98/46764, en Sayanova et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 94, 1 Abril 1997, páginas 4211-4216, en Sakuradani et al., Gene vol. 238, no. 2, 1 Enero 1999, páginas 445-453 y en Huang et al., Lipids vol. 34, no. 7, 1 Julio 1999, páginas 649-659.

Resumen de la invención

25 La biosíntesis de ácidos grasos es una actividad principal de plantas y microorganismos. Sin embargo, los humanos tienen una capacidad limitada para sintetizar ácidos grasos esenciales, por ejemplo, ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (LCPUFA). La biotecnología se ha considerado una forma eficiente para manipular el proceso para producir ácidos grasos en plantas y microorganismos. Es efectiva en costes y renovable con pocos efectos colaterales. Sin embargo, ha surgido tremendo esfuerzo industrial dirigido a la producción de diversos compuestos que incluyen ácidos grasos y polipéptidos farmacéuticos de especialidades a través de la manipulación de células de planta, animal, y microorganismos. De acuerdo con lo anterior, la biotecnología es una ruta atractiva para producir ácidos grasos insaturados, especialmente LCPUFA, en una forma segura, eficiente en costes con el fin de reunir
30 valor terapéutico máximo de estos ácidos grasos.

35 La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de una familia de moléculas de ácido nucleico que codifica las desaturasa novedosas. En particular, los actuales inventores han identificado el Fad6 (desaturasa $\Delta 6$) que está implicada en la biosíntesis de los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga DHA (ácido docosahexaenoico, 22:6, n-3) y DPA (ácido docosapentaenoico, 22:5, n-6); más específicamente, las desaturasa Fad6 18:2 (n-6) y 18:3(n-3) resultan en GLA (ácido gama- linolénico) y SDA (ácido estearidónico).

En un primer aspecto, la presente invención se dirige a una molécula aislada de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de:

- a) una molécula aislada de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, o un complemento de la misma;
- 40 b) una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, o un complemento de la misma;
- c) una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 65 % idéntica a la secuencia de nucleótidos completa de la SEQ ID NO: 7, o un complemento de la misma, en donde la molécula de ácido nucleico aislada codifica un polipéptido que tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$;
- 45 d) una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50 % idéntica a la secuencia de aminoácidos completa de la SEQ ID NO: 8, o un complemento de la misma, en donde el polipéptido tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$;
- 50 e) una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de por lo menos 30 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 7, o un complemento de la misma, en donde la molécula de ácido nucleico aislada codifica un polipéptido que tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$;

f) una molécula aislada de ácido nucleico que hibrida bajo condiciones exigentes al complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, o un complemento de la misma, en donde la molécula de ácido nucleico aislada codifica un polipéptido que tiene una actividad de desaturasa $\Delta 6$; y

5 g) una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un fragmento de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; en donde el fragmento tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$.

En un segundo aspecto, la presente invención se dirige a un polipéptido aislado seleccionada del grupo que consiste de:

a) un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

10 b) un polipéptido aislado codificada por una molécula de ácido nucleico que consiste de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, en donde el polipéptido aislado tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$;

c) un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50 % idéntica a la secuencia de aminoácidos completa de la SEQ ID NO: 8, en donde el polipéptido aislado tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$;

15 d) un polipéptido aislado que se codifica por una molécula de ácido nucleico que consiste de una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 65 % idéntica a la secuencia de nucleótidos completa de la SEQ ID NO: 7, en donde el polipéptido aislado tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$;

e) un polipéptido aislado que comprende un fragmento de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, en donde el fragmento tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$.

20 En una realización, la invención caracteriza una molécula aislada de ácido nucleico que incluye la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:7. En otra realización, la invención caracteriza una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:8.

25 En todavía otras realizaciones, la invención caracteriza moléculas de ácido nucleico aisladas que incluyen secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas (*por ejemplo*, 70% idénticas) a la secuencia de nucleótidos establecida como SEQ ID NO: 7. La invención caracteriza adicionalmente moléculas de ácido nucleico aisladas que incluye por lo menos 30 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 7. En otra realización, la invención caracteriza moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica (*por ejemplo*, 50% idénticas) a la secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 8. También se describen moléculas de ácido nucleico que codifican variantes alélicas del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 8. Además de las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos de longitud completa, la presente invención también caracteriza moléculas de ácido nucleico que codifican los fragmentos, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, de los polipéptidos de longitud completa de la presente invención (*por ejemplo*, fragmentos que incluyen por lo menos 10 residuos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8). En todavía otras realizaciones, la invención caracteriza moléculas de ácido nucleico que son complementarias a, o hibridan bajo condiciones exigentes a las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas aquí.

35 En un aspecto relacionado, la invención proporciona vectores que incluyen las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas aquí (*por ejemplo*, moléculas de ácido nucleico que codifican desaturasa). También se caracterizan células anfitrionas que incluyen dichos vectores (*por ejemplo*, células anfitrionas que incluyen vectores adecuados para producir moléculas de ácido nucleico de desaturasa y polipéptidos).

40 De acuerdo con el segundo aspecto, la invención caracteriza polipéptidos de desaturasa aislados y/o fragmentos de los mismos. Las realizaciones de ejemplo caracterizan un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 8, un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos por lo menos 50 % idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 8, un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico que consiste de una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 65 %, por ejemplo, por lo menos 70 % idéntica a la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 7. También se caracterizan fragmentos de los polipéptidos de longitud completa descritos aquí (*por ejemplo*, fragmentos que incluyen por lo menos 10 residuos de aminoácido contiguos de la secuencia establecida como la SEQ ID NO: 8).

50 En una realización, un polipéptido de desaturasa o fragmento del mismo tiene una actividad desaturasa. En otra realización, un polipéptido de desaturasa, o fragmento del mismo, tiene un motivo de unión hemo de terminal N, por ejemplo, un dominio similar a citocromo b5 encontrado en desaturasas de extremo frontal. En otra realización, un polipéptido de desaturasa, o fragmento del mismo, tiene por lo menos dos, preferiblemente aproximadamente tres, motivos de histidina conservadores encontrados en todas las desaturasas microsómicas y, opcionalmente, tiene una

actividad desaturasa. En una realización preferida, el polipéptido de desaturasa, o fragmento del mismo, tiene aproximadamente tres motivos histidina.

5 Las construcciones que contienen los genes de desaturasa se pueden utilizar en cualquier sistema de expresión que incluye plantas, animales, y microorganismos para la producción de células capaces de producir LCPUFA tal como DHA, EPA, AA, SDA, y GLA. Ejemplos de las plantas utilizadas para expresar las desaturasas de la presente invención incluyen, entre otras, plantas y semillas de plantas de cultivos de oleaginosas, por ejemplo, lino (*Linum* sp.), semilla de colza (*Brassica* sp.), soja (*Glycine* y *Soja* sp.), girasol (*Helianthus* sp.), algodón (*Gossypium* sp.), maíz (*Zea mays*), oliva (*Olea* sp.), alazor (*Carthamus* sp.), cacao (*Theobroma cacao*), y cacahuete (*Arachis* sp.).

10 En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona nuevos y mejorados métodos para producir ácidos grasos insaturados, *por ejemplo*, LCPUFA, y otros compuestos clave de la ruta biosintética de ácido graso insaturado utilizando células, *por ejemplo*, células de plantas; células de animal, y/o células microbianas en las que la ruta biosintética de ácido graso insaturado se ha manipulado de tal manera que se producen los LCPUFA u otros compuestos deseados de ácido graso insaturado.

15 Las nuevas y mejoradas metodologías de la presente invención incluyen métodos para producir ácidos grasos insaturados (*por ejemplo*, DHA) en células que tienen por lo menos una desaturasa de ácido graso de la ruta biosintética de ácido graso insaturado manipulada de tal manera que se producen los ácidos grasos insaturados (*por ejemplo*, producidos en un nivel aumentado). Por ejemplo, la invención caracteriza métodos para producir un ácido graso insaturado (*por ejemplo*, DHA) en células que comprenden por lo menos una molécula de ácido nucleico de desaturasa aislada, *por ejemplo*, Fad6, o una parte del mismo, como se describió anteriormente, de tal manera que se produce un ácido graso insaturado, *por ejemplo*, LCPUFA, *por ejemplo*, DHA. Dichos métodos pueden comprender adicionalmente la etapa de recuperar el LCPUFA.

20

25 En otra realización, la presente invención proporciona métodos para producir ácidos grasos insaturados, *por ejemplo*, LCPUFA, *por ejemplo*, DHA, que comprende poner en contacto una composición que comprende por lo menos una molécula objetivo desaturasa, como se define aquí, con por lo menos un polipéptido de desaturasa aislado, *por ejemplo*, Fad6, o una parte del mismo, como se describió anteriormente, bajo condiciones de tal manera que se produce un ácido graso insaturado, *por ejemplo*, LCPUFA, *por ejemplo*, DHA. Dichos métodos pueden comprender adicionalmente la etapa de recuperar el LCPUFA.

30 Los ácidos nucleicos, proteínas, y vectores descritos anteriormente son particularmente útiles en las metodologías de la presente invención. En particular, la invención caracteriza métodos para mejorar la producción de ácido graso insaturado (*por ejemplo*, producción de DHA) que incluye cultivar una planta recombinante, animal, y/o microorganismo que comprende un ácido nucleico de desaturasa, *por ejemplo*, Fad6, bajo condiciones de tal manera que se mejora la producción de ácido graso.

35 En otra realización, la presente invención caracteriza métodos para producir una célula capaz de producir ácidos grasos insaturados. Dichos métodos incluyen introducir dentro una célula, *por ejemplo*, una célula de planta, una molécula aislada de ácido nucleico como se describió anteriormente que codifica una proteína que tiene una actividad de catalizar la formación de un enlace doble en una cadena grasa acilo.

40 En otra realización, la presente invención caracteriza métodos para modular la producción de ácidos grasos que comprende cultivar una célula que comprende una molécula aislada de ácido nucleico como se describió anteriormente que codifica un polipéptido que tiene una actividad de catalizar la formación de un enlace doble, de tal manera que ocurre la modulación de la producción de ácido graso.

En otra realización, la presente invención incluye composiciones que comprenden los ácidos nucleicos de ácidos grasos insaturados o polipéptidos descritos aquí. Las composiciones de la presente invención también pueden comprender células capaces de producir dichos ácidos grasos, como se describió anteriormente, y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

45 En otra realización, las composiciones de la presente invención se utilizan como un complemento dietario, *por ejemplo*, en alimento para animal o como un nutracéutico. Las composiciones de la presente invención pueden permitir un método para tratar un paciente que tiene un trastorno, que comprende administrar la composición de tal manera que se trata el paciente. Los trastornos abarcados por dichos métodos incluyen, por ejemplo, estrés, diabetes, cáncer, trastornos inflamatorios, y trastornos cardiovasculares.

50 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Breve Descripción de los Dibujos

La figura 1 muestra la secuencia de proteína y ADN de Fad5-2 de *Pythium irregulare*; (A) la secuencia de cADN del marco de lectura abierta (SEQ ID NO: 5); y (B) la secuencia de proteína traducida (SEQ ID NO: 6).

La figura 2 muestra la secuencia de proteína y ADN de Fad6 de *Pythium irregulare*; (A) la secuencia de cADN del marco de lectura abierta (SEQ ID NO: 7); y (B) la secuencia de proteína traducida (SEQ ID NO: 8).

- 5 La figura 3) muestra una comparación de las secuencias de proteína Fad5-2 y Fad6 de *Pythium irregulare* (SEQ ID NO: 6 y 8, respectivamente). La barra vertical indica la identidad de aminoácido. Los motivos conservados tal como los motivos de unión ricos en histidina y los motivos de unión hemo de citocromo b5 se destacan. Las dos flechas indican las ubicaciones de unión de los dos cebadores degenerados.

- 10 La figura 4 es un análisis GC de los FAME de la cepa de levadura Invsc2 que expresa Fad6 con el sustrato exógeno 18:2 (9, 12).

La figura 5 es un análisis MS del derivado del nuevo pico de la figura 14. La estructura de la dietilamida del nuevo ácido graso se muestra con valores m/z para iones que incluyen la unidad estructural amida. Los tres pares de iones en m/z, 156/168, 196/208, y 236/248 son diagnósticos para enlaces dobles en la posición Δ6, Δ9, y Δ12, respectivamente.

- 15 La figura 6 es un análisis GC de los FAME de semilla de *B. juncea* que expresa Fad6. Tres picos nuevos indican tres ácidos grasos Δ6 desaturados en semillas transgénicas.

La figura 7 muestra el porcentaje en peso de GLA (ácido γ- linolénico) y SDA (ácido estearidónico) acumulado en semillas transgénicas Fad6 de *B. juncea*.

- 20 La figura 8 muestra las composiciones de ácido graso de los lípidos de semilla de cinco estirpes transgénicas que expresan Fad6; SA= ácido esteárico; OA= ácido oleico; LA=ácido linoleico; GLA= ácido γ- linolénico; ALA=ácido α- linolénico; SDA=ácido estearidónico.

La figura 9 es una tabla que muestra el perfil de ácido graso de *Pythium irregulare*.

- 25 La figura 10 es una tabla que muestra la acumulación de ácidos grasos Δ6 desaturados en semillas de lino transgénicas (Solin y Normandy) que expresan Fad6 bajo el control del promotor napina. Los niveles de ácido graso se muestran como el porcentaje en peso de los ácidos grasos totales.

Descripción Detallada de la Invención

- 30 La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de miembros novedosos de la familia de desaturasa de ácido graso, denominados intercambiamente aquí como "desaturasas" o "desaturasa" de ácido nucleico y moléculas de proteínas (por ejemplo, Fad6). Estas moléculas novedosas son miembros de la familia de desaturasa de ácido graso y se expresan en los organismos que producen LCPUFA, por ejemplo, *Thraustochytrium*; *Pythium irregulare*, *Schizochytrium*, y *Crythecodinium*.

- 35 Como se utiliza aquí, el término "ácidos grasos" es reconocido en la técnica e incluye un ácido carboxílico basado en hidrocarburo de cadena larga. Los ácidos grasos son componentes de muchos lípidos que incluyen glicéridos. Los ácidos grasos que ocurren en forma natural más comunes son ácidos monocarboxílicos que tienen un número uniforme de átomos de carbono (16 o 18) y que pueden ser saturados o insaturados. Los ácidos grasos "insaturados" contienen enlaces dobles *cis* entre los átomos de carbono. Los ácidos grasos insaturados abarcados por la presente invención incluyen, por ejemplo, DHA, GLA, y SDA. Los ácidos grasos "poli-insaturados" contienen más de un enlace doble y los enlaces dobles se disponen en un sistema interrumpido por metileno (-CH=CHCH₂-CH=CH-).

- 40 Los ácidos grasos se describen aquí por un sistema de numeración en el que el número antes de la coma indica el número de átomos de carbono en el ácido graso, mientras que el número después de la coma es el número de enlaces dobles que están presentes. En el caso de los ácidos grasos insaturados, esto se sigue por un número en paréntesis que indica la posición de los enlaces dobles. Cada número en paréntesis es el átomo de carbono enumerado menor de los dos conectados por el enlace doble. Por ejemplo, se puede describir el ácido oleico como 18:1(9) y se puede describir el ácido linoleico como 18:2(9,12) que indica 18 carbonos, un enlace doble en el carbono 9, dos enlaces dobles en los carbonos 9 y 12, respectivamente.
- 45

Las etapas de control en la producción de ácidos grasos insaturados, es decir, la ruta biosintética de ácido graso insaturado, se catalizando por desaturasas de ácido graso asociadas con membrana, *por ejemplo*, Fad6. Específicamente, dichas enzimas catalizan la formación de enlaces dobles entre los átomos de carbono de una molécula de ácido graso. Como se utiliza aquí, el término "ruta biosintética de ácido graso insaturado" se refiere a una serie de reacciones químicas que conducen a la síntesis de un ácido graso insaturado *in vivo* o *in vitro*. Dicha ruta incluye una serie de etapas de desaturación y elongación que generan ácidos grasos insaturados y finalmente, los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga. Dichos ácidos grasos insaturados pueden incluir, GLA 18:3 (6,9,12), SDA 18:4 (6,9,12,15), AA 20:4 (5,8,11,14), EPA 20:5 (5,8,11,14,17), y DPA 22:5 (4,7,10,13,16), y DHA 22:6 (4,7,10,13,16,19).

Las desaturasas pueden contener un motivo de unión hemo y/o aproximadamente tres motivos de histidina conservadores, aunque pueden estar presentes dominios adicionales. Los miembros de la familia de desaturasa de ácido graso convierten los ácidos grasos saturados a ácidos grasos insaturados, *por ejemplo*, los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (LCPUFA), que son componentes de las membranas celulares de diversos tejidos y organelos en mamíferos (células inmunes, nervio, retina, y cerebro). Ejemplos de LCPUFA incluyen, entre otros, ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6(4,7,10,13,16,19)). Los estudios clínicos han mostrado que el DHA es esencial para el crecimiento y desarrollo del cerebro en los niños, y para el mantenimiento de la función cerebral normal en los adultos (Martinetz, M. (1992) J. Pediatr. 120:S129-S138). El DHA también tiene efectos en la función fotorreceptora implicada en el proceso de transducción de señal, activación de rodopsina, y desarrollo de bastones y conos (Giusto, N.M., et al. (2000) Prog. Lipid Res. 39:315-391). Adicionalmente, los efectos positivos del DHA también se encuentran en el tratamiento de enfermedades tales como hipertensión, artritis, aterosclerosis, depresión, trombosis y cánceres (Horrocks, L.A. y Yeo, Y.K. (1999) Pharmacol. Res. 40:211-215). Sin embargo, se pueden utilizar moléculas de desaturasa para producir los LCPUFA útiles en tratar trastornos caracterizados por el crecimiento aberrantemente regulado, proliferación, o diferenciación. Dichos trastornos incluyen cáncer, *por ejemplo*, carcinoma; sarcoma, o leucemia; angiogenia de tumor y metástasis; displasia esquelética; trastornos hepáticos; síndromes mielodisplásicos; y trastornos hematoyéticos y/o mieloproliferativos. Otros trastornos relacionados con angiogenia y que son, por lo tanto, trastornos asociados con desaturasa incluyen telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo 1, fibrodisplasia ossificans progresiva, fibrosis pulmonar idiopática, y síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber.

El término "familia" cuando se refiere a la proteína y las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pretende significar dos o más proteínas o moléculas de ácido nucleico que tienen un dominio o motivo estructural común y tienen suficiente homología de secuencia de nucleótidos o aminoácidos como se define aquí. Dichos miembros de la familia pueden ocurrir en forma natural o no natural y pueden ser de la misma o de una especie diferente. Por ejemplo, una familia puede contener una primera proteína de origen humano así como también otras proteínas distintas de origen humano o alternativamente, puede contener homólogos de origen no humano, *por ejemplo*, proteínas de rata o ratón. Los miembros de la familia también pueden tener características funcionales comunes.

Por ejemplo, la familia de las proteínas desaturasa de la presente invención comprende un motivo de unión hemo de citocromo b5. Como se utiliza aquí, el término "motivo de unión hemo" es una extensión de terminal N del dominio similar a citocromo b5 encontrado en desaturasas de extremo frontal.

En otra realización, los miembros de la familia de desaturasa de las proteínas incluyen "motivos de histidina" en la proteína, preferiblemente, aproximadamente tres o cuatro motivos de histidina. Como se utiliza aquí, el término "motivo de histidina" incluye un dominio de proteína que tiene por lo menos aproximadamente dos residuos de aminoácido histidina, preferiblemente aproximadamente tres o cuatro residuos de aminoácido de histidina, y se encuentra normalmente en todas las desaturasas microsómicas como el tercer motivo de histidina conservador.

Ejemplos de motivos de unión hemo de citocromo b5 y los motivo de histidina incluyen los residuos de aminoácido 42-47, 178-183, 215-220, y 400-405 de la SEQ ID NO: 8 como se muestra en la figura 3.

Las proteínas de desaturasa aisladas de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos suficientemente homóloga a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o se codifican por una secuencia de nucleótidos suficientemente homóloga a la SEQ ID NO: 7. Las proteínas de la invención se describen en la reivindicación 7. Como se utiliza aquí, el término "suficientemente homólogo" se refiere a una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos que contiene un número mínimo o suficiente de residuos de aminoácido idénticos o equivalentes (*por ejemplo*, un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar) o nucleótidos en una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos de tal manera que la primera y segunda secuencias de nucleótidos o aminoácidos comparten dominios o motivos estructurales comunes y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos que comparten los dominios estructurales comunes tienen por lo menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más homología o identidad a través de la secuencia de aminoácidos de los dominios y contienen por lo menos uno y preferiblemente dos dominios estructurales o motivos, se definen aquí como suficientemente homólogos. Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos que comparten por lo menos 50 %, 55 %, 60 %, 65

%, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más homología o identidad y que comparten una identidad funcional común se definen aquí como suficientemente homólogos.

5 En una realización preferida, una proteína de desaturasa incluye por lo menos uno o más de los siguientes dominios o motivos: un motivo de unión hemo y/o un motivo histidina y tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más homóloga o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. En todavía otra realización preferida, una proteína desaturasa incluye por lo menos uno o más de los siguientes dominios: un motivo de unión hemo y/o un motivo histidina, y se codifica por una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones de hibridación exigentes en un complemento de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7. En otra realización preferida, una proteína desaturasa incluye por lo menos un motivo de unión hemo y/o por lo menos aproximadamente tres motivos de histidina, y tiene un actividad desaturasa.

15 Como se utiliza intercambiamente aquí, una "actividad desaturasa," "actividad biológica de una desaturasa," o "actividad funcional de una desaturasa," incluye una actividad ejercida o mediada por una proteína desaturasa, polipéptido o molécula de ácido nucleico sobre una célula que responde desaturasa o sobre un sustrato de desaturasa, como se determina in vivo o in vitro, de acuerdo con técnicas estándar. En una realización, una actividad desaturasa es una actividad directa tal como una asociación con una molécula objetivo de desaturasa. Como se utiliza aquí, una "molécula objetivo" o "compañero de unión" es una molécula por ejemplo, una molécula implicada en la síntesis de los ácidos grasos insaturados, por ejemplo, un ácido graso intermedio, con el cual una proteína desaturasa se une o interactúa en naturaleza de tal manera que se logra una función mediada por desaturasa. Una actividad de desaturasa directa también incluye la formación de un enlace doble entre los átomos de carbono de una molécula de ácido graso para formar una molécula de ácido graso insaturado.

25 La secuencia de nucleótidos de la desaturasa $\Delta 5$ *Pythium irregulare*, Fad5-2, cADN y la secuencia de aminoácidos predicha codificada por el cADN Fad5-2 se muestran en la figura 1 y en las SEQ ID NOs: 5 y 6, respectivamente. El gen Fad5-2 *Pythium irregulare*, que tiene aproximadamente 1371 nucleótidos de longitud, codifica una proteína que tiene aproximadamente 456 residuos de aminoácido de longitud.

30 La secuencia de nucleótidos de la desaturasa $\Delta 6$ *Pythium irregulare*, Fad6, cADN y la secuencia de aminoácidos predicha codificada por el cADN Fad6 se muestran en la figura 2 y en la SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente. El gen Fad6 *Pythium irregulare*, que tiene aproximadamente 1383 nucleótidos de longitud, codifica una proteína que tiene aproximadamente 460 residuos de aminoácido de longitud.

Se describen diversos aspectos de la invención en detalle adicional en las siguientes subsecciones:

I. Moléculas de Ácido Nucleico Aisladas

35 Un aspecto de la invención pertenece a las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican las proteínas desaturasa o fragmentos de los mismos, descritos aquí que son fragmentos de ácido nucleico suficientes para uso como sondas de hibridación para identificar las moléculas de ácido nucleico que codifican desaturasa (*por ejemplo*, mARN de desaturasa) y fragmentos para uso como cebadores PCR para la amplificación y mutación de las moléculas de ácido nucleico de desaturasa. Como se utiliza aquí, el término "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (*por ejemplo*, cADN o ADN genómico) y moléculas de ARN (*por ejemplo*, mARN) y análogos de ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótido. La molécula de ácido nucleico puede ser ADN de hebra doble o de hebra sencilla, pero preferiblemente es ADN de hebra doble.

45 El término "molécula de ácido nucleico aislada" incluye moléculas de ácido nucleico que se separan de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Por ejemplo, con respecto al ADN genómico, el término "aislado" incluye moléculas de ácido nucleico que se separan del cromosoma con el cual el ADN genómico se asocia en forma natural. Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" es libre de las secuencias que flanquean en forma natural el ácido nucleico (*es decir*, secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico de desaturasa aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4kb, 3kb, 2kb, 1 kb, 0.5 kb o 0.1 kb de las secuencias de nucleótidos que flanquean en forma natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual se deriva el ácido nucleico. Más aún, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de cADN, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetizan químicamente.

55 Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, o una parte del mismo, se puede aislar utilizando técnicas de biología molecular estándar y la información de secuencia proporcionada aquí. Utilizando todo o una parte de la secuencia

de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 7, como sondas de hibridación, las moléculas de ácido nucleico de desaturasa se pueden aislar utilizando hibridación estándar y técnicas de clonación (por ejemplo, como se describe en Sambrook, J. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd; ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

- 5 Más aún, una molécula de ácido nucleico abarca toda o una parte de la SEQ ID NO: 7, se puede aislar por la reacción de cadena polimerasa (PCR) utilizando cebadores sintéticos de oligonucleótido basados en la secuencia de la SEQ ID NO: 7.

10 Un ácido nucleico de la invención se puede amplificar utilizando cADN, mRNA o alternativamente, ADN genómico, como una plantilla y cebadores de oligonucleótido apropiados de acuerdo con técnicas de amplificación PCR estándar. El ácido nucleico así amplificado se puede clonar en un vector apropiado y se caracteriza por análisis de secuencia de ADN. Adicionalmente, los oligonucleótidos que corresponden a las secuencias de nucleótidos de desaturasa se pueden preparar mediante técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automático.

15 En otra realización, la molécula de ácido nucleico consiste de la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 7.

20 En todavía otra realización, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7, o una parte de cualquiera de estas secuencias de nucleótidos. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 es una que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7, de tal manera que puede hibridar a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7, formando por lo tanto un dúplex estable.

25 En todavía otra realización, una molécula aislada de ácido nucleico de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 (*por ejemplo*, en la longitud completa de la secuencia de nucleótidos), o una parte o complemento de cualquiera de estas secuencias de nucleótidos. En una realización, una molécula de ácido nucleico de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que es por lo menos (o no mayor de) 50-100, 100-250, 250-500, 500-750, 750-1000, 1000-1250, 1250-1500, 1500-1750, 1750-2000, 2000-2250, 2250-2500, 2500-2750, 2750-3000, 3250-3500, 3500-3750 o más nucleótidos de longitud e hibrida bajo condiciones de hibridación exigentes aun complemento de una molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 7.

30 Más aún, la molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender solo una parte de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 7, por ejemplo, un fragmento que se puede utilizar como una sonda o cebador o un fragmento que codifica una parte de una proteína desaturasa, *por ejemplo*, una parte biológicamente activa de una proteína desaturasa. La secuencia de nucleótidos determinada de la clonación del gen desaturasa permite la generación de sondas y cebadores designados para uso en la identificación y/o clonación de otros miembros de la familia desaturasa, así como también homólogos desaturasa de otras especies. La sonda/ cebador (*por ejemplo*, oligonucleótido) normalmente comprende oligonucleótido sustancialmente purificado. El oligonucleótido normalmente comprende una región de la secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones exigentes a por lo menos aproximadamente 12 o 15, preferiblemente aproximadamente 20 o 25, más preferiblemente aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, o 75 nucleótidos consecutivos de una secuencia codificante de la SEQ ID NO: 7, de una secuencia anti-codificante de la SEQ ID NO: 7, o de una variante alélica que ocurre en forma natural o mutante de la SEQ ID NO: 7.

35 Las sondas o cebadores de ejemplo tienen por lo menos (o no más de) 12 o 15, 20 o 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 o más nucleótidos de longitud y/o comprenden nucleótidos consecutivos de una molécula aislada de ácido nucleico descrita aquí. También se describen sondas o cebadores que comprenden nucleótidos consecutivos o contiguos de una molécula aislada de ácido nucleico descrita aquí, pero por la diferencia de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 bases dentro de la secuencia de sonda o cebador. Las sondas con base en las secuencias de nucleótidos de desaturasa se pueden utilizar para detectar (*por ejemplo*, específicamente detectan) transcritos o secuencias genómicas que codifican las mismas o proteínas homólogas. La sonda puede comprender adicionalmente un grupo marcado unido a esta, *por ejemplo*, el grupo marcado puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un co-factor de enzima. También se proporciona un conjunto descrito de cebadores, *por ejemplo*, cebadores adecuados para uso en un PCR, que se pueden utilizar para amplificar una región seleccionada de una secuencia de desaturasa, *por ejemplo*, un dominio, región, sitio u otra secuencia descrita aquí. Los cebadores deben tener por lo menos 5, 10, o 50 pares base de longitud y menos de 100, o menos de 200, pares base de longitud. Los cebadores deben ser idénticos, o difieren por no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 bases cuando se compara con una secuencia descrita aquí o con la secuencia de una variante que ocurre en forma natural. Se pueden utilizar dichas sondas como una parte de un equipo de prueba diagnóstico para identificar células o tejido que expresa erróneamente una proteína de desaturasa, tal como al medir un nivel del ácido nucleico que codifica la

desaturasa en una muestra de células de un sujeto, *por ejemplo*, detectarlos niveles de mRNA de desaturasa o determinar si un gen de desaturasa genómico ha mutado o se ha eliminado.

5 Un fragmento de ácido nucleico que codifica una "parte biológicamente activa de una proteína desaturasa" se puede preparar al aislar una parte de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, que codifica un polipéptido que tiene una actividad biológica de desaturasa (las actividades biológicas de las proteínas desaturasa se describen aquí), expresando la parte codificada de la proteína desaturasa (*por ejemplo*, mediante expresión recombinante *in vitro*) y evaluando la actividad de la porción codificada de la proteína desaturasa. En una realización de ejemplo, la molécula de ácido nucleico tiene por lo menos 50-100, 100-250, 250-500, 500-700, 750-1000, 1000-1250, 1250-1500, 1500-1750, 1750-2000, 2000-2250, 2250-2500, 2500-2750, 2750-3000, 3250-3500, 3500-3750 o más nucleótidos de longitud y codifica una proteína que tiene una actividad desaturasa (como se describe aquí).

15 La invención abarca adicionalmente moléculas de ácido nucleico que difieren de la secuencia de nucleótidos mostrada en al SEQ ID NO: 7 debido a la degeneración del código genético y así codifica la misma proteína desaturasa como aquella codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en al SEQ ID NO: 7. En otra realización, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere mediante por lo menos 1, pero no más de 5, 10, 20, 50 o 100 residuos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos mostrada en al SEQ ID NO: 8. En todavía otra realización, la molécula de ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos de la desaturasa humana. Si se necesita alineación para esta comparación, las secuencias se deben alinear para homología máxima.

20 Las variantes de ácido nucleico pueden ser de ocurrencia en forma natural, tal como variantes alélicas (mismos locus), homólogos (diferentes locus), y ortólogos (diferentes organismos) o pueden ocurrir en forma no natural. Las variantes que ocurren en forma no natural se pueden hacer mediante técnicas de mutagenia, que incluye aquellas aplicadas a los polinucleótidos, células, u organismos. Las variantes pueden contener sustituciones de nucleótido, eliminaciones, inversiones e inserciones. La variación puede ocurrir en o las regiones codificantes y no codificantes. Las variaciones pueden producir las sustituciones de aminoácidos conservadoras y no conservadoras (cuando se compara en el producto codificado).

25 Las variantes alélicas resultan, *por ejemplo*, de polimorfismos de la secuencia de ADN dentro de una población (*por ejemplo*, la población humana) que conduce a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas desaturasa. Dichos polimorfismo genético en los genes de desaturasa pueden existir entre los individuos dentro de una población debido a la variación alélica natural.

30 Como se utiliza aquí, el término "gen" y "gen recombinante" se refiere a moléculas de ácido nucleico que incluyen un marco de lectura abierto que codifica una proteína desaturasa, *por ejemplo*, proteína desaturasa de oleaginosa, y adicionalmente puede incluir secuencia reguladoras no codificantes, e intrones.

35 También se describen moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una variante alélica que ocurre en forma natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, en donde la molécula de ácido nucleico hibrida a un complemento de una molécula de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 7, *por ejemplo*, bajos condiciones de hibridación exigentes.

40 Las variantes alélicas de desaturasa, *por ejemplo*, Fad6, incluyen las proteínas desaturasa funcionales o no funcionales. Las variantes alélicas funcionales son variantes de la secuencia de aminoácidos que ocurren en forma natural de la proteína desaturasa que mantiene la capacidad de, *por ejemplo*, (i) interactuar con un sustrato de desaturasa o molécula objetivo (*por ejemplo*, un ácido graso, *por ejemplo*, DHA); y/o (ii) forma un enlace doble entre átomos de carbono en un sustrato de desaturasa o molécula objetivo. Los ácidos grasos producidos por el ácido nucleico y las moléculas de proteína de la presente invención también son útiles en el tratamiento de trastornos tal como envejecimiento, estrés, diabetes, cáncer, trastornos inflamatorios (*por ejemplo*, artritis, eczema), y trastornos cardiovasculares. Las variantes alélicas funcionales contendrán normalmente solo una sustitución conservadora de uno o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, o una sustitución, eliminación o inserción de los residuos no críticos en las regiones no críticas de la proteína.

45 Las variantes alélicas no funcionales son variantes de la secuencia de aminoácidos que ocurren en forma natural de la proteína desaturasa, *por ejemplo*, Fad6, que no tienen la capacidad de, *por ejemplo*, (i) interactuar con un sustrato de desaturasa o molécula objetivo (*por ejemplo*, un ácido graso intermedio, tal como 18:4 (6,9,12,15)); y/o (ii) forman un enlace doble entre átomos de carbono en un sustrato de desaturasa o molécula objetivo. Las variantes alélicas no funcionales contendrán normalmente una sustitución no conservadora, una eliminación, o inserción, o truncación prematura de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, o una sustitución, inserción, o eliminación en los residuos críticos o las regiones críticas de la proteína.

55 La presente invención proporciona adicionalmente ortólogos (*por ejemplo*, ortólogos humanos de las proteínas desaturasa). Los ortólogos de las proteínas desaturasa *Pythium irregulare* son proteínas que se aíslan de otros

organismos y poseen el mismo sustrato de desaturasa o mecanismos de unión de la molécula objetivo, mecanismos de formación de enlace doble, mecanismos de modulación de crecimiento y el desarrollo del cerebro en los niños, mecanismos de mantenimiento de la función cerebral normal en adultos, la capacidad de afectar la función fotorreceptora implicada en el proceso de transducción de señal, capacidad de afectar la activación de rodopsina, mecanismos de desarrollo de bastones y/o conos, y/o mecanismos de modulación del crecimiento celular y/o proliferación de las proteínas desaturasas no humanas. Los ortólogos de las proteínas desaturasas *Pythium irregulare* se pueden identificar fácilmente como que comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga a la SEQ ID NO: 8.

Se describen aquí moléculas de ácido nucleico que codifican otros miembros de la familia desaturasa y, sin embargo, que tienen una secuencia de nucleótidos que difiere de las secuencias de desaturasas de la SEQ ID NO: 7 pretenden estar dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, otro cADN de desaturasa se puede identificar con base en la secuencia de nucleótidos de Fad6. Se describen aquí, moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas desaturasa de diferentes especies, y que, sin embargo, tienen una secuencia de nucleótidos que difiere de las secuencias de desaturasas de la SEQ ID NO: 7 pretenden estar dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, el cADN de desaturasa *Schizochytrium* o *Crythecodinium* se puede identificar con base en la secuencia de nucleótidos de un Fad6.

Las moléculas de ácido nucleico que corresponden a las variantes alélicas naturales y los homólogos de los cADN de desaturasa de la invención se pueden aislar con base en su homología a los ácidos nucleicos de desaturasa descritos aquí utilizando los cADN descritos aquí, o una parte del mismo, como una sonda de hibridación de acuerdo con técnicas de hibridación estándar bajo condiciones de hibridación exigentes.

Los ortólogos, homólogos y variantes alélicas se pueden identificar utilizando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, mediante hibridación a una molécula aislada de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, bajo condiciones de hibridación exigentes). Se describe aquí una molécula aislada de ácido nucleico que tiene por lo menos 15, 20, 25, 30 o más nucleótidos de longitud e hibrida bajo condiciones exigentes a la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, 3, 5, o 7. En otra realización, el ácido nucleico tiene por lo menos 50-100, 100-250, 250-500, 500-700, 750-1000, 1000-1250, 1250-1500, 1500-1750, 1750-2000, 2000-2250, 2250-2500, 2500-2750, 2750-3000, 3250-3500, 3500-3750 o más nucleótidos de longitud.

Como se utiliza aquí, el término "hibrida bajo condiciones exigentes" pretende describir condiciones para hibridación y lavado bajo las que las secuencias de nucleótidos que son significativamente idénticas u homólogas entre sí permanecen hibridadas entre sí. Preferiblemente, las condiciones son tales que las secuencias por lo menos aproximadamente 70 %, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 80 %, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 85 % o 90 % idénticas entre sí permanecen hibridadas entre sí. Dichas condiciones exigentes se conocen por aquellos expertos en la técnica y se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc. (1995), secciones 2, 4, y 6. Las condiciones exigentes adicionales se pueden encontrar en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), capítulos 7, 9, y 11. Un ejemplo no limitante, preferido de condiciones de hibridación exigentes incluye hibridación de cloruro de sodio 4X /citrate de sodio (SSC), en aproximadamente 65-70° C (o alternativamente hibridación en 4X SSC más 50 % de formamida a aproximadamente 42-50° C) seguido por uno o más lavados en 1X SSC, a aproximadamente 65-70° C. Un ejemplo no limitante, preferido de condiciones de hibridación altamente exigentes incluye hibridación en 1X SSC, a aproximadamente 65-70° C (o alternativamente hibridación en 1X SSC más 50 % de formamida a aproximadamente 42-50° C) seguido por uno o más lavados en 0.3X SSC, a aproximadamente 65-70° C. Un ejemplo no limitante, preferido de condiciones de hibridación de exigencia reducida incluyen hibridación en 4X SSC, a aproximadamente 50-60° C (o alternativamente hibridación en 6X SSC más 50 % de formamida a aproximadamente 40-45° C) seguido por uno o más lavados en 2X SSC, a aproximadamente 50-60° C. El intermedio de rangos para los valores mencionados anteriormente, por ejemplo, a 65-70° C o a 42-50° C también se pretenden abarcar por la presente invención. El SSPE (1 x SSPE es 0.15M NaCl, 10mM NaH₂PO₄, y 1.25mM EDTA, pH 7.4) se puede sustituir por SSC (1X SSC es 0.15M NaCl y 15mM de citrate de sodio) en los reguladores de hibridación y lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos después que se completa la hibridación. La temperatura de hibridación para los híbridos anticipados que tiene menos de 50 pares base de longitud debe ser 5-10° C menos que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, en donde el T_m se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para los híbridos de menos de 18 pares base de longitud, T_m(°C) = 2(# de bases A + T) + 4(# de bases G + C). Para los híbridos entre 18 y 49 pares base de longitud, T_m(°C) = 81.5 + 16.6(log₁₀[Na⁺]) + 0.41(%G+C) - (600/N), en donde N es el número de bases en el híbrido, y [Na⁺] es la concentración de iones de sodio en el regulador de hibridación ([Na⁺] para 1X SSC = 0.165 M). También se reconocerá por el practicante experto que se pueden agregar reactivos adicionales para hibridación y/o reguladores de lavado para reducir la hibridación no específica de las moléculas de ácido nucleico a las membranas, por ejemplo, membranas de nitrocelulosa o nylon, que incluye pero no se limita a agentes de bloqueo (por ejemplo, BSA o esperma de arenque o salmón portador de ADN), detergentes (por ejemplo, SDS), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), Ficoll, PVP y similares. Cuando se utilizan membranas de nylon, en particular, un ejemplo no limitante, preferido adicional de condiciones de hibridación exigentes es hibridación en 0.25-0.5M NaH₂PO₄, 7 % de SDS a aproximadamente 65° C, seguido por uno o más lavados a 0.02M NaH₂PO₄, 1 % de SDS a 65° C (ver por

ejemplo, Church and Gilbert (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991-1995), o alternativamente 0.2 X SSC, 1 % de SDS.

Preferiblemente, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención que hibrida bajo condiciones exigentes a la secuencia de la SEQ ID NO: 7 corresponde a una molécula de ácido nucleico que ocurre en forma natural. Como se utiliza aquí, una molécula de ácido nucleico "que ocurre en forma natural" se refiere a una molécula de ADN o de ARN que tiene una secuencia de nucleótidos que ocurre en la naturaleza (por ejemplo, codifica una proteína natural).

Además de las variantes alélicas que ocurren en forma natural de las secuencias de desaturasa que pueden existir en la población, el artesano experto apreciará adicionalmente que se pueden introducir cambios mediante mutación en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17, que conduce por lo tanto a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas desaturasa codificadas, sin alterar la capacidad funcional de las proteínas desaturasa. Por ejemplo, las sustituciones de nucleótido que conducen a las sustituciones de aminoácido en los residuos de aminoácido "no esenciales" se pueden hacer en la secuencia de la SEQ ID NO: 7. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que se puede alterar de la secuencia tipo natural de Fad6 (*por ejemplo*, la secuencia de la SEQ ID NO: 8) sin alterar la actividad biológica, mientras que se requiere un residuo de aminoácido "esencial" para actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de aminoácido que se conservan entre las proteínas desaturasa de la presente invención, *por ejemplo*, aquellas presentes en un motivo de unión hemo o un motivo histidina, se predice que son particularmente no susceptibles a alteración. Adicionalmente, los residuos de aminoácido adicionales que se conservan entre las proteínas desaturasa de la presente invención y otros miembros de la familia de desaturasa de ácido no son probablemente susceptibles para alteración.

De acuerdo con lo anterior, otro aspecto de la invención pertenece a moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas desaturasa que contienen cambios en los residuos de aminoácido que no son esenciales para actividad. Dichas proteínas desaturasa difieren de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, aún retienen la actividad biológica. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, en donde la proteína comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más homóloga a la SEQ ID NO: 8, *por ejemplo*, para la longitud completa de la SEQ ID NO: 8.

Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica una proteína desaturasa homóloga a la proteína de la SEQ ID NO: 8 se puede crear al introducir una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótido en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, de tal manera que una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácido se introducen en la proteína codificada. Las mutaciones se pueden introducir en la SEQ ID NO: 7 mediante técnicas estándar, tal como mutagenia dirigida a sitio y mutagenia mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácido conservadoras se hacen en uno o más residuos de aminoácido no esenciales predichos. Una "sustitución de aminoácido conservadora" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de los residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares se han identificado en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (*por ejemplo*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*por ejemplo*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (*por ejemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (*por ejemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (*por ejemplo*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*por ejemplo*, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Sin embargo, un residuo de aminoácido no esencial predicho en una proteína de desaturasa se reemplaza preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de todo o parte de una secuencia codificante de desaturasa, tal como mediante mutagenia de saturación, y los mutantes resultantes se pueden detectar para actividad biológica de desaturasa para identificar mutantes que retienen la actividad. Luego de mutagenia de la SEQ ID NO: 7, la proteína codificada se puede expresar recombinantemente y se puede determinar la actividad de la proteína.

Una proteína desaturasa mutante se puede evaluar por la capacidad de (i) interactuar con un sustrato de desaturasa o molécula objetivo (*por ejemplo*, un ácido graso intermedio); y/o (ii) forma un enlace doble entre los átomos de carbono en un sustrato de desaturasa o molécula objetivo.

II. Proteínas de Desaturasa Aisladas

Un aspecto de la invención pertenece a las proteínas de desaturasa aisladas o recombinantes y polipéptidos, y fragmentos de las mismas. En una realización, las proteínas de desaturasa naturales se pueden aislar de células o fuentes de tejido mediante un esquema de purificación apropiado utilizando técnicas de purificación de proteína estándar. En otra realización, las proteínas desaturasa se producen por técnicas de ADN recombinante. Alternativa a la expresión recombinante, una proteína desaturasa o polipéptido se puede sintetizar químicamente utilizando técnicas de síntesis de péptido estándar.

Una proteína "aislada" o "purificada" o la porción biológicamente activa de la misma es sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o la fuente de tejido de la que la proteína desaturasa se deriva, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente. La frase "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de la proteína desaturasa en la que la proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce recombinantemente. En una realización, la frase "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de la proteína desaturasa que tiene menos de aproximadamente 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, o 30 % (por peso seco) de la proteína no desaturasa (también denominado aquí como una "proteína contaminante"), más preferiblemente menos de aproximadamente 20 % de la proteína no desaturasa, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 10 % de la proteína no desaturasa, y más preferiblemente menos de aproximadamente 5 % de la proteína no desaturasa. Cuando la proteína desaturasa o la parte biológicamente activa de la misma se produce recombinantemente, también preferiblemente está sustancialmente libre del medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20 %, más preferiblemente menos de aproximadamente 10 %, y más preferiblemente menos de aproximadamente 5 % del volumen de la preparación de la proteína.

La frase "sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos" incluye preparaciones de la proteína desaturasa en la que la proteína se separa de los precursores químicos u otros químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. En una realización, la frase "sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos," incluye preparaciones de la proteína desaturasa que tiene menos de aproximadamente 30 % (por peso seco) de los precursores químicos o los químicos no desaturasa, más preferiblemente menos de aproximadamente 20 % de precursores químicos o químicos no desaturasa, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 10 % de precursores químicos o químicos no desaturasa, y más preferiblemente menos de aproximadamente 5 % de precursores químicos o químicos no desaturasa. Cabe entender que las proteínas o esta invención también pueden ser una forma que es diferente de sus proteínas que ocurren en forma natural correspondientes y/o que están aún en asociación con por lo menos algunos componentes celulares. Por ejemplo, la proteína se puede asociar con una membrana celular.

Como se utiliza aquí, una "parte biológicamente activa" de una proteína desaturasa incluye un fragmento de una proteína desaturasa que participa en una interacción entre una molécula de desaturasa y una molécula de no desaturasa (*por ejemplo*, un sustrato de desaturasa tal como ácido graso). Las porciones biológicamente activas de una proteína desaturasa incluyen secuencias de aminoácidos que comprenden péptidos suficientemente homólogas a o que se derivan de las secuencias de aminoácido de desaturasa, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en al SEQ ID NO: 8 que incluye suficientes residuos de aminoácido para exhibir por lo menos una actividad de una proteína desaturasa. Normalmente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con por lo menos una actividad de la proteína desaturasa; la capacidad de (i) interactuar con un sustrato de desaturasa o molécula objetivo (*por ejemplo*, un ácido graso intermedio); y/o (ii) formar un enlace doble entre átomos de carbono en un sustrato de desaturasa o molécula objetivo. Una parte biológicamente activa de una proteína desaturasa puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200 o más aminoácidos de longitud.

En una realización, una parte biológicamente activa de una proteína desaturasa comprende un motivo de unión hemo y/o por lo menos un motivo de histidina, preferiblemente aproximadamente tres motivos de histidina. Más aún, otras porciones biológicamente activas, en las que otras regiones de la proteína se eliminan, se pueden preparar mediante técnicas recombinantes y se evalúan para una o más de las actividades funcionales de una proteína desaturasa natural.

En una realización preferida, una proteína desaturasa tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en al SEQ ID NO: 8. En otras realizaciones, la proteína desaturasa es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 8 y retiene la actividad funcional de la proteína de la SEQ ID NO: 8, aún difiere en la secuencia de aminoácidos debido a la variación alélica natural o mutagenia, como se describe en detalle en la subsección I anterior. En otra realización, la proteína desaturasa es una proteína comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la SEQ ID NO: 8.

En otra realización, la invención caracteriza una proteína desaturasa que se codifica por una molécula de ácido nucleico que consiste de una secuencia de nucleótidos por lo menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, o un complemento de la misma. Esta invención caracteriza adicionalmente una proteína de desaturasa que se codifica por una molécula de ácido nucleico que consiste de una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones de hibridación exigentes a un complemento de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, o un complemento de la misma.

Para determinar el porcentaje de identidad de las dos secuencias de aminoácido o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (*por ejemplo*, se pueden introducir

espacios en uno o ambos de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para alineación óptima y las secuencias no homólogas se pueden tener en cuenta para propósitos de comparación). En una realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada para propósitos de comparación es por lo menos 30 %, preferiblemente por lo menos 40 %, más preferiblemente por lo menos 50 %, incluso más preferiblemente por lo menos 60 %, e incluso más preferiblemente por lo menos 70 %, 80 %, o 90 % de la longitud de la secuencia de referencia (*por ejemplo*, cuando se alinea una segunda secuencia a la secuencia de aminoácidos Fad6 de la SEQ ID NO: 8 que tiene 460 residuos de aminoácido, por lo menos 138, se alinean preferiblemente por lo menos 184, más preferiblemente por lo menos 230, incluso más preferiblemente por lo menos 276, e incluso más preferiblemente por lo menos 322, 368, o 414 residuos de aminoácido). Los residuos de aminoácido o nucleótidos en las posiciones de aminoácido correspondientes o las posiciones de nucleótido luego se comparan. Cuando se ocupa una posición en la primera secuencia por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esta posición (como se utiliza aquí la "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a la "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, tomando en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que necesitan ser introducidos para la alineación óptima de las dos secuencias.

La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias se puede llevar a cabo utilizando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En todavía otra realización preferida, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de nucleótidos se determina utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de espacio de 40, 50, 60, 70, o 80 y una longitud de espacio de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. Un ejemplo no limitante, preferido de los parámetros que se van a utilizar en conjunto con el programa GAP incluyen una matriz de clasificación Blosum 62 con una penalidad gap de 12, una penalidad gap extendida de de 4, y una penalidad gap de cambio de estructura de 5.

En otra realización, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Meyers and Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0 o versión 2.0U), utilizando una tabla de residuo en peso PAM120, una penalidad de longitud gap de 12 y una penalidad gap de 4.

Las secuencias de proteínas y ácidos nucleicos de la presente invención se pueden utilizar adicionalmente como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda contra la base de datos pública para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden realizar utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Se pueden realizar las búsquedas de nucleótido BLAST con el programa NBLAST, clasificación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener las secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de desaturasa de la invención. Se pueden realizar búsquedas de la proteína BLAST con el programa XBLAST, clasificación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener las secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de la proteína desaturasa de la invención. Para obtener las alineaciones gap para propósitos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (*por ejemplo*, XBLAST y NBLAST). Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

45 III. Métodos para Producir Ácidos Grasos Insaturados

La presente invención proporciona nuevos y métodos mejorados para producir ácidos grasos insaturados, por ejemplo, LCPUFA, tal como, DHA (ácido docosahexaenoico, 22:6 (n-6)), DPA (ácido docosapentaenoico, 22:5 (n-6)), AA (ácido araquidónico, 20: 4 (n-6)) y EPA (ácido eicosapentaeniico, 20:5(n-3)).

A. Células Recombinantes y Métodos para Cultivar Células

50 La presente invención caracteriza adicionalmente vectores recombinantes que incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican los productos de gen como se describe aquí, preferiblemente los productos de gen Fad4, Fad5, Fad5-2, y Fad6. El término vector recombinante incluye un vector (*por ejemplo*, plásmido) que se ha alterado, modificado o construido por ingeniería de tal manera que contiene secuencias de ácidos nucleicos mayores, menores o diferentes que aquellas incluidas en el vector natural o plásmido. En una realización, un vector recombinante incluye la secuencia de ácido nucleico que codifican por lo menos una enzima de desaturasa de ácido graso ligada operablemente a las secuencias reguladoras. La frase "ligado operablemente a las secuencias reguladoras" significa que la secuencia de nucleótidos de interés se une a las secuencias reguladoras en una forma que permite la expresión (*por ejemplo*, expresión mejorada, aumentada, constitutiva, basal, atenuada, reducida o

reprimida) de la secuencia de nucleótidos, preferiblemente la expresión de un producto de gen codificado por la secuencia de nucleótidos (*por ejemplo*, cuando se introduce el vector recombinante en una célula). Los vectores de ejemplo se describen en detalla adicional aquí así como también en, *por ejemplo*, Frascotti et al., Patente Estadounidense No. 5,721,137.

5 El término "secuencia reguladora" incluye secuencias de ácidos nucleicos que afectan (*por ejemplo*, modulan o regulan) la expresión de otras secuencias de ácidos nucleicos (no reguladoras). En una realización, una secuencia reguladora se incluye en un vector recombinante en una posición similar o idéntica y/o orientación con relación con un gen particular de interés como se observa para la secuencia reguladora y el gen de interés cuando aparece en la naturaleza, *por ejemplo*, en una posición y/o orientación natural. *Por ejemplo*, un gen de interés (*por ejemplo*, un gen Fad6) se puede incluir en un vector recombinante unido operablemente a una secuencia reguladora que acompaña o es adyacente al gen en el organismo natural (*por ejemplo*, ligado operablemente a la secuencia reguladora Fad6 "natural" (*por ejemplo*, al promotor Fad6 "natural"). Alternativamente, se puede incluir un gen de interés (*por ejemplo*, un gen Fad6) en un vector recombinante ligado operablemente a una secuencia reguladora que acompaña o es adyacente a otro gen (*por ejemplo*, uno diferente) en el organismo natural. *Por ejemplo*, se puede incluir un gen Fad6 en un vector ligado operablemente a las secuencias reguladoras no Fad4, Fad5, Fad5-2, o Fad6. Alternativamente, se puede incluir un gene de interés (*por ejemplo*, un gen Fad6) en un vector ligado operablemente a una secuencia reguladora de otro organismo. *Por ejemplo*, las secuencias reguladoras de otros microbios (*por ejemplo*, otras secuencias reguladoras bacterianas, secuencias reguladoras de bacteriófago y similares) se pueden unir operablemente a un gene de interés particular.

20 Las secuencias reguladoras preferidas incluyen promotores, mejoradores, señales de terminación y otros elementos de control de expresión (*por ejemplo*, los sitios de unión para las proteínas reguladoras transcripcionales y/o de traducción, *por ejemplo*, en el mRNA transcrito). Dichas secuencias reguladoras se describen, *por ejemplo*, en Sambrook, J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Las secuencias reguladoras incluyen aquellos que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en una célula (*por ejemplo*, promotores constitutivos y promotores constitutivos fuertes), aquellos que dirigen la expresión inducible de una secuencia de nucleótidos en una célula (*por ejemplo*, promotores inducibles, *por ejemplo*, promotores inducibles de xilosa) y aquellos que atenúan o reprimen la expresión de una secuencia de nucleótidos en una célula (*por ejemplo*, señales de atenuación o secuencias represoras). También está dentro del alcance de la presente invención regular la expresión de un gene de interés al retirar o eliminar las secuencias reguladoras. *Por ejemplo*, las secuencias implicadas en la regulación negativa de transcripción se pueden retirar de tal manera que se mejora la expresión de un gen de interés.

En una realización, un vector recombinante de la presente invención incluye secuencias de ácidos nucleicos que codifican por lo menos un producto de gen (*por ejemplo*, Fad6) ligado operablemente a un promotor o secuencia promotora.

En todavía otra realización, un vector recombinante de la presente invención incluye una secuencia terminadora o secuencias terminadoras (*por ejemplo*, secuencias terminadoras de transcripción). El término "secuencias terminadoras" incluye secuencias reguladoras que sirven para terminar la transcripción del mRNA. Las secuencias terminadoras (o terminadores de transcripción tándem) pueden servir adicionalmente para estabilizar el mRNA (*por ejemplo*, al agregar estructura al mRNA), *por ejemplo*, contra las nucleasas.

En todavía otra realización, un vector recombinante de la presente invención incluye secuencias de resistencia a antibióticos. El término "secuencias de resistencia a antibióticos" incluye secuencias que promueven o confieren resistencia a los antibióticos en el organismo anfitrión. En una realización, las secuencias de resistencia a antibióticos se seleccionan del grupo que consiste de secuencias *cat* (resistencia a cloramfenicol), *tet* (resistencia a tetraciclina), secuencias *erm* (resistencia a eritromicina), secuencias *neo* (resistencia a neomicina) y secuencias *spec* (resistencia a espectinomicina). Los vectores recombinantes de la presente invención pueden incluir adicionalmente secuencias de recombinación homólogas (*por ejemplo*, secuencias designadas para permitir la recombinación del gen de interés en el cromosoma del organismo anfitrión). *Por ejemplo*, se pueden utilizar las secuencias *amyE* como objetivos de homología para recombinación en el cromosoma anfitrión.

50 El término "célula manipulada" incluye una célula que se ha construido por ingeniería (*por ejemplo*, construido genéticamente por ingeniería) o modificado de tal manera que la célula tiene por lo menos una desaturasa de ácido graso, *por ejemplo*, Fad6, de tal manera que se produce un ácido graso insaturado. La modificación o construcción por ingeniería de dichos microorganismos pueden estar de acuerdo con cualquier metodología descrita aquí que incluye, pero no se limita a, desregulación de una ruta biosintética y/o la sobreexpresión de por lo menos una enzima biosintética. Una enzima "manipulada" (*por ejemplo*, una enzima biosintética "manipulada") incluye enzimas, es decir la expresión o producción la cual se ha alterado o modificado de tal manera que por lo menos un precursor en la dirección 5' o en la dirección 3', sustrato o producto de la enzima se altera o modifica, *por ejemplo*, cuando se compara con una enzima que ocurre en forma natural o tipo natural correspondiente.

El término "sobreexpresado" o "sobreexpresión" incluye la expresión de un producto de gen (*por ejemplo*, una desaturasa de ácido graso) en un nivel mayor que se expresa antes de la manipulación de la célula o en una célula comparable que no se ha manipulado. En una realización, la célula se puede manipular genéticamente (*por ejemplo*, construir genéticamente por ingeniería) para sobreexpresar un nivel del producto de gen mayor que aquel expresado antes de la manipulación de la célula o en una célula comparable que no se ha manipulado. La manipulación genética puede incluir, pero no se limita a, alterar o modificar las secuencias reguladoras o sitios asociados con la expresión de un gen particular (*por ejemplo*, al agregar promotores fuertes, promotores inducibles o promotores múltiples o al retirar secuencias reguladoras de tal manera que la expresión es constitutiva), modificar la ubicación cromosómica de un gen particular, alterar las secuencias de ácidos nucleicos adyacentes a un gen particular tal como un sitio de unión a ribosoma o terminador de transcripción, aumentar el número de copia de un gen particular, modificar las proteínas (*por ejemplo*, proteínas reguladoras, supresores, mejoradores, activadores transcripcionales y similares) implicadas en la transcripción de un gen particular y/o traducción de un producto de gen particular, o cualesquier otros medios convencionales para desregular la expresión de una rutina de gen particular en la técnica (que incluye pero no se limita al uso de moléculas de ácido nucleico anticodificantes, *por ejemplo*, para bloquear la expresión de las proteínas represoras).

En otra realización, la célula se puede manipular físicamente o ambientalmente para sobreexpresar un nivel de producto de gen mayor que el expresado antes de la manipulación de la célula o en una célula comparable que no se ha manipulado. *Por ejemplo*, una célula se puede tratar con o cultivar en la presencia de un agente conocido o se sospecha aumenta la transcripción de un gen particular y/o traducción de un producto de gen particular de tal manera que se mejoran o aumentan la transcripción y/o traducción. Alternativamente, una célula se puede cultivar a una temperatura seleccionada para aumentar la transcripción de un gen particular y/o la traducción de un producto de gen particular de tal manera que se mejoran o aumentan la transcripción y/o traducción.

El término "desregulado" o "desregulación" incluye la alteración o modificación de por lo menos un gen en una célula que codifica una enzima en una ruta biosintética, de tal manera que se altera o modifica el nivel o actividad de la enzima biosintética en la célula. Preferiblemente, por lo menos un gen que codifica una enzima en una ruta biosintética se altera o modifica de tal manera que mejora o aumenta el producto de gen. La frase "ruta desregulada" también puede incluir una ruta biosintética en la que más de un gen que codifica una enzima en la ruta biosintética se altera o modifica de tal manera que el nivel o actividad de más de una enzima biosintética se altera o modifica. La capacidad de "desregular" una ruta (*por ejemplo*, para desregular simultáneamente más de un gen en una ruta biosintética dada) en una célula surge de un fenómeno particular de células en las que más de una enzima (*por ejemplo*, dos o tres enzimas biosintéticas) se codifican por genes que ocurren adyacentes entre sí en una pieza contigua de material genético denominado como un "operón".

El término "operón" incluye una unidad coordinada de expresión de gen que contiene un promotor y posiblemente un elemento regulador asociado con uno o más, preferiblemente por lo menos dos, genes estructurales (*por ejemplo*, genes que codifican enzimas, *por ejemplo*, enzimas biosintéticas). La expresión de los genes estructurales se puede regular coordinadamente, *por ejemplo*, mediante proteínas reguladoras que se unen al elemento regulador o mediante anti-terminación de transcripción. Los genes estructurales se pueden transcribir para dar un mRNA único que codifica todas las proteínas estructurales. Debido a la regulación coordinada de los genes incluidos en un operón, la alteración o modificación del promotor único y/o el elemento regulador puede resultar en alteración o modificación de cada producto de gen codificado por el operón. La alteración o modificación del elemento regulador puede incluir, pero no se limita a retirar el promotor endógeno y/o los elementos reguladores, agregar promotores fuertes, promotores inducibles o promotores múltiples o retirar secuencias reguladoras de tal manera que se modifica la expresión del producto de gen, modificar la ubicación cromosómica del operón, alterar las secuencias de ácidos nucleicos adyacentes al operón o dentro del operón tal como un sitio de unión a ribosoma, aumentar el número de copia del operón, modificar las proteínas (*por ejemplo*, proteínas reguladoras, supresores, mejoradores, activadores transcripciones y similares) implicados en la transcripción del operón y/o la traducción de los productos de gen del operón, o cualesquier otros medios convencionales para desregular la expresión de genes de rutina en la técnica (que incluye pero no se limita al uso de moléculas de ácido nucleico anticodificantes, *por ejemplo*, para bloquear la expresión de las proteínas represoras). La desregulación también puede implicar alterar la región codificante de uno o más genes para producir, *por ejemplo*, una enzima que es resistente a la retroalimentación o tiene una actividad específica mayor o menor.

Una célula "recombinante" particularmente preferida de la presente invención se ha construido genéticamente por ingeniería para sobreexpresar un gen derivado de planta o producto de gen o un gen derivado microorgánicamente. El término "derivado de planta," "derivado microorgánicamente," o "derivado de," *por ejemplo*, incluye un gen que se encuentra en forma natural en un microorganismo o una planta, *por ejemplo*, una planta de oleaginosa, o un producto de gen (*por ejemplo*, Fad6) o que se codifica por un gen de planta o un gen de un microorganismo (*por ejemplo*, SEQ ID NO: 7 codificada).

Las metodologías de la presente invención caracterizan células recombinantes que sobreexpresan por lo menos una desaturasa de ácido graso.

En otra realización, una célula recombinante de la presente invención se ha construido por ingeniería genéticamente para sobreexpresar una desaturasa *Pythium irregulare* $\Delta 6$ (el producto de gen Fad6) (*por ejemplo*, una desaturasa de ácido graso que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o se codifica por una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7).

- 5 En otra realización, la invención caracteriza una célula (*por ejemplo*, una célula microbiana) que se ha transformado con un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de desaturasa de ácido graso (*por ejemplo*, una secuencia de ácidos nucleicos de desaturasa de ácido graso como se establece en la SEQ ID NO: 7).

Otro aspecto de la presente invención caracteriza un método para modular la producción de ácidos grasos que comprende células cultivadas transformadas por la molécula de ácido nucleico de la presente invención (*por ejemplo*, una desaturasa) de tal manera que ocurre la modulación de la producción de ácido graso (*por ejemplo*, se mejora la producción de ácidos grasos insaturados). El método para cultivar células transformadas por la molécula de ácido nucleico de la presente invención (*por ejemplo*, Fad6) para modular la producción de ácidos grasos se denomina aquí como "biotransformación." Los procesos de biotransformación pueden utilizar células recombinantes y/o desaturasas como se describe aquí. El término "proceso de biotransformación," también denominados aquí como "procesos de bioconversión," incluye procesos biológicos que resultan en la producción (*por ejemplo*, transformación o conversión) de cualquier compuesto (*por ejemplo*, sustrato, intermedio, o producto) que está en la dirección 5' de una desaturasa de ácido graso a un compuesto (*por ejemplo*, sustrato, intermedio, o producto) que está en la dirección 3' de una desaturasa de ácido graso, en particular, un ácido graso insaturado. En una realización, la invención caracteriza un proceso de biotransformación para la producción de un ácido graso insaturado que comprende poner en contacto una célula que sobreexpresa por lo menos una desaturasa de ácido graso con por lo menos un sustrato apropiado bajo condiciones de tal manera que se produce un ácido graso insaturado y, opcionalmente, recupera el ácido graso. En una realización preferida, la invención caracteriza un proceso de biotransformación para la producción de ácidos grasos insaturados que comprende poner en contacto una célula que sobreexpresa el Fad6 con un sustrato apropiado (*por ejemplo*, un ácido graso intermedio) bajo condiciones de tal manera que se produce un ácido graso insaturado (*por ejemplo*, DHA, SDA, o GLA) y, opcionalmente, recuperar el ácido graso insaturado. Las condiciones bajo las cuales un ácido graso insaturado se produce pueden incluir cualesquier condiciones que resultan en la producción deseada de un ácido graso insaturado.

Las células y/o enzimas utilizadas en las reacciones de biotransformación están en una forma que les permite realizar su función pretendida (*por ejemplo*, producir ácidos grasos deseados). Las células pueden ser células completas, o pueden ser solo aquellas porciones de las células necesarias para obtener el resultado final deseado. Las células se pueden suspender (*por ejemplo*, en una solución apropiada tal como soluciones o medios regulados), enjuagar (*por ejemplo*, enjuagar libres de medio para cultivar la célula), secar en acetona, inmovilizar (*por ejemplo*, con gel de poliacrilamida o k-carragenano o en soportes sintéticos, por ejemplo, glóbulos, matrices y similares), fijar, entrecruzados o permeabilizados (*por ejemplo*, tienen membranas permeabilizadas y/o paredes de tal manera que los compuestos, por ejemplo, sustratos, intermedios o productos pueden pasar más fácilmente a través de dicha membrana o pared). El tipo de célula puede ser cualquier célula capaz de ser utilizada dentro de los métodos de la invención, *por ejemplo*, células de planta, animal, o microbianas.

Un aspecto importante de la presente invención implica cultivar la planta recombinante o cultivar los microorganismos recombinantes descritos aquí, de tal manera que se produce un compuesto deseado (*por ejemplo*, un ácido graso insaturado deseado). El término "cultivar" incluye mantener y/o cultivar un microorganismo vivo de la presente invención (*por ejemplo*, mantener y/o cultivar un cultivo o cepa). En una realización, se cultiva un microorganismo en medio líquido. En otra realización, se cultiva un microorganismo en medio sólido o medio semi-sólido. En una realización preferida, se cultiva un microorganismo en el medio (*por ejemplo*, un medio líquido, estéril) que comprende nutrientes esenciales o beneficiosos para el mantenimiento y/o el cultivo del microorganismos (*por ejemplo*, fuentes de carbono o sustrato de carbono, por ejemplo carbohidratos complejos tal como granos o harina de granos, almidones, azúcares, alcoholes de azúcar, hidrocarburos, aceites, grasas, ácidos grasos, ácidos orgánicos y alcoholes; fuentes de nitrógeno, por ejemplo, proteínas vegetales, peptonas, péptidos y aminoácidos derivados de granos, oleaginosas y tubérculos, proteínas, péptidos y aminoácidos derivados de fuentes animales tal como carne, leche y subproductos de animales tal como peptonas, extractos de carne y hidrolizados de caseína; fuentes de nitrógeno inorgánicas tal como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio y fosfato de amonio; fuentes de fósforo, por ejemplo, ácido fosfórico, sales de sodio y potasio de los mismos; elementos traza, por ejemplo, magnesio, hierro, manganeso, calcio, cobre, zinc, boro, molibdeno, y/o sales de cobalto; así como también factores de cultivo tal como aminoácidos, vitaminas, promotores de crecimiento y similares).

Preferiblemente, se cultivan microorganismos bajo pH controlado. El término "pH controlado" incluye cualquier pH que resulta en la producción del producto deseado (*por ejemplo*, un ácido graso insaturado). En una realización, los microorganismos se cultivan a un pH de aproximadamente 7. En otra realización, los microorganismos se cultivan a un pH de entre 6.0 y 8.5. El pH deseado se puede mantener mediante cualquier número de métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

También preferiblemente, se cultivan microorganismos bajo aireación controlada. El término "aireación controlada" incluye suficiente aireación (*por ejemplo*, oxígeno) para resultar en la producción del producto deseado (*por ejemplo*, un ácido graso insaturado). En una realización, la aireación se controla al regular los niveles de oxígeno en el cultivo, por ejemplo, al regular la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. Preferiblemente, la aireación del cultivo se controla al agitar el cultivo. La agitación se puede proporcionar por un propulsor o equipo de agitación mecánica similar, al revolver o agitar el recipiente de cultivo (*por ejemplo*, fermentador) o mediante diversos equipos de bombeo. La aireación se puede controlar adicionalmente por el pasaje de aire estéril o oxígeno a través del medio (por ejemplo, a través de la mezcla de fermentación). También preferiblemente, los microorganismos de la presente invención se cultivan sin exceso de espuma (*por ejemplo*, por medio de la adición de agentes anti-espumantes).

Más aún, se pueden cultivar plantas o microorganismos bajo temperaturas controladas. El término "temperatura controlada" incluye cualquier temperatura que resulta en la producción del producto deseado (*por ejemplo*, un ácido graso insaturado). En una realización, las temperaturas controladas incluyen temperaturas entre 15° C y 95° C. En otra realización, las temperaturas controladas incluyen temperaturas entre 15° C y 70° C. Las temperaturas preferidas están entre 20° C y 55° C, más preferiblemente entre 30° C y 45° C o entre 30° C y 50° C.

Los microorganismos se pueden cultivar (*por ejemplo*, mantener y/o cultivar) en medio líquido y preferiblemente se cultivan, continuamente o intermitentemente, mediante métodos de cultivo convencionales tal como cultivo en pie, cultivo de tubo de ensayo, cultivo de agitación (*por ejemplo*, cultivo de agitación rotatorio, cultivo de matraz de agitación, etc.), cultivo de centrífuga de aireación, o fermentación. En una realización preferida, los microorganismos se cultivan en matraces de agitación. En una realización más preferida, los microorganismos se cultivan en un fermentador (*por ejemplo*, un proceso de fermentación). Los procesos de fermentación de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, métodos de fermentación continuos, de tanda de carga y de tanda. La frase "proceso de tanda" o "fermentación en tanda" se refiere a un sistema cerrado en el que la composición de medio, nutrientes, aditivos complementarios y similares se establece al inicio de la fermentación y no se somete a alteración durante la fermentación, sin embargo, se pueden hacer intentos para controlar dichos factores como pH y concentración de oxígeno para evitar la acidificación del medio en exceso y/o la muerte del microorganismo. La frase fermentación de "proceso de tanda de carga" o "tanda de carga" se refiere a una fermentación de tanda con la excepción que se agregan uno o más sustratos o complementos (*por ejemplo*, agregar en aumentos o continuamente) cuando progresa la fermentación. La frase "proceso continuo" o "fermentación continua" se refiere a un sistema en el que se agrega un medio de fermentación definido continuamente a un fermentador y una cantidad igual de medio utilizado o "acondicionado" se retira simultáneamente, preferiblemente para la recuperación del producto deseado (*por ejemplo*, un ácido graso insaturado). Se ha desarrollado una variedad de dichos procesos y se conocen bien en la técnica.

La frase "cultivar bajo condiciones tales que se produce un compuesto deseado (*por ejemplo*, un ácido graso insaturado, por ejemplo, DHA) " incluye mantener y/o cultivar plantas o microorganismos bajo condiciones (*por ejemplo*, temperatura, presión, pH, duración, etc.) apropiadas o suficientes para obtener la producción del compuesto deseado o para obtener los rendimientos deseados del compuesto particular que se va a producir. Por ejemplo, el cultivo se continúa durante un tiempo suficiente para producir la cantidad deseada de un ácido graso insaturado (*por ejemplo*, DHA). Preferiblemente, el cultivo se continúa durante un tiempo suficiente para lograr sustancialmente la producción máxima del ácido graso insaturado. En una realización, el cultivo se continúa durante aproximadamente 12 a 24 horas. En otra realización, el cultivo se continúa durante aproximadamente 24 a 36 horas, 36 a 48 horas, 48 a 72 horas, 72 a 96 horas, 96 a 120 horas, 120 a 144 horas, o más de 144 horas. En otra realización, el cultivo se continúa durante un tiempo suficiente para lograr los rendimientos de producción de los ácidos grasos insaturados, por ejemplo, las células se cultivan de tal manera que se producen por lo menos aproximadamente 15 a 20 g/L de ácidos grasos insaturados, por lo menos se producen aproximadamente 20 a 25 g/L ácidos grasos insaturados, por lo menos se producen aproximadamente 25 a 30 g/L ácidos grasos insaturados, por lo menos se producen aproximadamente 30 a 35 g/L ácidos grasos insaturados, por lo menos se producen aproximadamente 35 a 40 g/L ácidos grasos insaturados (*por ejemplo*, por lo menos aproximadamente 37 g/L ácidos grasos insaturados) o por lo menos se producen aproximadamente 40 a 50 g/L ácidos grasos insaturados. En todavía otra realización, los microorganismos se cultivan bajo condiciones tales que el rendimiento preferido de ácidos grasos insaturados, por ejemplo, un rendimiento en el rango establecido anteriormente, se produce en aproximadamente 24 horas, en aproximadamente 36 horas, en aproximadamente 48 horas, en aproximadamente 72 horas, o en aproximadamente 96 horas.

En la producción de ácidos grasos insaturados, puede ser deseable adicionalmente cultivar células de la presente invención en la presencia de sustratos biosintéticos de ácido graso complementarios. El término "sustrato biosintético de ácido graso complementario" incluye un agente o compuesto que, cuando se pone en contacto con una célula o se incluye en el medio de cultivo de una célula, sirve para mejorar o aumentar la biosíntesis del ácido graso insaturado. Los sustratos biosintéticos de ácidos grasos complementarios se pueden agregar en la forma de una solución o suspensión concentrada (*por ejemplo*, en un solvente adecuado tal como agua o regulador) o en la forma de un sólido (*por ejemplo*, en la forma de un polvo). Más aún, los sustratos biosintéticos de ácidos grasos complementarios de la presente invención se pueden agregar como una alícuota única, continuamente o intermitentemente durante un periodo dado.

La metodología de la presente invención puede incluir adicionalmente una etapa para recuperar un compuesto deseado (*por ejemplo*, un ácido graso insaturado). El término "recuperar" un compuesto deseado incluye extraer, cosechar, aislar o purificar el compuesto del medio de cultivo. La recuperación del compuesto se puede realizar de acuerdo con cualquier metodología de purificación o aislamiento convencional conocida en la técnica que incluye, pero no se limita a, tratamiento con una resina convencional (*por ejemplo*, resina de intercambio de anión o catión, resina de adsorción no iónica, etc.), tratamiento con un adsorbente convencional (*por ejemplo*, carbono activado, ácido silícico, gel de sílice, celulosa, alúmina, etc.), alteración del pH, extracción de solvente (*por ejemplo*, con un solvente convencional tal como un alcohol, acetato de etilo, hexano y similares), diálisis, filtración, concentración, cristalización, recristalización, ajuste de pH, liofilización y similares. Por ejemplo, se puede recuperar un compuesto del medio de cultivo al retirar primero los microorganismos del cultivo. El medio luego se pasa a través o alrededor de una resina de intercambio de catión para retirar cationes indeseados y luego a través o alrededor de una resina de intercambio de anión para retirar los aniones inorgánicos indeseados o ácidos orgánicos que tienen acidificaciones más fuertes que el ácido graso insaturado de interés (*por ejemplo*, DHA).

Preferiblemente, un compuesto deseado de la presente invención se "extrae," "aisla" o "purifica" de tal manera que la preparación resultante es sustancialmente libre de otros componentes (*por ejemplo*, libre de componentes de medio y/o subproductos de fermentación). La frase "sustancialmente libre de otros componentes" incluye preparaciones del compuesto deseado en el que el compuesto se separa (*por ejemplo*, se purifica o se purifica parcialmente) de los componentes del medio o los subproductos de fermentación del cultivo del, que se produce. En una realización, la preparación tiene más de aproximadamente 80 % (en peso seco) del compuesto deseado (*por ejemplo*, menos de aproximadamente 20 % de otros componentes del medio o subproductos de fermentación), más preferiblemente más de aproximadamente 90 % del compuesto deseado (*por ejemplo*, menos de aproximadamente 10 % de otros componentes del medio o subproductos de fermentación), aún más preferiblemente más de aproximadamente 95 % del compuesto deseado (*por ejemplo*, menos de aproximadamente 5 % de otros componentes del medio o subproductos de fermentación), y más preferiblemente más de aproximadamente 98-99 % del compuesto deseado (*por ejemplo*, menos de aproximadamente 1-2 % de otros componentes del medio o subproductos de fermentación). Cuando el compuesto deseado es un ácido graso insaturado que se ha derivado a una sal, el compuesto es preferiblemente adicionalmente libre (*por ejemplo*, sustancialmente libre) de los contaminantes químicos asociados con la formación de la sal. Cuando el compuesto deseado es un ácido graso insaturado que se ha derivado a un alcohol, el compuesto es preferiblemente adicionalmente libre (*por ejemplo*, sustancialmente libre) de los contaminantes químicos asociados con la formación del alcohol.

En una realización alternativa, el ácido graso insaturado deseado no se purifica de la planta o microorganismo, por ejemplo, cuando la planta o microorganismo es biológicamente no perjudicial (*por ejemplo*, segura). Por ejemplo, la planta o cultivo completo (o sobrenadante de cultivo) se puede utilizar como una fuente de producto (*por ejemplo*, producto crudo). En una realización, la planta o sobrenadante de cultivo (o sobrenadante de cultivo) se utiliza sin modificación. En otra realización, la planta o cultivo (o sobrenadante de cultivo) se concentra. En todavía otra realización, la planta o cultivo (o sobrenadante de cultivo) se pulveriza, se seca, o liofiliza.

B. Metodologías de Producción de Alto Rendimiento

Una realización particularmente preferida de la presente invención es un método de producción de alto rendimiento para producir ácidos grasos insaturados, *por ejemplo*, ADN, que comprende cultivar una planta o microorganismo manipulado bajo condiciones tales que se produce el ácido graso insaturado en un rendimiento significativamente alto. La frase "método de producción de alto rendimiento," por ejemplo, un método de producción de alto rendimiento para producir un compuesto deseado (*por ejemplo*, para producir un ácido graso insaturado) incluye un método que resulta en la producción del compuesto deseado en un nivel que es elevado o por encima del usual para métodos de producción comparables. Preferiblemente, un método de producción de alto rendimiento resulta en la producción del compuesto deseado en un rendimiento significativamente alto. La frase "rendimiento significativamente alto" incluye un nivel de producción o rendimiento que es suficientemente elevado o por encima del usual para métodos de producción comparables, por ejemplo, que es elevado a un nivel suficiente para la producción comercial del producto deseado (*por ejemplo*, la producción del producto en un coste comercialmente factible). En una realización, la invención caracteriza un método de producción de alto rendimiento para producir ácidos grasos insaturados que incluye cultivar una planta u microorganismo manipulado bajo condiciones de tal manera que un ácido graso insaturado se produce en un nivel de más de 2 g/L. En otra realización, la invención caracteriza un método de producción de alto rendimiento para producir ácidos grasos insaturados que incluye cultivar una planta o microorganismo manipulado bajo condiciones de tal manera que un ácido graso insaturado se produce a un nivel más de 10 g/L. En otra realización, la invención caracteriza un método de producción de alto rendimiento para producir ácidos grasos insaturados que incluye cultivar una planta o microorganismo manipulado bajo condiciones de tal manera que un ácido graso insaturado se produce a un nivel de más de 20 g/L. En todavía otra realización, la invención caracteriza un método de producción de alto rendimiento para producir ácidos grasos insaturados que incluye cultivar una planta o microorganismo manipulado bajo condiciones de tal manera que un ácido graso insaturado se produce a un nivel más de 30 g/L. En todavía otra realización, la invención caracteriza a método de producción de alto rendimiento para producir ácidos grasos insaturados que incluye cultivar una planta o

microorganismo manipulado bajo condiciones de tal manera que un ácido graso insaturado se produce a un nivel más de 40 g/L.

La invención caracteriza adicionalmente un método de producción de alto rendimiento para producir un compuesto deseado (*por ejemplo*, para producir un ácido graso insaturado) que implica cultivar una planta o microorganismo manipulado bajo condiciones de tal manera que se produce un nivel suficientemente elevado del compuesto dentro de un periodo comercialmente deseable. En una realización de ejemplo, la invención caracteriza un método de producción de alto rendimiento para producir ácidos grasos insaturados que incluye cultivar una planta o microorganismo manipulado bajo condiciones de tal manera que un ácido graso insaturado se produce a un nivel más de 15-20 g/L en 36 horas. En otra realización, la invención caracteriza un método de producción de alto rendimiento para producir ácidos grasos insaturados que incluye cultivar una planta o microorganismo manipulado bajo condiciones de tal manera que un ácido graso insaturado se produce a un nivel de más de 25-30 g/L en 48 horas. En otra realización, la invención caracteriza un método de producción de alto rendimiento para producir ácidos grasos insaturados que incluye cultivar una planta o microorganismo manipulado bajo condiciones de tal manera que un ácido graso insaturado se produce a un nivel más de 30-40 g/L en 60 horas, por ejemplo, más de 30, 35 o 40 g/L en 60 horas. Los valores y rangos incluidos y/o intermedios dentro de los rangos establecidos aquí también pretenden estar dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, la producción de ácido graso insaturado en niveles de por lo menos 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 y 39 g/L en 60 horas pretende estar incluida dentro del rango de 30-40 g/L en 60 horas. En otro ejemplo, los rangos de 30-35 g/L o 35-40 g/L pretenden estar incluidos dentro del rango de 30-40 g/L en 60 horas. Más aún, el artesano experto apreciará que cultivar un microorganismo manipulado para lograr un nivel de producción de, por ejemplo, "30-40 g/L en 60 horas" incluye cultivar el microorganismo durante periodos adicionales (por ejemplo, periodos mayores de 60 horas), que resulta opcionalmente en rendimientos incluso mayores de un ácido graso insaturado que se produce.

IV. Composiciones

Las moléculas de ácido nucleico de desaturasa, proteínas, y fragmentos de las mismas, de la invención se pueden utilizar para producir ácidos grasos insaturados que se pueden incorporar en composiciones. Las composiciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, composiciones para uso como alimentos para animal, composiciones para uso como nutracéuticos (por ejemplo, complementos dietarios), y composiciones farmacéuticas adecuadas para administración.

Dichas composiciones farmacéuticas comprenden normalmente un ácido graso insaturado y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza aquí la frase "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquier y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes de retraso de absorción e isotónicos, y similares, compatibles con administración farmacéutica. El uso de dicho medio y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto como cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones. Los compuestos activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su ruta pretendida de administración. Ejemplos de las rutas de administración incluyen administración parenteral, *por ejemplo*, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (*por ejemplo*, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa, y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol o otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tal como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tal como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tal como ácido etilendiaminatetraacético; reguladores tal como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tal como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o recipientes de dosis múltiple hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o inyectables estériles o dispersión. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina regulada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición puede ser estéril y debe ser fluida al grado que existe fácil inyectabilidad. Esta puede ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos tal como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de

dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tal como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada al incluir en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles al incorporar el compuesto activo (*por ejemplo*, un LCPUFA, o un fragmento del mismo, producido por el ácido nucleico y las moléculas de proteína de la presente invención) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización filtrada. De manera general, se preparan dispersiones al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado por vacío y secado por congelamiento que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada previamente estéril del mismo.

Las composiciones orales incluyen de manera general un diluyente inerte o un portador comestible. Estas se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimir en tabletas. Para el propósito administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y se utiliza en la forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas, las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un portador fluido para uso como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica oralmente y se agita y expectora o ingiere. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o se pueden incluir materiales de adyuvante como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un ligante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un aglutinante tal como dióxido de sílice coloidal; un agente endulzante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo, o sabor a naranja.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos se suministran en la forma de un rociado por aerosol del contenedor o dispensador presionado que contiene un propulsor adecuado, *por ejemplo*, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser mediante medios transmucosa o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, los penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear se utilizan en la formulación. Dichos penetrantes se conocen de manera general en la técnica, e incluyen por ejemplo, administración transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa se puede llevar a cabo a través del uso de rociadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, salvas, geles, o cremas como se conocen de manera general en la técnica.

Los compuestos también se pueden preparar en la forma de supositorios (*por ejemplo*, con bases de supositorio convencional tal como manteca de cacao y otros glúcidos) o enemas de retención para suministro rectal.

En una realización, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tal como vinil acetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para aquellos expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidas a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos víricos) también se pueden utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,522,811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; cada unidad que contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Esta especificación para las formas de dosificación unitaria se dicta mediante y directamente dependiente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Se puede determinar la toxicidad y eficacia terapéutica de dichos compuestos mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, *por ejemplo*, para determinar el LD₅₀ (la dosis letal a 50 % de la población) y el ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación de LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren compuestos que exhiben índices terapéuticos grandes. Aunque se pueden utilizar compuestos que exhiben efectos colaterales tóxicos, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de suministro que dirige dichos compuestos al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a células no infectadas y, por lo que, se reducen efectos colaterales.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y los estudios de animales se pueden utilizar en la formulación de un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación de dichos compuestos se basa preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen el ED₅₀ con poca o sin toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en los modelos de animal para lograr un rango de concentración de plasma circulante que incluye el IC₅₀ (*es decir*, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición máxima media de síntomas) como se determina en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar más exactamente dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto desempeño.

Como se define aquí, una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína o polipéptido (*es decir*, una dosificación efectiva) varía de aproximadamente 0.001 a 30 mg/kg de peso corporal, preferiblemente aproximadamente 0.01 a 25 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg de peso corporal, e incluso más preferiblemente aproximadamente 1 a 10 mg/kg, 2 a 9 mg/kg, 3 a 8 mg/kg, 4 a 7 mg/kg, o 5 a 6 mg/kg de peso corporal. El artesano experto apreciará que ciertos factores pueden influenciar la dosificación requerida para tratar efectivamente un sujeto, que incluye pero no se limita a la severidad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Más aún, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína, polipéptido, o anticuerpo puede incluir un tratamiento único o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos.

En un ejemplo preferido, un sujeto se trata con un LCPUFA en el rango de entre aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg de peso corporal, una vez a la semana entre aproximadamente 1 a 10 semanas, preferiblemente entre 2 a 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 a 7 semanas, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5, o 6 semanas. También se apreciará que la dosificación efectiva del anticuerpo, proteína, o polipéptido utilizado para el tratamiento se puede aumentar o reducir durante el curso de un tratamiento particular. Los cambios en la dosificación pueden resultar y serán evidentes a partir de los resultados de los ensayos diagnósticos como se describe aquí.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un contenedor, empaque, o dispensador junto con instrucciones para administración.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben constituir como limitantes.

EJEMPLOS

40 Materiales: Se compra *Pythium irregulare* del American type culture collection (12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852 USA) y se cultiva en un medio (Weete, J.D., et al. (1997) *Lipids* 32:839-845) a 24° C durante 7 días. Después se cosechan biomásas mediante centrifugación y se utilizan para aislamiento de ARN.

EJEMPLO 1: CONSTRUCCIÓN Y DETECCIÓN DE LA COLECCIÓN DE cADN

45 El ARN total se aísla de los materiales anteriores de acuerdo con Qiu y Erickson (Qiu, X. and Erickson, L. (1994) *Plant Mol. Biol. Repr.* 12:209-214). La colección de cADN se construye del ARN total. La primera hebra de cADN se sintetiza mediante transcriptasa inversa superíndice II de Gibco-BRL. La segunda hebra de cADN se sintetiza mediante polimerasa I de ADN de Stratagene. Después de fraccionamiento de tamaño, los insertos de cADN mayores de 1 kb se ligan en el vector λ Uni-Zap XR (Stratagene). Los ADN recombinantes luego se empaquetan con extracto de empaque Gigapack III Gold (Stratagene) y se colocan en placas en placas NZY. La colección resultante representa más de 5 x 10⁶ clones independientes. La detección de la colección de cADN se realiza de acuerdo con métodos estándar (Sambrook, J, Fritseh, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning - A laboratory manual.* (Cold Spring Harbor, New York, USA.)

EJEMPLO 2: RT-PCR

El cADN de hebra sencilla se sintetiza mediante transcriptasa inversa superscript II (Gibco-BRL) de ARB total y luego se utiliza como la plantilla para la reacción PCR con dos cebadores degenerados (El cebador delantero: GCXCA/GAXGAXCAC/ TCCXGGXGG y el cebador inverso: ATXTG/TXGGA/GA.AXAG/AG/ATGG/ATG). La amplificación PCR consiste de 35 ciclos con 1 min a 94° C, 1.5 min a 55 °C y 2 min a 72 °C seguido por una etapa de extensión a 72 °C durante 10 min. Los productos amplificados de 800 bp a 1000 bp se aíslan de gel de agarosa y se purifican mediante un equipo (purificación del gel Qiaex II, Qiagen), y se clonan posteriormente en el vector de clonación ta pCR@2.1 (Invitrogen). Los insertos clonados luego se secuencian mediante PRISM DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing System (Perkin Elmer/Applied Biosystems).

EJEMPLO 3: EXPRESIÓN DE FAD6 EN LEVADURA

10 Los marcos de lectura abiertos de Fad6 se amplifican mediante PCR utilizando la enzima Precision Plus (Stratagene) y se clonan en un vector de clonación ta (pCR@2.1, Invitrogen). Se ha confirmado que los productos PCR son idénticos a los cADN originales mediante secuenciamiento, los fragmentos luego se liberan mediante una digestión doble BamHI-EcoRI y se insertan en el vector de expresión de levadura pYES2 (Invitrogen) bajo el control del promotor inducible *GAL1*.

15 Las cepas de levadura InvSc2 (Invitrogen) se transforman con las construcciones de expresión utilizando el método de acetato de aluminio y los transformantes se seleccionan en placas de medio mínimo que carecen de uracilo (Gietz, D., et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20:1425; Covello, P.S. y Reed, D.W. (1996) Plant Physiol. 111:223-226).

Los transformantes primero se cultivan en medio mínimo que carece de uracilo y que contiene glucosa a 28° C. Después de cultivo durante la noche, las células se centrifugan, se lavan y se resuspenden en agua destilada. El medio mínimo que contiene 2 % de galactosa, con o sin 0.3 mM ácidos grasos de sustrato en la presencia de 0.1 % de tergitol, se inocula con la suspensión celular de transformante de levadura y se incuba a 20° C durante tres días, y luego 15 °C durante otros tres días.

EJEMPLO 4: ANÁLISIS DE ÁCIDO GRASO

25 Se cosechan *Pythium irregulare* y células de levadura y se lavan dos veces con agua destilada. Luego se agrega 2 mL de KOH metanólico (7.5 % w/v de KOH en 95 % de metanol) a los materiales y la mezcla que se sella en un tubo de cultivo de vidrio de 12 ml se calienta a 80° C durante 2 horas. Se agrega 0.5 mL de agua y la muestra se extrae dos veces con 2 mL de hexano para retirar los lípidos no saponificables. La fase acuosa restante luego se acidifica al agregar 1 mL de 6 N HCl y se extrae dos veces con 2 mL de hexano. Las fases de hexano se combinan y se secan bajo una corriente de nitrógeno. Se agrega 2 mL de 3 N HCl metanólico (SUPELCO, Supelco Park, Bellefonte, PA 16823-0048) y la mezcla se calienta a 80° C durante 2 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, se agrega 1 mL de 0.9 % de NaCl y la mezcla se extrae dos veces con 2 x 2 mL de hexano. El hexano combinado se evapora bajo nitrógeno. Los metil ésteres de ácido graso resultantes (FAME) se analizan mediante GC y GC-MS de acuerdo con Covello & Reed (Covello, P.S. y Reed, D.W. (1996) Plant Physiol. 111: 223-226).

35 Se realiza análisis GC/MS en modo EI estándar utilizando un espectrómetro de masa Fisons VG TRIO 2000 (VG Analytical, UK) controlado por el software Masslynx versión 2.0, acoplado con un cromatógrafo de gas Serie GC 8000. Una columna DB- 23 (30M x 0.25 mm i.d., 0.25 lmm de espesor de película, J&W Scientific, Folsom, CA) que se programa en temperatura a 180 °C durante 1 min, luego 4 C /min a 240 °C y se mantiene durante 15 minutos, se utiliza para análisis FAME.

EJEMPLO 5: TRANSFORMACIÓN DE BRASSICA JUNCEA Y LINO (LINUM USITATISSIMUM) Y TRATAMIENTO EXÓGENO DE ÁCIDO GRASO

40 Las hipocotiledóneas de plántulas de 5-6 días de *B. juncea* y lino se utilizan como explantes para inoculación con el *Agrobacterium tumefaciens* que aloja vectores binarios con los cADN de longitud completa bajo el control de los diferentes promotores. Se utilizan plántulas transgénicas de 20 días para el tratamiento exógeno de ácido graso. La plántula se divide en tres partes: hojas, tallos y raíces. Cada una se corta en piezas pequeñas y se pone en una placa de título de 24 pozos. A cada pozo, se agrega 2 mL de 0.05 % de sal de sodio de sustratos (NuCheck Prep Inc., Elysian, MN). La placa luego se incuba a 24° C durante 4 h con agitación gentil. Después de incubación, los tejidos de planta se lavan tres veces con agua y luego se utilizan para análisis de ácido graso.

EJEMPLO 6: PERFIL DE ÁCIDO GRASO DEL THRAUSCHYTRIUM SP.

50 El Thraustochytrium y *Pythium irregulare* ha llamado recientemente la atención de los científicos debido a su capacidad en la producción de LCPUFA tal como DHA, AA, EPA y DPA. La figura 8 muestra la composición de ácido graso de los lípidos aislados de cultivos de 7 días de *Pythium irregulare*. Como se muestra en las tablas, el

microorganismo contiene un amplio rango de ácidos grasos poli-insaturados, de las familias n-3 y n-6, de ácidos grasos A6 de 18 carbonos (ácido gama- linoléico y ácido estearónico). El organismo, especialmente *Thraustochytrium sp.*, parece contener un conjunto completo de enzimas de desaturación y elongación requeridas para la biosíntesis de DHA y DPA. La cepa carece de ácidos grasos poli-insaturados de 24 carbonos, los precursores propuestos para la síntesis de DHA y DPA en la ruta de Precher (Voss, A., et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:19995-20000; Mohammed, B.S., et al. (1997) Biochem. J. 326: 425-430). El ácido graso de 24 carbonos no puede estar implicado en la síntesis *in vivo* de ácidos grasos $\Delta 4$ de 22 carbonos tal como DHA y DPA en *Thraustochytrium sp.*

EJEMPLO 7: IDENTIFICACIÓN DE cADN QUE CODIFICAN LA DESATURASA DE "EXTREMO FRONTAL"

Para identificar los genes que codifican las desaturasas implicadas en la biosíntesis de LCFUFA en *Pythium irregulare*, se adopta una estrategia de clonación basada en PCR. Se diseñan dos cebadores degenerados para dirigir el motivo de unión hemo de la extensión de terminal N del dominio similar a cyt b5 en las desaturasas de extremo frontal y el tercer motivo de histidina conservador en todas las desaturasas microsómicas, respectivamente. La parte racional entre el diseño es que las desaturasas implicadas en la biosíntesis EPA y DHA en *Pythium irregulare*, deben tener estructura primaria similar como otras desaturasas de extremo frontal, es decir extensión de terminal N del dominio similar a cyt b5 en la desaturasa. Se identifican cuatro fragmentos de cADN de *Pythium irregulare* que codifican las proteínas de fusión que contienen el dominio similar a cyt b5 en el terminal N.

Para aislar los clones de cADN de longitud completa, se utilizan cuatro insertos como sondas para detectar colecciones de cADN de *Pythium irregulare*, que resulta en la identificación de diversos clones de cADN en cada grupo. El secuenciamiento de todos aquellos clones identifica cuatro cADN de longitud completa que se denominan como Fad4, Fad5, Fad5-2 y Fad6. El marco de lectura abierto de Fad5-2 de *Pythium irregulare* es 1371 bp y los códigos para 456 aminoácidos (Figura 1). El Fad6 de *Pythium irregulare* tiene 1383 bp de longitud y codifica 460 aminoácidos (Figura 2). La comparación de secuencia de las dos secuencias de *Pythium irregulare* muestran cerca de 39 % de similitud entre las proteínas deducidas (Figura 3).

Una búsqueda BLASTP™ de la base de datos de proteínas revela los siguientes hits para Fad6:

Fad 6 (459 residuos de aminoácido)

Blastp nr

No. de Acceso	Organismo	Descripción	Longitud	% de Identidad
AF110510	<i>Mortierella alpina</i>	Desaturasa de ácido graso $\Delta 6$	437	38
AB020032	<i>Mortierella alpina</i>	Desaturasa de ácido graso $\Delta 6$	437	38
AF306634	<i>Mortierella isabellina</i>	Desaturasa de ácido graso $\Delta 6$	437	38
AF307940	<i>Mortierella alpina</i>	Desaturasa de ácido graso $\Delta 6$	438	38
AJ250735	<i>Ceratodon purpureus</i>	Desaturasa de ácido graso $\Delta 6$	438	36

EJEMPLO 8: EXPRESIÓN DE FAD6 EN LEVADURA

Para confirmar la función de Fad6, la cepa anfitriona *S. cerevisiae* Invsc2 se transforma con un plásmido que contiene el marco de lectura abierto de Fad6 bajo el control del promotor inducible de galactosa, GAL1. Cuando el transformante de levadura se induce mediante galactosa en un medio que contiene ácido linoleico, se observa un pico extra en el cromatograma del FAME acumulado en los transformantes comparados con el control (Figura 4). Una comparación del cromatograma con aquellos estándares revelados que el pico tiene un tiempo de retención idéntico al ácido gama- linoléico estándar (GLA, 18: 3-6,9,12). Para confirmar la regioselectividad de los productos, los derivados de dietilamina de los ácidos grasos de la cepa expresada se analizan mediante GC-MS. La figura 15

muestra que el nuevo pico es de hecho GLA con tres enlaces dobles en las posiciones $\Delta 6$, $\Delta 9$, y $\Delta 12$. Los fragmentos principales de los carbonos n y n+1 que difieren por 12 D son diagnósticos de un enlace doble entre el carbono n+1 y n+2. Sin embargo, los fragmentos a 156 y 168, 196 y 208, y 236 y 248, indican enlaces dobles en las posiciones $\Delta 6$, $\Delta 9$, y $\Delta 12$, respectivamente. Estos resultados demuestran que el Fad6 es una desaturasa $\Delta 6$ que se convierte de ácido linoleico (18:2) a GLA en levadura.

EJEMPLO 9: EXPRESIÓN DE FAD6 EN LINO

Para producir ácidos grasos $\Delta 6$ desaturados en semillas de lino, se transforman dos tipos de lino con la construcción que contiene cADN Fad6 bajo el control de un promotor específico de semilla heterólogo (promotor napina *B. napus*). (Normandy) es un cultivo de oleaginosa industrial tradicional, mientras que el Tipo II (Solin) es un cultivo de oleaginosa derivado de mutagenia química del Tipo I. Se produce un total de veinte plantas transgénicas. La mayoría de transgénicos exhiben dos ácidos grasos novedosos cuyos tiempos de retención corresponden a GLA y SDA y constituyen 0.1 a 4.3 % de los ácidos grasos totales (Figura 10). El nivel de GLA en el tipo Solin transgénico es mayor que aquel del SDA, mientras que el GLA en Normandy transgénico es menor de SDA. Es comprensible debido a que el ácido linoleico es un ácido graso principal en semilla de lino Solin mientras que el ácido α -linolenico es un ácido graso principal en semillas Normandy.

EJEMPLO 10: EXPRESIÓN DE FAD6 EN B. JUNCEA

Para producir ácidos grasos $\Delta 6$ desaturados en semillas de *B. juncea*, *B. juncea* se transforman con la misma construcción utilizada en transformación de lino, es decir, Fad6 bajo el control del promotor napina *B. napus*. Se obtienen quince plantas transgénicas independientes. El análisis de ácido graso de las semillas transgénicas muestra que existen tres nuevos ácidos grasos en el cromatograma de gas de la mayor parte de transgénicos comparado con el control tipo natural (Figura 6). Se identifican tres ácidos grasos como 18:2(6,9) y 18:3(6,9,12), y 18:4(6,9,12,15). *B. juncea*, como lino, que también pueden expresar funcionalmente Fad6 de *P. irregulare*, introducir un enlace doble en la posición 6 del sustrato endógeno 18:1 (9), 18:2(9,12), y 18:3(6,9,12) que resulta en la producción de los ácidos grasos $\Delta 6$ correspondientes en las semillas transgénicas. Entre los tres nuevos ácidos grasos producidos en semillas transgénicas, el GLA es el más abundante uno, con un nivel en semillas transgénicas de 30 % a 38 % de los ácidos grasos totales. El siguiente componente más abundante es SDA, que cuenta para 3-10 % de los ácidos grasos totales en diversas estirpes transgénicas (Figura 7).

Las composiciones de ácido graso de las semillas transgénicas se muestran en la figura 8. Es claro que el alto nivel de producción de ácidos grasos $\Delta 6$ desaturados está en el coste de los dos ácidos grasos principales, ácido linoleico y ácidos linolénicos. Las proporciones de los ácidos oleicos y esteáricos en los transgénicos se reducen ligeramente, pero no se compara significativamente con aquellas en el control tipo natural. El contenido de ácido linoleico en los transgénicos se reduce dramáticamente. En el tipo natural no transformado, el ácido linoleico cuenta más de 40 % de los ácidos grasos totales en las semillas. En los transgénicos, el nivel se reduce a menos de 10 %. Como se compara con la reducción del ácido linoleico en los transgénicos, la reducción del ácido linolénico en los transgénicos es menos dramática, pero aún significativa. En el tipo natural no transformado, el ácido linolénico cuenta para más de 10 % de los ácidos grasos totales en las semillas mientras que en los transgénicos el nivel se reduce a menos de 5 %. Los dos ácidos grasos dramáticamente reducidos en semillas transgénicas son los sustratos de la desaturasa $\Delta 6$, y la reducción es el coste para producir dos ácidos grasos $\Delta 6$ desaturados correspondientes.

40 Equivalentes

Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas aquí.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bioriginal Food & Science Corp. et al.

45 <120> FAD4, FAD5, FAD5-2, y FAD6, MIEMBROS NOVEDOSOS DE LA FAMILIA DE DESATURASA DE ÁCIDO GRASO Y USOS DE LOS MISMOS

<130> BNZ-001PC

<140> PCT/IB01/02346

<141> 2001-09-28

ES 2 399 806 T3

<150> 60/236,303

<151> 2000-09-28

<150> 60/297,562

<151> 2001-06-12

5 <160> 10

<170> FastSEQ para Versión windows 4.0

<210> 1

<211> 1560

<212> ADN

10 <213> Thraustochytrium sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1560)

<221> variante

15 <222> 462

<223> Xaa = Gly

<400> 1

atg	acg	gtc	ggc	tac	gac	gag	gag	atc	ccg	ttc	gag	cag	gtc	cgc	gcg	48
Met	Thr	Val	Gly	Tyr	Asp	Glu	Glu	Ile	Pro	Phe	Glu	Gln	Val	Arg	Ala	
1				5					10					15		
cac	aac	aag	ccg	gat	gac	gcc	tgg	tgc	gcg	atc	cac	ggg	cac	gtg	tac	96
His	Asn	Lys	Pro	Asp	Asp	Ala	Trp	Cys	Ala	Ile	His	Gly	His	Val	Tyr	
			20					25					30			
gat	gtg	acc	aag	ttc	gcg	agc	gtg	cac	ccg	ggc	ggc	gac	att	atc	ctg	144
Asp	Val	Thr	Lys	Phe	Ala	Ser	Val	His	Pro	Gly	Gly	Asp	Ile	Ile	Leu	
		35					40					45				
ctg	gcc	gca	ggc	aag	gag	gcc	acc	gtg	ctg	tac	gag	act	tac	cat	gtg	192
Leu	Ala	Ala	Gly	Lys	Glu	Ala	Thr	Val	Leu	Tyr	Glu	Thr	Tyr	His	Val	
	50					55					60					
cgg	ggc	gtc	tcg	gac	gcg	gtg	ctg	cgc	aag	tac	cgc	atc	ggc	aag	ctg	240
Arg	Gly	Val	Ser	Asp	Ala	Val	Leu	Arg	Lys	Tyr	Arg	Ile	Gly	Lys	Leu	
65				70					75					80		
ccg	gac	ggc	caa	ggc	ggc	gcg	aac	gag	aag	gaa	aag	cgg	acg	ctc	tcg	288
Pro	Asp	Gly	Gln	Gly	Gly	Ala	Asn	Glu	Lys	Glu	Lys	Arg	Thr	Leu	Ser	
				85				90						95		
ggc	ctc	tcg	tcg	gcc	tcg	tac	tac	acg	tgg	aac	agc	gac	ttt	tac	agg	336
Gly	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Thr	Trp	Asn	Ser	Asp	Phe	Tyr	Arg	
			100				105						110			
gta	atg	cgc	gag	cgc	gtc	gtg	gct	cgg	ctc	aag	gag	cgc	ggc	aag	gcc	384
Val	Met	Arg	Glu	Arg	Val	Val	Ala	Arg	Leu	Lys	Glu	Arg	Gly	Lys	Ala	
		115					120					125				

ES 2 399 806 T3

cgc Arg	cgc Arg	gga Gly	ggc Gly	tac Tyr	gag Glu	ctc Leu	tgg Trp	atc Ile	aag Lys	gcg Ala	ttc Phe	ctg Leu	ctg Leu	ctc Leu	gtc Val	432
	130				135					140						
ggc Gly	ttc Phe	tgg Trp	agc Ser	tcg Ser	ctg Leu	tac Tyr	tgg Trp	atg Met	tgc Cys	acg Thr	ctg Leu	gac Asp	ccc Pro	tcg Ser	ttc Phe	480
145					150				155						160	
ggg Gly	gcc Ala	atc Ile	ctg Leu	gcc Ala	gcc Ala	atg Met	tcg Ser	ctg Leu	ggc Gly	gtc Val	ttt Phe	gcc Ala	gcc Ala	ttt Phe	gtg Val	528
				165					170					175		
ggc Gly	acg Thr	tgc Cys	atc Ile	cag Gln	cac His	gac Asp	ggc Gly	aac Asn	cac His	ggc Gly	gcc Ala	ttt Phe	gcc Ala	cag Gln	tcg Ser	576
			180					185					190			
cga Arg	tgg Trp	gtc Val	aac Asn	aag Lys	ggt Val	gcc Ala	ggg Gly	tgg Trp	acg Thr	ctc Leu	gac Asp	atg Met	atc Ile	ggc Gly	gcc Ala	624
		195					200					205				
agc Ser	ggc Gly	atg Met	acg Thr	tgg Trp	gag Glu	ttc Phe	cag Gln	cac His	gtc Val	ctg Leu	ggc Gly	cac His	cat His	ccg Pro	tac Tyr	672
	210					215					220					
acg Thr	aac Asn	ctg Leu	atc Ile	gag Glu	gag Glu	gag Glu	aac Asn	ggc Gly	ctg Leu	caa Gln	aag Lys	gtg Val	agc Ser	ggc Gly	aag Lys	720
225				230						235				240		
aag Lys	atg Met	gac Asp	acc Thr	aag Lys	ctg Leu	gcc Ala	gac Asp	cag Gln	gag Glu	agc Ser	gat Asp	ccg Pro	gac Asp	gtc Val	ttt Phe	768
			245					250					255			
tcc Ser	acg Thr	tac Tyr	ccg Pro	atg Met	atg Met	cgc Arg	ctg Leu	cac His	ccg Pro	tgg Trp	cac His	cag Gln	aag Lys	cgc Arg	tgg Trp	816
			260					265					270			
tac Tyr	cac His	cgt Arg	ttc Phe	cag Gln	cac His	att Ile	tac Tyr	ggc Gly	ccc Pro	ttc Phe	atc Ile	ttt Phe	ggc Gly	ttc Phe	atg Met	864
		275				280						285				
acc Thr	atc Ile	aac Asn	aag Lys	gtg Val	gtc Val	acg Thr	cag Gln	gac Asp	gtc Val	ggt Gly	gtg Val	gtg Val	ctc Leu	cgc Arg	aag Lys	912
	290					295				300						
cgg Arg	ctc Leu	ttc Phe	cag Gln	att Ile	gac Asp	gcc Ala	gag Glu	tgc Cys	cgg Arg	tac Tyr	gcg Ala	agc Ser	cca Pro	atg Met	tac Tyr	960
305				310						315				320		
gtg Val	gcg Ala	cgt Arg	ttc Phe	tgg Trp	atc Ile	atg Met	aag Lys	gcg Ala	ctc Leu	acg Thr	gtg Val	ctc Leu	tac Tyr	atg Met	gtg Val	1008
				325				330						335		
gcc Ala	ctg Leu	ccg Pro	tgc Cys	tac Tyr	atg Met	cag Gln	ggc Gly	ccg Pro	tgg Trp	cac His	ggc Gly	ctc Leu	aag Lys	ctg Leu	ttc Phe	1056
			340					345					350			
gcg Ala	atc Ile	gcg Ala	cac His	ttt Phe	acg Thr	tgc Cys	ggc Gly	gag Glu	gtg Val	ctc Leu	gca Ala	acc Thr	atg Met	ttc Phe	att Ile	1104
		355					360				365					
gtg Val	aac Asn	cac His	atc Ile	atc Ile	gag Glu	ggc Gly	gtc Val	tcg Ser	tac Tyr	gct Ala	tcc Ser	aag Lys	gac Asp	gcg Ala	gtc Val	1152
	370					375					380					
aag Lys	ggc Gly	acg Thr	atg Met	gcg Ala	ccg Pro	ccg Pro	aag Lys	acg Thr	atg Met	cac His	ggc Gly	gtg Val	acg Thr	ccc Pro	atg Met	1200
385				390						395				400		

ES 2 399 806 T3

aac aac acg cgc aag gag gtg gag gcg gag gcg tcc aag tct ggc gcc 1248
 Asn Asn Thr Arg Lys Glu Val Glu Ala Glu Ala Ser Lys Ser Gly Ala
 405 410 415

gtg gtc aag tca gtc ccg ctc gac gac tgg gcc gtc gtc cag tgc cag 1296
 Val Val Lys Ser Val Pro Leu Asp Asp Trp Ala Val Val Gln Cys Gln
 420 425 430

acc tcg gtg aac tgg agc gtc ggc tcg tgg ttc tgg aat cac ttt tcc 1344
 Thr Ser Val Asn Trp Ser Val Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser
 435 440 445

ggc ggc ctc aac cac cag att gag cac cac ctg ttc ccc ggr ctc agc 1392
 Gly Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Xaa Leu Ser
 450 455 460

cac gag acg tac tac cac att cag gac gtc ttt cag tcc acc tgc gcc 1440
 His Glu Thr Tyr Tyr His Ile Gln Asp Val Phe Gln Ser Thr Cys Ala
 465 470 475 480

gag tac ggc gtc ccg tac cag cac gag cct tcg ctc tgg acc gcg tac 1488
 Glu Tyr Gly Val Pro Tyr Gln His Glu Pro Ser Leu Trp Thr Ala Tyr
 485 490 495

tgg aag atg ctc gag cac ctc cgt cag ctc ggc aat gag gag acc cac 1536
 Trp Lys Met Leu Glu His Leu Arg Gln Leu Gly Asn Glu Glu Thr His
 500 505 510

gag tcc tgg cag cgc gct gcc tga 1560
 Glu Ser Trp Gln Arg Ala Ala *

<210> 2

<211> 519

<212> PRT

5 <213> Thraustochytrium sp.

<220>

<221> VARIANTE

<222> 462

<223> Xaa = Gly

10 <400> 2

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

ES 2 399 806 T3

Arg Trp Val 180 Asn Lys Val Ala Gly 185 Thr Leu Asp Met 190 Ile Gly Ala
 Ser Gly Met Thr Trp Glu Phe Gln His Val Leu Gly His His Pro Tyr
 Thr Asn Leu Ile Glu Glu Glu Asn Gly Leu Gln Lys Val Ser Gly Lys
 225 Lys Met Asp Thr Lys 230 Leu Ala Asp Gln Glu 235 Ser Asp Pro Asp Val Phe
 Ser Thr Tyr Pro Met Met Arg Leu His 250 Pro Trp His Gln Lys Arg Trp
 Tyr His Arg Phe Gln His Ile Tyr 265 Gly Pro Phe Ile Phe Gly Phe Met
 Thr Ile Asn Lys Val Val Thr 280 Asp Val Gly Val Val Leu Arg Lys
 290 Arg Leu Phe Gln Ile Asp Ala Glu Cys Arg Tyr Ala Ser Pro Met Tyr
 305 Val Ala Arg Phe Trp Ile Met Lys Ala Leu Thr Val Leu Tyr Met Val
 Ala Leu Pro Cys Tyr Met Gln Gly Pro Trp His Gly Leu Lys Leu Phe
 Ala Ile Ala His Phe Thr Cys Gly 345 Glu Val Leu Ala Thr Met Phe Ile
 Val Asn His Ile Ile Glu Gly Val Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ala Val
 370 Lys Gly Thr Met Ala Pro Pro Lys Thr Met His Gly Val Thr Pro Met
 385 Asn Asn Thr Arg Lys 390 Glu Val Glu Ala Glu Ala Ser Lys Ser Gly Ala
 Val Val Lys Ser Val Pro Leu Asp Asp Trp Ala Val Val Gln Cys Gln
 Thr Ser Val Asn Trp Ser Val Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser
 435 Gly Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Xaa Leu Ser
 450 His Glu Thr Tyr Tyr His Ile Gln Asp Val Phe Gln Ser Thr Cys Ala
 465 Glu Tyr Gly Val Pro Tyr Gln His Glu Pro Ser Leu Trp Thr Ala Tyr
 Trp Lys Met Leu Glu His Leu Arg Gln Leu Gly Asn Glu Glu Thr His
 Glu Ser Trp Gln Arg Ala Ala 505 510 515

<210> 3

<211> 1320

<212> ADN

5 <213> Thraustochytrium sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1320)

<400> 3

atg ggc aag ggc agc gag ggc cgc agc gcg gcg cgc gag atg acg gcc 48
 Met Gly Lys Gly Ser 5 Glu Gly Arg Ser Ala Ala Arg Glu Met Thr Ala 15
 1
 gag gcg aac ggc gac aag cgg aaa acg att ctg atc gag ggc gtc ctg 96
 Glu Ala Asn Gly 20 Asp Lys Arg Lys Thr 25 Ile Leu Ile Glu Gly Val Leu 30
 tac gac gcg acg aac ttt aag cac ccg ggc ggt tcg atc atc aac ttc 144
 Tyr Asp Ala Thr Asn Phe Lys His 40 Pro Gly Gly Ser Ile Ile Asn Phe 45
 35
 ttg acc gag ggc gag gcc ggc gtg gac gcg acg cag gcg tac cgc gag 192

10

ES 2 399 806 T3

Leu	Thr	Glu	Gly	Glu	Ala	Gly	Val	Asp	Ala	Thr	Gln	Ala	Tyr	Arg	Glu		
	50					55					60						
ttt	cat	cag	cgg	tcc	ggc	aag	gcc	gac	aag	tac	ctc	aag	tcg	ctg	ccg	240	
Phe	His	Gln	Arg	Ser	Gly	Lys	Ala	Asp	Lys	Tyr	Leu	Lys	Ser	Leu	Pro	80	
	65				70					75							
aag	ctg	gat	gcg	tcc	aag	gtg	gag	tcg	cgg	ttc	tcg	gcc	aaa	gag	cag	288	
Lys	Leu	Asp	Ala	Ser	Lys	Val	Glu	Ser	Arg	Phe	Ser	Ala	Lys	Glu	Gln	95	
				85					90								
gcg	cgg	cgc	gac	gcc	atg	acg	cgc	gac	tac	gcg	gcc	ttt	cgc	gag	gag	336	
Ala	Arg	Arg	Asp	Ala	Met	Thr	Arg	Asp	Tyr	Ala	Ala	Phe	Arg	Glu	Glu	110	
			100					105					110				
ctc	gtc	gcc	gag	ggg	tac	ttt	gac	ccg	tcg	atc	ccg	cac	atg	att	tac	384	
Leu	Val	Ala	Glu	Gly	Tyr	Phe	Asp	Pro	Ser	Ile	Pro	His	Met	Ile	Tyr	125	
		115					120					125					
cgc	gtc	gtg	gag	atc	gtg	gcg	ctc	ttc	gcg	ctc	tcg	ttc	tgg	ctc	atg	432	
Arg	Val	Val	Glu	Ile	Val	Ala	Leu	Phe	Ala	Leu	Ser	Phe	Trp	Leu	Met	140	
	130					135											
tcc	aag	gcc	tcg	ccc	acc	tcg	ctc	gtg	ctg	ggc	gtg	gtg	atg	aac	ggc	480	
Ser	Lys	Ala	Ser	Pro	Thr	Ser	Leu	Val	Leu	Gly	Val	Val	Met	Asn	Gly	160	
					150					155							
att	gcg	cag	ggc	cgc	tgc	ggc	tgg	gtc	atg	cac	gag	atg	ggc	cac	ggg	528	
Ile	Ala	Gln	Gly	Arg	Cys	Gly	Trp	Val	Met	His	Glu	Met	Gly	His	Gly	175	
				165					170					175			
tcg	ttc	acg	ggc	gtc	atc	tgg	ctc	gac	gac	cgg	atg	tgc	gag	ttc	ttc	576	
Ser	Phe	Thr	Gly	Val	Ile	Trp	Leu	Asp	Asp	Arg	Met	Cys	Glu	Phe	Phe	185	
			180					185					190				
tac	ggc	gtc	ggc	tgc	ggc	atg	agc	ggg	cac	tac	tgg	aag	aac	cag	cac	624	
Tyr	Gly	Val	Gly	Cys	Gly	Met	Ser	Gly	His	Tyr	Trp	Lys	Asn	Gln	His	200	
		195					200					205					
agc	aag	cac	cac	gcc	gcg	ccc	aac	cgc	ctc	gag	cac	gat	gtc	gat	ctc	672	
Ser	Lys	His	His	Ala	Ala	Pro	Asn	Arg	Leu	Glu	His	Asp	Val	Asp	Leu	210	
						215					220						
aac	acg	ctg	ccc	ctg	gtc	gcc	ttt	aac	gag	cgc	gtc	gtg	cgc	aag	gtc	720	
Asn	Thr	Leu	Pro	Leu	Val	Ala	Phe	Asn	Glu	Arg	Val	Val	Arg	Lys	Val	225	
					230					235					240		
aag	ccg	gga	tcg	ctg	ctg	gcg	ctc	tgg	ctg	cgc	gtg	cag	gcg	tac	ctc	768	
Lys	Pro	Gly	Ser	Leu	Leu	Ala	Leu	Trp	Leu	Arg	Val	Gln	Ala	Tyr	Leu	245	
				245					250					255			
ttt	gcg	ccc	gtc	tcg	tgc	ctg	ctc	atc	ggc	ctt	ggc	tgg	acg	ctc	tac	816	
Phe	Ala	Pro	Val	Ser	Cys	Leu	Leu	Ile	Gly	Leu	Gly	Trp	Thr	Leu	Tyr	260	
			260					265					270				
ctg	cac	ccg	cgc	tac	atg	ctg	cgc	acc	aag	cgg	cac	atg	gag	ttc	gtc	864	
Leu	His	Pro	Arg	Tyr	Met	Leu	Arg	Thr	Lys	Arg	His	Met	Glu	Phe	Val	275	
		275					280					285					
tgg	atc	ttc	gcg	cgc	tac	att	ggc	tgg	ttc	tcg	ctc	atg	ggc	gct	ctc	912	
Trp	Ile	Phe	Ala	Arg	Tyr	Ile	Gly	Trp	Phe	Ser	Leu	Met	Gly	Ala	Leu	290	
						295					300						
ggc	tac	tcg	ccg	ggc	acc	tcg	gtc	ggg	atg	tac	ctg	tgc	tcg	ttc	ggc	960	
Gly	Tyr	Ser	Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Gly	Met	Tyr	Leu	Cys	Ser	Phe	Gly	305	
				310						315					320		
ctc	ggc	tgc	att	tac	att	ttc	ctg	cag	ttc	gcc	gtc	agc	cac	acg	cac	1008	

ES 2 399 806 T3

Leu Gly Cys Ile Tyr Ile Phe Leu Gln Phe Ala Val Ser His Thr His
 325 330 335
 ctg ccg gtg acc aac ccg gag gac cag ctg cac tgg ctc gag tac gcg 1056
 Leu Pro Val Thr Asn Pro Glu Asp Gln Leu His Trp Leu Glu Tyr Ala
 340 345 350
 gcc gac cac acg gtg aac att agc acc aag tcc tgg ctc gtc acg tgg 1104
 Ala Asp His Thr Val Asn Ile Ser Thr Lys Ser Trp Leu Val Thr Trp
 355 360
 tgg atg tcg aac ctg aac ttt cag atc gag cac cac ctc ttc ccc acg 1152
 Trp Met Ser Asn Leu Asn Phe 375 Gln Ile Glu His His 380 Leu Phe Pro Thr
 370
 gcg ccg cag ttc cgc ttc aag gaa atc agt cct cgc gtc gag gcc ctc 1200
 Ala Pro Gln Phe Arg Phe Lys Glu Ile Ser Pro Arg Val Glu Ala Leu
 385 390 400
 ttc aag cgc cac aac ctc ccg tac tac gac ctg ccc tac acg agc gcg 1248
 Phe Lys Arg His Asn Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Pro Tyr Thr Ser Ala
 405 410 415
 gtc tcg acc acc ttt gcc aat ctt tat tcc gtc ggc cac tcg gtc gcc 1296
 Val Ser Thr Thr Phe Ala Asn Leu Tyr 425 Ser Val Gly His Ser Val Gly
 420 430
 gcc gac acc aag aag cag gac tga 1320
 Ala Asp Thr Lys Lys Gln Asp *

<210> 4

<211> 439

<212> PRT

5 <213> Thraustochytrium sp.

<400> 4

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

ES 2 399 806 T3

Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ala Leu Trp Leu Arg Val Gln Ala Tyr Leu
 Phe Ala Pro Val Ser Cys Leu Leu Ile Gly Leu Gly Trp Thr Leu Tyr
 Leu His Pro Arg Tyr Met Leu Arg Thr Lys Arg His Met Glu Phe Val
 Trp Ile Phe Ala Arg Tyr Ile Gly Trp Phe Ser Leu Met Gly Ala Leu
 Gly Tyr Ser Pro Gly Thr Ser Val Gly Met Tyr Leu Cys Ser Phe Gly
 Leu Gly Cys Ile Tyr Ile Phe Leu Gln Phe Ala Val Ser His Thr His
 Leu Pro Val Thr Asn Pro Glu Asp Gln Leu His Trp Leu Glu Tyr Ala
 Ala Asp His Thr Val Asn Ile Ser Thr Lys Ser Trp Leu Val Thr Trp
 Trp Met Ser Asn Leu Asn Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr
 Ala Pro Gln Phe Arg Phe Lys Glu Ile Ser Pro Arg Val Glu Ala Leu
 Phe Lys Arg His Asn Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Pro Tyr Thr Ser Ala
 Val Ser Thr Thr Phe Ala Asn Leu Tyr Ser Val Gly His Ser Val Gly
 Ala Asp Thr Lys Lys Gln Asp
 245 250 255
 260 265 270
 275 280 285
 290 295 300
 305 310 315
 320 325 330 335
 340 345 350
 355 360 365
 370 375 380
 385 390 395
 400 405 410 415
 420 425 430
 435

<210> 5

<211> 1371

<212> ADN

5 <213> Thraustochytrium sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1368)

<400> 5

atg acc gag aag gcg agt gac gag ttc acg tgg cag gag gtc gcc aag 48
 Met Thr Glu Lys Ala Ser Asp Glu Phe Thr Trp Gln Glu Val Ala Lys
 1 5 10 15
 cac aac acg gcc aag agc gcg tgg gtg atc atc cgc ggc gag gtg tac 96
 His Asn Thr Ala Lys Ser Ala Trp Val Ile Ile Arg Gly Glu Val Tyr
 20 25 30
 gac gtg acc gag tgg gcg gac aag cac ccg ggc ggc agc gag ctc atc 144
 Asp Val Thr Glu Trp Ala Asp Lys His Pro Gly Gly Ser Glu Leu Ile
 35 40 45
 gtc ctg cac tcc ggt cgt gaa tgc acg gac acg ttc tac tcg tac cac 192
 Val Leu His Ser Gly Arg Glu Cys Thr Asp Thr Phe Tyr Ser Tyr His
 50 55 60
 ccg ttc tcg aac cgc gcc gac aag atc ttg gcc aag tac aag atc gcc 240
 Pro Phe Ser Asn Arg Ala Asp Lys Ile Leu Ala Lys Tyr Lys Ile Gly
 65 70 75 80
 aag ctc gtg ggc ggc tac gag ttc ccg gtg ttc aag ccg gac tcg ggc 288
 Lys Leu Val Gly Gly Tyr Glu Phe Pro Val Phe Lys Pro Asp Ser Gly
 85 90 95
 ttc tac aag gaa tgc tcg gag cgc gtg gcc gag tac ttt aag acg aac 336
 Phe Tyr Lys Glu Cys Ser Glu Arg Val Ala Glu Tyr Phe Lys Thr Asn
 100 105 110
 aat ctg gac cca aag gcg gcg ttc gcg ggt ctc tgg cgc atg gtg ttc 384
 Asn Leu Asp Pro Lys Ala Ala Phe Ala Gly Leu Trp Arg Met Val Phe

10

ES 2 399 806 T3

	115		120		125																
	gtg Val	ttc Phe	gcg Ala	gtc Val	gcc Ala	gcg Ala	ctc Leu	gcg Ala	tac Tyr	atg Met	ggc Gly	atg Met	aat Asn	gag Glu	ctc Leu	atc Ile					432
			130				135					140									
	cct Pro	gga Gly	aac Asn	gtg Val	tac Tyr	gcg Ala	cag Gln	tac Tyr	gcg Ala	tgg Trp	ggc Gly	gtg Val	gtg Val	ttc Phe	ggt Gly	gtc Val					480
							150					155									
	ttc Phe	cag Gln	gcg Ala	ctg Leu	cca Pro	ttg Leu	ctg Leu	cac His	gtg Val	atg Met	cac His	gac Asp	tcg Ser	tcg Ser	cac His	gcg Ala					528
							165					170									
	gca Ala	tgc Cys	tcg Ser	agc Ser	agc Ser	cca Pro	gcg Ala	atg Met	tgg Trp	cag Gln	atc Ile	atc Ile	ggt Gly	cgt Arg	ggt Gly	gtg Val					576
							180														
	atg Met	gac Asp	tgg Trp	ttc Phe	gct Ala	ggc Gly	gcc Ala	agc Met	atg Met	gtg Val	tcg Ser	tgg Trp	ttg Leu	aac Asn	cag Gln	cac His					624
							200														
	ggt Val	gtg Val	ggc Gly	cac His	cac His	atc Ile	tac Tyr	acg Thr	aac Asn	gtc Val	gcg Ala	ggc Gly	gcg Ala	gac Asp	ccg Pro	gat Asp					672
							215														
	ctc Leu	ccg Pro	gtc Val	gac Asp	ttt Phe	gag Glu	agc Ser	gac Asp	gtg Val	cgc Arg	cgc Arg	atc Ile	gtg Val	cac His	cgc Arg	cag Gln					720
							230														
	gtg Val	ctg Leu	ctg Leu	ccg Pro	atc Ile	tac Tyr	aag Lys	ttc Phe	cag Gln	cac His	atc Ile	tac Tyr	ctg Leu	cca Pro	ccg Pro	ctc Leu					768
							245														
	tac Tyr	ggc Gly	gtg Val	ctg Leu	ggc Gly	ctc Leu	aag Lys	ttc Phe	cgc Arg	atc Ile	cag Gln	gac Asp	gtg Val	ttc Phe	gag Glu	acg Thr					816
							260														
	ttc Phe	gtg Val	tcg Ser	ctc Leu	acg Thr	aac Asn	ggc Gly	ccg Pro	gtg Val	cgt Arg	gtg Val	aac Asn	ccg Pro	cac His	ccg Pro	gtg Val					864
							280														
	tcg Ser	gac Asp	tgg Trp	gtg Val	caa Gln	atg Met	atc Ile	ttc Phe	gcc Ala	aag Lys	gcg Ala	ttc Phe	tgg Trp	acg Thr	ttc Phe	tac Tyr					912
							295														
	cgc Arg	atc Ile	tac Tyr	atc Ile	ccg Pro	ttg Leu	gcg Ala	tgg Trp	ctc Leu	aag Lys	atc Ile	acg Thr	ccg Pro	tcg Ser	acg Thr	ttc Phe					960
							310														
	tgg Trp	ggc Gly	gtg Val	ttt Phe	ttc Phe	ctc Leu	gcc Ala	gag Glu	ttc Phe	acc Thr	aca Thr	ggt Gly	tgg Trp	tac Tyr	ctc Leu	gcg Ala					1008
							325														
	ttc Phe	aac Asn	ttc Phe	cag Gln	gtg Val	agc Ser	cac His	gtc Val	tcg Ser	acc Thr	gag Glu	tgc Cys	gag Glu	tac Tyr	ccg Pro	tgc Cys					1056
							340														
	ggt Gly	gat Asp	gcg Ala	ccg Pro	tcg Ser	gcc Ala	gag Glu	gtc Val	ggt Gly	gac Asp	gag Glu	tgg Trp	gcg Ala	atc Ile	tcg Ser	cag Gln					1104
							360														
	gtc Val	aag Lys	tcg Ser	tcg Ser	gtg Val	gac Asp	tac Tyr	gcg Ala	cac His	ggc Gly	tcg Ser	ccg Pro	ctc Leu	gcg Ala	gcg Ala	ttc Phe					1152
							375														
	ctc Leu	tgc Cys	ggc Gly	gcg Ala	ctc Leu	aac Asn	tac Tyr	cag Gln	gtg Val	acc Thr	cac His	cac His	ttg Leu	tac Tyr	ccg Pro	ggc Gly					1200
	385						390														
	atc Ile	tca Ser	cag Gln	tac Tyr	cac His	tac Tyr	cct Pro	gcg Ala	atc Ile	gcg Ala	ccg Pro	atc Ile	atc Ile	atc Ile	gac Asp	gtg Val					1248
							405														
	tgc Cys	aag Lys	aag Lys	tac Tyr	aac Asn	atc Ile	aag Lys	tac Tyr	acg Thr	gtg Val	ctg Leu	ccg Pro	acg Thr	ttc Phe	acc Thr	gag Glu					1296
							420														
	gcg Ala	ctg Leu	ctc Leu	gcg Ala	cac His	ttc Phe	aag Lys	cac His	ctg Leu	aag Lys	aac Asn	atg Met	ggc Gly	gag Glu	ctc Leu	ggc Gly					1344
							435														
	aag Lys	ccc Pro	gtg Val	gag Glu	atc Ile	cac His	atg Met	ggt Gly	taa *	*	*										1371
							450														

<210> 6

<211> 456

<212> PRT

<213> Thraustochytrium sp.

5 <400> 6

Met Thr Glu Lys Ala Ser Asp Glu Phe Thr Trp Gln Glu Val Ala Lys
 1 His Asn Thr Ala Lys Ser Ala Trp Val Ile Ile Arg Gly Glu Val Tyr
 20 Asp Val Thr Glu Trp Ala Asp Lys His Pro Gly Gly Ser Glu Leu Ile
 35 Val Leu His Ser Gly Arg Glu Cys Thr Asp Thr Phe Tyr Ser Tyr His
 50 Pro Phe Ser Asn Arg Ala Asp Lys Ile Leu Ala Lys Tyr Lys Ile Gly
 65 Lys Leu Val Gly Gly Tyr Glu Phe Pro Val Phe Lys Pro Asp Ser Gly
 80 Phe Tyr Lys Glu Cys Ser Glu Arg Val Ala Glu Tyr Phe Lys Thr Asn
 100 Asn Leu Asp Pro Lys Ala Ala Phe Ala Gly Leu Trp Arg Met Val Phe
 115 Val Phe Ala Val Ala Ala Leu Ala Tyr Met Gly Met Asn Glu Leu Ile
 130 Pro Gly Asn Val Tyr Ala Gln Tyr Ala Trp Gly Val Val Phe Gly Val
 145 Phe Gln Ala Leu Pro Leu Leu His Val Met His Asp Ser Ser His Ala
 160 Ala Cys Ser Ser Ser Pro Ala Met Trp Gln Ile Ile Gly Arg Gly Val
 175 Met Asp Trp Phe Ala Gly Ala Ser Met Val Ser Trp Leu Asn Gln His
 190 Val Val Gly His His Ile Tyr Thr Asn Val Ala Gly Ala Asp Pro Asp
 205 Leu Pro Val Asp Phe Glu Ser Asp Val Arg Arg Ile Val His Arg Gln
 220 Val Leu Leu Pro Ile Tyr Lys Phe Gln His Ile Tyr Leu Pro Pro Leu
 235 Tyr Gly Val Leu Gly Leu Lys Phe Arg Ile Gln Asp Val Phe Glu Thr
 250 Phe Val Ser Leu Thr Asn Gly Pro Val Arg Val Asn Pro His Pro Val
 265 Ser Asp Trp Val Gln Met Ile Phe Ala Lys Ala Phe Trp Thr Phe Tyr
 280 Arg Ile Tyr Ile Pro Leu Ala Trp Leu Lys Ile Thr Pro Ser Thr Phe
 295 Trp Gly Val Phe Phe Leu Ala Glu Phe Thr Thr Gly Trp Tyr Leu Ala
 310 Phe Asn Phe Gln Val Ser His Val Ser Thr Glu Cys Glu Tyr Pro Cys
 325

Gly Asp Ala 340 Pro Ser Ala Glu Val 345 Gly Asp Glu Trp Ala 350 Ile Ser Gln
 355 Val Lys Ser Ser Val Asp Tyr Ala His Gly Ser Pro Leu Ala Ala Phe
 370 Leu Cys Gly Ala Leu Asn Tyr Gln Val Thr His His Leu Tyr Pro Gly
 385 Ile Ser Gln Tyr His Tyr Pro Ala Ile Ala Pro Ile Ile Ile Asp Val
 400 Cys Lys Lys Tyr Asn Ile Lys Tyr Thr Val Leu Pro Thr Phe Thr Glu
 415 Ala Leu Leu Ala His Phe Lys His Leu Lys Asn Met Gly Glu Leu Gly
 430 Lys Pro Val Glu Ile His Met Gly 440
 445 450 455

<210> 7

<211> 1380

ES 2 399 806 T3

<212> ADN

<213> Thraustochytrium sp.

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)...(1380)

<400> 7

atg	gtg	gac	ctc	aag	cct	gga	gtg	aag	cgc	ctg	gtg	agc	tgg	aag	gag	48
Met	Val	Asp	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Lys	Arg	Leu	Val	Ser	Trp	Lys	Glu	
1				5					10					15		
atc	cgc	gag	cac	gcg	acg	ccc	gcg	acc	gcg	tgg	atc	gtg	att	cac	cac	96
Ile	Arg	Glu	His	Ala	Thr	Pro	Ala	Thr	Ala	Trp	Ile	Val	Ile	His	His	
			20					25					30			
aag	gtc	tac	gac	atc	tcc	aag	tgg	gac	tcg	cac	ccg	ggg	ggc	tcc	gtg	144
Lys	Val	Tyr	Asp	Ile	Ser	Lys	Trp	Asp	Ser	His	Pro	Gly	Gly	Ser	Val	
		35					40					45				
atg	ctc	acg	cag	gcc	ggc	gag	gac	gcc	acg	gac	gcc	ttc	gcg	gtc	ttc	192
Met	Leu	Thr	Gln	Ala	Gly	Glu	Asp	Ala	Thr	Asp	Ala	Phe	Ala	Val	Phe	
	50				55					60						
cac	ccg	tcc	tcg	gcg	ctc	aag	ctg	ctc	gag	cag	ttc	tac	gtc	ggc	gac	240
His	Pro	Ser	Ser	Ala	Leu	Lys	Leu	Leu	Glu	Gln	Phe	Tyr	Val	Gly	Asp	
65					70					75					80	
gtg	gac	gaa	acc	tcc	aag	gcc	gag	atc	gag	ggg	gag	ccg	gcg	agc	gac	288
Val	Asp	Glu	Thr	Ser	Lys	Ala	Glu	Ile	Glu	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Asp	
				85					90					95		
gag	gag	cgc	gcg	gcg	cgc	gag	cgc	atc	aac	gag	ttc	atc	gcg	tcc	tac	336
Glu	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg	Glu	Arg	Ile	Asn	Glu	Phe	Ile	Ala	Ser	Tyr	
			100					105					110			
cgt	cgt	ctg	cgc	gtc	aag	gtc	aag	ggc	atg	ggg	ctc	tac	gac	gcc	agc	384
Arg	Arg	Leu	Arg	Val	Lys	Val	Lys	Gly	Met	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ser	
		115					120					125				
gcg	ctc	tac	tac	gcg	tgg	aag	ctc	gtg	agc	acg	ttc	ggc	atc	gcg	gtg	432
Ala	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Trp	Lys	Leu	Val	Ser	Thr	Phe	Gly	Ile	Ala	Val	
	130					135					140					
ctc	tcg	atg	gcg	atc	tgc	ttc	ttc	ttc	aac	agt	ttc	gcc	atg	tac	atg	480
Leu	Ser	Met	Ala	Ile	Cys	Phe	Phe	Phe	Asn	Ser	Phe	Ala	Met	Tyr	Met	
145					150					155					160	
gtc	gcc	ggc	gtg	att	atg	ggg	ctc	ttc	tac	cag	cag	tcc	gga	tgg	ctg	528

ES 2 399 806 T3

Val Ala Gly Val Ile Met Gly Leu Phe Tyr Gln Gln Ser Gly Trp Leu
 165 170 175
 gcg cac gac ttc ttg cac aac cag gtg tgc gag aac cgc acg ctc ggc 576
 Ala His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Cys Glu Asn Arg Thr Leu Gly
 180 185 190
 aac ctt atc ggc tgc ctc gtg ggc aac gcc tgg cag ggc ttc agc gtg 624
 Asn Leu Ile Gly Cys Leu Val Gly Asn Ala Trp Gln Gly Phe Ser Val
 195 200 205
 cag tgg tgg aag aac aag cac aac ctg cac cac gcg gtg ccg aac ctg 672
 Gln Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Leu His His Ala Val Pro Asn Leu
 210 215 220
 cac agc gcc aag gac gag ggc ttc atc gcc gac ccg gac atc gac acc 720
 His Ser Ala Lys Asp Glu Gly Phe Ile Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr
 225 230 235
 atg ccg ctg ctg gcg tgg tct aag gag atg gcg cgc aag gcg ttc gag 768
 Met Pro Leu Leu Ala Trp Ser Lys Glu Met Ala Arg Lys Ala Phe Glu
 245 250 255
 tcg gcg cac ggc ccg ttc ttc atc cgc aac cag gcg ttc cta tac ttc 816
 Ser Ala His Gly Pro Phe Phe Ile Arg Asn Gln Ala Phe Leu Tyr Phe
 260 265 270
 ccg ctg ctg ctg ctc gcg cgc ctg agc tgg ctc gcg cag tcg ttc ttc 864
 Pro Leu Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Gln Ser Phe Phe
 275 280 285
 tac gtg ttc acc gag ttc tcg ttc ggc atc ttc gac aag gtc gag ttc 912
 Tyr Val Phe Thr Glu Phe Ser Ser Phe Gly Ile Phe Asp Lys Val Glu Phe
 290 295 300
 gac gga ccg gag aag gcg ggt ctg atc gtg cac tac atc tgg cag ctc 960
 Asp Gly Pro Glu Lys Ala Gly Leu Ile Val His Tyr Ile Trp Gln Leu
 305 310 315 320
 gcg atc ccg tac ttc tgc aac atg agc ctg ttt gag ggc gtg gca tac 1008
 Ala Ile Pro Tyr Phe Cys Asn Met Ser Leu Phe Glu Gly Val Ala Tyr
 325 330 335
 ttc ctc atg ggc cag gcg tcc tgc ggc ttg ctc ctg gcg ctg gtg ttc 1056
 Phe Leu Met Gly Gln Ala Ser Cys Gly Leu Leu Leu Ala Leu Val Phe
 340 345 350
 agt att ggc cac aac ggc atg tcg gtg tac gag cgc gaa acc aag ccg 1104
 Ser Ile Gly His Asn Gly Met Ser Val Tyr Glu Arg Glu Thr Lys Pro
 355 360 365
 gac ttc tgg cag ctg cag gtg acc acg acg cgc aac atc cgc gcg tcg 1152
 Asp Phe Trp Gln Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Ile Arg Ala Ser
 370 375 380
 gta ttc atg gac tgg ttc acc ggt ggc ttg aac tac cag atc gac cat 1200
 Val Phe Met Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Asp His
 385 390 395 400
 cac ctg ttc ccg ctc gtg ccg cgc cac aac ttg cca aag gtc aac gtg 1248
 His Leu Phe Pro Leu Val Pro Arg His Asn Leu Pro Lys Val Asn Val
 405 410 415
 ctc atc aag tcg cta tgc aag gag ttc gac atc ccg ttc cac gag acc 1296
 Leu Ile Lys Ser Leu Cys Lys Glu Phe Asp Ile Pro Phe His Glu Thr
 420 425 430
 ggc ttc tgg gag ggc atc tac gag gtc gtg gac cac ctg gcg gac atc 1344

 Gly Phe Trp Glu Gly Ile Tyr Glu Val Val Asp His Leu Ala Asp Ile
 435 440 445
 agc aag gaa ttc atc acc gag ttc cca gcg atg taa 1380
 Ser Lys Glu Phe Ile Thr Glu Phe Pro Ala Met *
 450 455

<210> 8

<211> 459

5 <212> PRT

<213> Thraustochytrium sp.

<400> 8

Met Val Asp Leu Lys Pro Gly Val Lys Arg Leu Val Ser Trp Lys Glu
 1 Ile Arg Glu His Ala Thr Pro Ala Thr Ala Trp Ile Val Ile His His
 20 Lys Val Tyr Asp Ile Ser Lys Trp Asp Ser His Pro Gly Gly Ser Val
 35 Met Leu Thr Gln Ala Gly Glu Asp Ala Thr Asp Ala Phe Ala Val Phe
 50 His Pro Ser Ser Ala Leu Lys Leu Leu Glu Gln Phe Tyr Val Gly Asp
 65 Val Asp Glu Thr Ser Lys Ala Glu Ile Glu Gly Glu Pro Ala Ser Asp
 85 Glu Glu Arg Ala Arg Arg Glu Arg Ile Asn Glu Phe Ile Ala Ser Tyr
 100 Arg Arg Leu Arg Val Lys Val Lys Gly Met Gly Leu Tyr Asp Ala Ser
 115 Ala Leu Tyr Tyr Ala Trp Lys Leu Val Ser Thr Phe Gly Ile Ala Val
 130 Leu Ser Met Ala Ile Cys Phe Phe Phe Asn Ser Phe Ala Met Tyr Met
 145 Val Ala Gly Val Ile Met Gly Leu Phe Tyr Gln Gln Ser Gly Trp Leu
 165 Ala His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Cys Glu Asn Arg Thr Leu Gly
 180 Asn Leu Ile Gly Cys Leu Val Gly Asn Ala Trp Gln Gly Phe Ser Val
 195 Gln Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Leu His His Ala Val Pro Asn Leu
 210 His Ser Ala Lys Asp Glu Gly Phe Ile Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr
 225 Met Pro Leu Leu Ala Trp Ser Lys Glu Met Ala Arg Lys Ala Phe Glu
 245 Ser Ala His Gly Pro Phe Phe Ile Arg Asn Gln Ala Phe Leu Tyr Phe
 260 Pro Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Gln Ser Phe Phe
 275 Tyr Val Phe Thr Glu Phe Ser Phe Gly Ile Phe Asp Lys Val Glu Phe
 290 Asp Gly Pro Glu Lys Ala Gly Leu Ile Val His Tyr Ile Trp Gln Leu
 305 Ala Ile Pro Tyr Phe Cys Asn Met Ser Leu Phe Glu Gly Val Ala Tyr
 325 Phe Leu Met Gly Gln Ala Ser Cys Gly Leu Leu Ala Leu Val Phe
 340 Ser Ile Gly His Asn Gly Met Ser Val Tyr Glu Arg Glu Thr Lys Pro
 355 Asp Phe Trp Gln Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Ile Arg Ala Ser
 370 Val Phe Met Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Asp His
 385 His Leu Phe Pro Leu Val Pro Arg His Asn Leu Pro Lys Val Asn Val
 405 Leu Ile Lys Ser Leu Cys Lys Glu Phe Asp Ile Pro Phe His Glu Thr
 420 425 430

Gly Phe Trp Glu Gly Ile Tyr Glu Val Val Asp His Leu Ala Asp Ile
 435 Ser Lys Glu Phe Ile Thr Glu Phe Pro Ala Met
 450 455

5 <210> 9

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<221> misc_feature

<222> 3, 8, 11, 18, 21

<223> n = A, T, C o G

5 <400> 9

gncaganga ncaactcngg ngg 23

<210> 10

<211> 25

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<221> misc_feature

<222> 3, 7, 14

15 <223> n = A, T, C o G

<400> 10

atntgtngga gaanagagat ggatg 25

REIVINDICACIONES

1. Una molécula aislada de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de
- 5 a) una molécula aislada de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, o un complemento de la misma;
- b) una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, o un complemento de la misma;
- 10 c) una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 65 % idéntica a la secuencia de nucleótidos completa de la SEQ ID NO: 7, o un complemento de la misma, en donde la molécula de ácido nucleico aislada codifica un polipéptido que tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$;
- d) una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50 % idéntica a la secuencia de aminoácidos completa de la SEQ ID NO: 8, o un complemento de la misma, en donde el polipéptido tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$;
- 15 e) una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de por lo menos 30 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 7, o un complemento de la misma, en donde la molécula de ácido nucleico aislada codifica un polipéptido que tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$;
- f) una molécula aislada de ácido nucleico que hibrida bajo condiciones exigentes al complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, o un complemento de la misma, en donde la molécula de ácido nucleico aislada codifica un polipéptido que tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$; y
- 20 g) una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un fragmento de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, en donde el fragmento tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde el polipéptido o fragmento que tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$ codificada por la molécula de ácido nucleico comprende por lo menos un motivo representado por los residuos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste de los residuos 42-47 de la SEQ ID NO: 8, los residuos 178-183 de la SEQ ID NO: 8, los residuos 215-220 de la SEQ ID NO: 8 y los residuos 400-405 de la SEQ ID NO: 8; o en donde la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende por lo menos uno de un motivo de unión hemo o un motivo histidina que tiene por lo menos dos residuos de aminoácido histidina; o en donde la molécula de ácido nucleico codifica una molécula de desaturasa de ácido graso $\Delta 6$ capaz de convertir ácido linoleico (18:2) a ácido gama linoleico (GLA) (18:3(6,9,12)) o ácido α -linolenico (ALA) (18:3) a ácido estearidónico (SDA) (18:4(6,9,12,15)).
- 25 30
3. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde el vector es opcionalmente un vector de expresión.
4. Una célula anfitriona que comprende el vector de expresión de la reivindicación 3, en donde la célula se selecciona opcionalmente del grupo que consiste de una célula de planta, una célula microbiana, y una célula de animal.
- 35 5. La célula anfitriona de la reivindicación 4, en donde la célula de planta es una célula obtenida de un cultivo de oleaginosa seleccionado del grupo que consiste de lino (*Linum* sp.), *Brassica napus*, *Brassica juncea*, semilla de colza (*Brassica* sp.), soja (*Glycine* y *Soja* sp.), girasol (*Helianthus* sp.), algodón (*Gossypium* sp.), maíz (*Zea mays*), oliva (*Olea* sp.), alazor (*Carthamus* sp.), cacao (*Theobroma cocoa*), y cacahuete (*Arachis* sp.), o en donde la célula microbiana se selecciona del grupo que consiste de *Thraustochytrium*, *Pythium*, *Schizochytrium*, y *Crythecodinium*.
- 40 6. Un polipéptido aislado seleccionado del grupo que consiste de
- a) un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;
- b) un polipéptido aislado codificada por una molécula de ácido nucleico que consiste de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, en donde el polipéptido aislado tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$;

- c) un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50 % idéntica a la secuencia de aminoácidos completa de la SEQ ID NO: 8, en donde el polipéptido aislado tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$;
- 5 d) un polipéptido aislado que se codifica por una molécula de ácido nucleico que consiste de una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 65 % idéntica a la secuencia de nucleótidos completa de la SEQ ID NO: 7, en donde el polipéptido aislado tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$; y
- e) un polipéptido aislado que comprende un fragmento de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, en donde el fragmento tiene una actividad desaturasa $\Delta 6$.
7. Un método para producir el polipéptido aislado de la reivindicación 6, que comprende cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 4 para producir dicho polipéptido.
- 10 8. El polipéptido aislado de la reivindicación 6, en donde el polipéptido comprende por lo menos un motivo representado por los residuos de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de los residuos 42-47 de la SEQ ID NO: 8, los residuos 178-183 de la SEQ ID NO: 8, los residuos 215-220 de la SEQ ID NO: 8 y los residuos 400-405 de la SEQ ID NO: 8; o en donde el polipéptido comprende por lo menos uno de un motivo de unión hemo o un motivo histidina que tiene por lo menos dos residuos de aminoácido histidina; o en donde el polipéptido es una molécula de desaturasa de ácido graso $\Delta 6$ capaz de convertir ácido linoleico (18:2) a ácido gama linoleico (GLA) (18:3(6,9,12)) o ácido α -linolenico (ALA) (18:3) a ácido estearidónico (SDA) (18:4(6,9,12,15)).
- 15 9. Un método para producir un ácido graso insaturado que comprende (i) cultivar o cosechar la célula anfitriona de la reivindicación 4 bajo condiciones de tal manera que se produce el ácido graso insaturado, o (ii) poner en contacto una composición que comprende por lo menos una molécula objetivo desaturasa con por lo menos un polipéptido aislado de la reivindicación 6 bajo condiciones de tal manera que se produce el ácido graso insaturado, o (iii) transfectar o transformar una célula con la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 y cultivar o cosechar la célula bajo condiciones de tal manera que se produce el ácido graso insaturado.
- 20 10. Un método para mejorar la producción de un ácido graso insaturado que comprende cultivar o cosechar la célula anfitriona de la reivindicación 4, de tal manera que se mejora la producción de un ácido graso insaturado.
- 25 11. Un método para producir una célula capaz de generar un ácido graso insaturado que comprende introducir dentro de dicha célula la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico codifica una desaturasa que tiene una actividad de catalizar la formación de un enlace doble en una cadena grasa acilo.
- 30 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde el ácido graso insaturado se selecciona del grupo que consiste de GLA (18:3(6,9,12)), SDA (18:4(6,9,12,15)), AA (20:4(5,8,11,14)) y EPA (20:5(5,8,11,14,17)).
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, que comprende adicionalmente recuperar el ácido graso insaturado.
- 35 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9, parte (i) o (ii), o 10-11, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste de una célula de planta, por ejemplo, una planta de oleaginosa, una célula de animal y una célula microbiana.
- 40 15. El método de la reivindicación 14, en donde la planta de oleaginosa se selecciona del grupo que consiste de lino (*Linum* sp.), semilla de colza (*Brassica* sp.), soja (*Glycine* y *Soja* sp.), girasol (*Helianthus* sp.), algodón (*Gossypium* sp.), maíz (*Zea mays*), oliva (*Olea* sp.), alazor (*Carthamus* sp.), cacao (*Theobroma cocoa*), y cacahuete (*Arachis* sp.).
16. Una composición que comprende el polipéptido de la reivindicación 6.
17. Una composición que comprende la célula producida por el método de la reivindicación 11.
- 45 18. La composición de la reivindicación 16 para uso como un complemento dietario o para uso como alimento para animal.
19. La composición de la reivindicación 16 para uso en el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno, en donde el trastorno se selecciona opcionalmente del grupo que consiste de estrés, diabetes, cáncer, trastornos inflamatorios, y trastornos cardiovasculares.

ATGACCGAGAAGGCGAGTGACGAGTTCACGTGGCAGGAGGTCGCCAAGCACAAACACGGCCA
 AGAGCGCGTGGGTGATCATCCGCGGCGAGGTGTACGACGTGACCGAGTGGGCGGACAAGCAC
 CCGGGCGGCGAGCGAGTTCATCGTCTGCACCTCCGGTCGTGAATGCACGGACACGTCTACTCG
 TACCACCCGTTCTCGAACCGCGCCGACAAGATCTTGGCCAAGTACAAGATCGGCAAGCTCGTG
 GCGGGCTACGAGTCCCGGTGTTC AAGCCGGACTCGGGCTTCTACAAGGAATGCTCGGAGCGC
 GTGGCCGAGTACTTTAAGACGAACAATCTGGACCCAAAGCGGGCGTTCGCGGGTCTCTGGCG
 CATGGTGTTCGTGTTTCGCGGTGCGCGCGTTCGCGTACATGGGCATGAATGAGCTCATCCCTGG
 AAACGTGTACCGCGAGTACGCGTGGGGCGTGGTGTTCGGTGTCTTCCAGGCGCTGCCATTGCT
 GCACGTGATGCACGACTCGTTCGCGACGCGGCATGCTCGAGCAGCCAGCGATGTGGCAGATCA
 TCGGTCTGTGGTGTGATGGACTGGTTCGCTGGCGCCAGCATGGTGTTCGTGGTTGAACCAGCACG
 TTGTGGGCCACCACATCTACACGAACGTTCGCGGGCGCGGACCCGGATCTCCCGGTTCGACTTTG
 AGAGCGAGTGCGCCGCATCGTGCACCGCCAGGTGCTGCTGCCGATCTACAAGTTCAGCACACA
 TCTACCTGCCACCGCTCTACGGCGTGTGGGCCCTCAAGTTCGCGATCCAGGACGTGTTGAGAGA
 CGTTCGTGTTCGCTCACGAACCGCCCGGTGCGTGTGAACCCGACCCGGTGTTCGGACTGGGTGC
 AAATGATCTTCGCCAAGGCGTTCGAGCGTTCACCGCATCTACATCCCGTTGGCGTGGCTCA
 AGATCACGCCGTCGACGTTCTGGGGCGTGTTCCTTCGCGGAGTTCACCACAGGTTGGTACCT
 CGCGTCAACTTCAGGTGAGCCACGTCTCGACCGAGTGCAGTACCCGTGCGGTGATGCGCC
 GTCGGCCGAGGTGCGTGACGAGTGGGGCATCTCGAGTCAAGTTCGTCGGTGGACTACGGCG
 ACGGCTCGCCGCTCGCGGCGTTCCTCTGCGGCGCGCTCAACTACCAGGTGACCCACCACTTGT
 ACCGGGCATCTCACAGTACCCTACCTGCGATCGCGCGATCATCATCGACGTGTGCAAGA
 AGTACAACATCAAGTACACGGTGTGCGCGAGTTCACCGAGGCGCTGCTCGCGCACTTCAAGC
 ACCTGAAGAACATGGGCGAGCTCGGCAAGCCGTGGAGATCCACATGGGTAA

Fig. 1A

MTEKASDEFTWQEVAKHNTAKSAWVIIRGEVYDVTEWADKHPGGSELIVLHSGRECTDTFFYSYH
 PFSNRADKILAKYKIGKLVGGYEFVFKPDSGFYKECSERVAEYFKTNLDPKAAFAGLWRMVFV
 FAVAALAYMGMNELIPGNVYAQYAWGVVFGVQALPLLHVMHDSHACSSSPAMWQIIGRV
 MDWFAGASMVSWLNQHVVGHHIYTNVAGADPDLPVDFESDVRRIVHRQVLLPIYKQHIYLPPL
 YGVLGLKFRIQDVFEFVSLTNGPVRVNPVSDWVQMIFAKAFWTFYRIYIPLAWLKITPSTFWG
 VFFLAEFTTGWYLA FNQVSHVSTECEYPCGDAPSAEVGDEWAI SQVSSVDYAHGSPLAFLCG
 ALNYQVTHHLYPGISQYHYP AIPIIIDVCKYNIKYTVLPTTFTEALLAHFKHLKNMGELGKPV EIH
 MG

Fig. 1B

ATGGTGGACCTCAAGCCTGGAGTGAAGCGCCTGGTGGAGCTGGAAGGAGATCCGCGAGCACGC
GACGCCCGCGACCCGGTGGATCGTGATTCACCACAAGGTCTACGACATCTCCAAGTGGGACTC
GCACCCGGGTGGCTCCGTGATGCTCACGAGGCCGGCGAGGACGCCACGGACGCCTTCGCGG
TCTTCCACCCGTCCCTCGGCGCTCAAGCTGCTCGAGCAGTTCTACGTCCGGCAGCTGGACGAAA
CCTCCAAGGCCGAGATCGAGGGGGAGCCGGCGAGCGACGAGGAGCGCGCGCCGCGAGCG
CATCAACGAGTTCATCGCGTCTTACCCTCGTCTGCGCGTCAAGGTCAAGGGCATGGGGCTCTA
CGACGCCAGCGCGCTCTACTACGCGTGGAGCTCGTGAGCACGTTCGGCATCGCGGTGCTCTC
GATGGCGATCTGCTTCTTCTTCAACAGTTTCGCCATGTACATGGTTCGCCGGCGTGATTATGGGG
CTCTTCTACCAGCAGTCCGGATGGCTGGCGCACGACTTCTTGCACAACCAGGTGTPCGGAGAAC
CGCACGCTCGGCAACCTTATCGGCTGCCCTCGTGGCAACGCCTGGCAGGGCTTCAGCGTGCAG
TGGTGGAAAGAACAAGCACAACTGCACCACGCGGTGCCGAACCTGCACAGCGCCAAGGACGA
GGGCTTCATCGGCGACCCGGACATCGACACCATGCCGCTGCTGGCGTGGTCTAAGGAGATGG
CGCGCAAGGCGTTCGAGTCGGCGCACGGCCCGTCTTTCATCCGCAACCAGGCGTTCCTATACT
TCCCGCTGCTGCTGCTCGCGCGCCTGAGCTGGCTCGCGCAGTCGTTCTTCTACGTGTTCCACCGA
GTTCTCGTTCCGGCATCTTCGACAAGGTCGAGTTCGACGGACCCGGAGAAGGCGGGTCTGATCGT
GCACTACATCTGGCAGCTCGCGATCCCGTACTTCTGCAACATGAGCCTGTTTGAGGGCGTGGC
ATACTTCCTCATGGGCCAGGCGTCTTGGCGTGGCTTCTTGGCGTGGTGTTCAGTATTGGCCAC
AACGGCATGTCCGGTGTACGAGCGCGAAACCAAGCCGGACTTCTGGCAGCTGCAGGTGACCAC
GACCGCAACATCCGCGCGTCCGGTATTTCATGGACTGGTTCACCGGTGGCTTGAACCTACCAGAT
CGACCATCACCTGTCCCGCTCGTGCCGCGCCACAACCTGCCAAAGGTCAACGTGCTCATCAA
GTCGCTATGCAAGGAGTTCGACATCCCGTTCACGAGACCGGCTTCTGGGAGGGCATCTACGA
GGTCTGGACCACCTGGCGGACATCAGCAAGGAATTCATCACCAGGTTCCAGCGATGTAA

Fig. 2A

MVDLKPQVLRVSWKEIREHATPATAWIVIHKKVYDISKWDSHPGGSVMLTQAGEDATDAFAVF
HPSSALKLLEQFYVGDVDETSKAEIEGEPASDEERARRERINEFIASRRLRVKVKMGGLYDASAL
YYAWKLVSTFGIAVLSMAICFFNFNSFAMVMVAGVIMGLFYQQSGWLAHDFLHNQVCENRTLGNL
IGCLVGNAWQGFVQWKNKHNHLLHAPNLHSAKDEGFIGDPDIDTPLLAWSKEMARKAFES
AHGPPFFIRNQAFLYFPLLLLARLSWLAQSFFYVFTEFSFGIFDKVEFDGPEKAGLIVHYIWQLAIPYF
CNMSLFEGVAYFLMGQASCGLLLALVFSIGHNGMSVYERETKPDFWQLQVTTTRNIRASVFMW
FTGGLNYQIDHHLFPLVPRHNLPKVNVLIKSLCKEFDIPHETGFWEGIYEVVDHLADISKEFITFP
AM

Fig. 2B

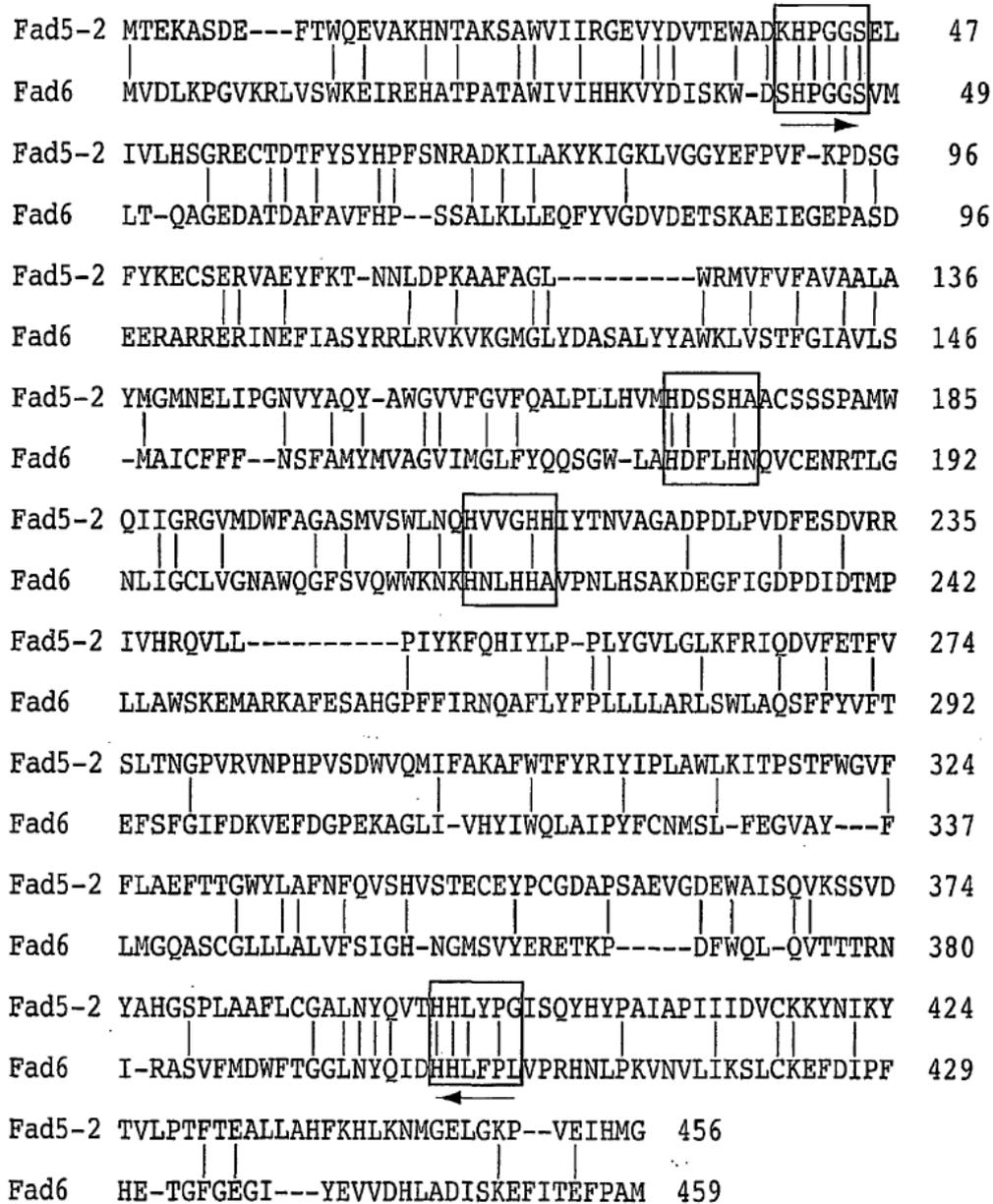


Fig. 3

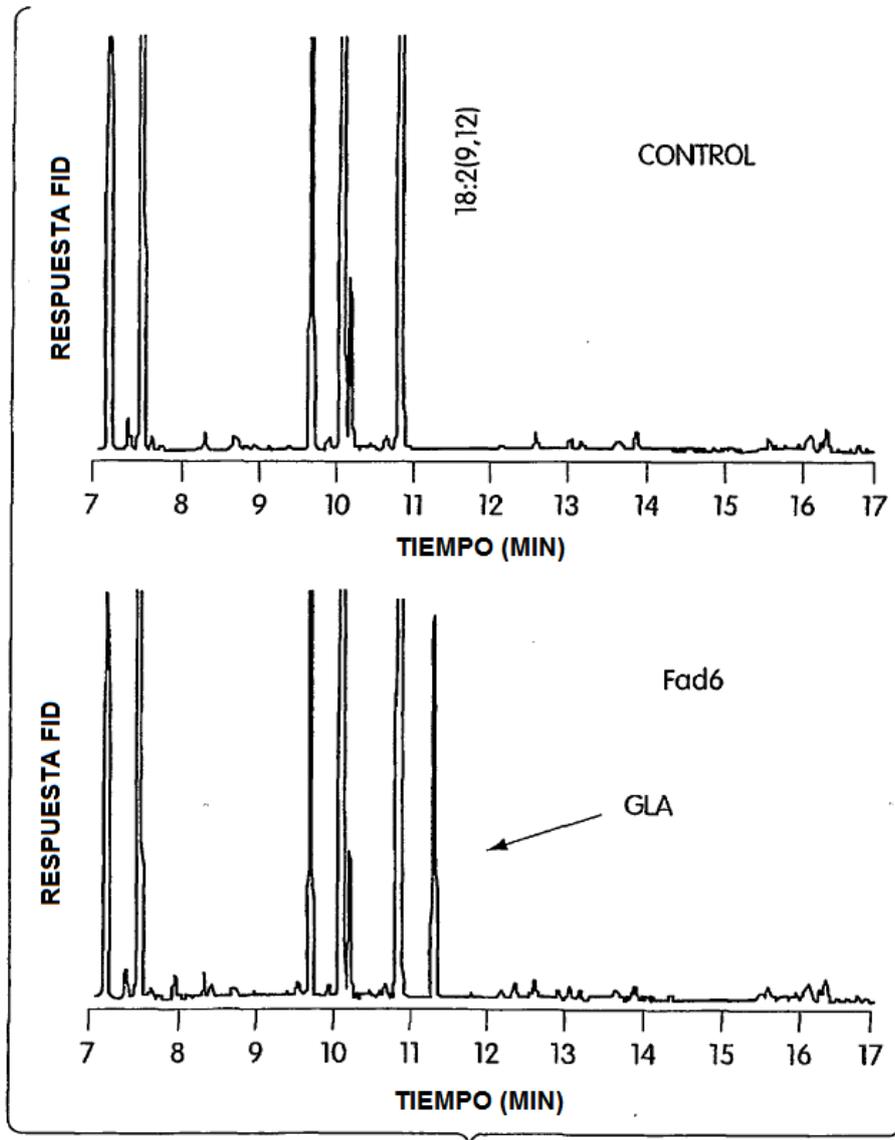


Fig. 4

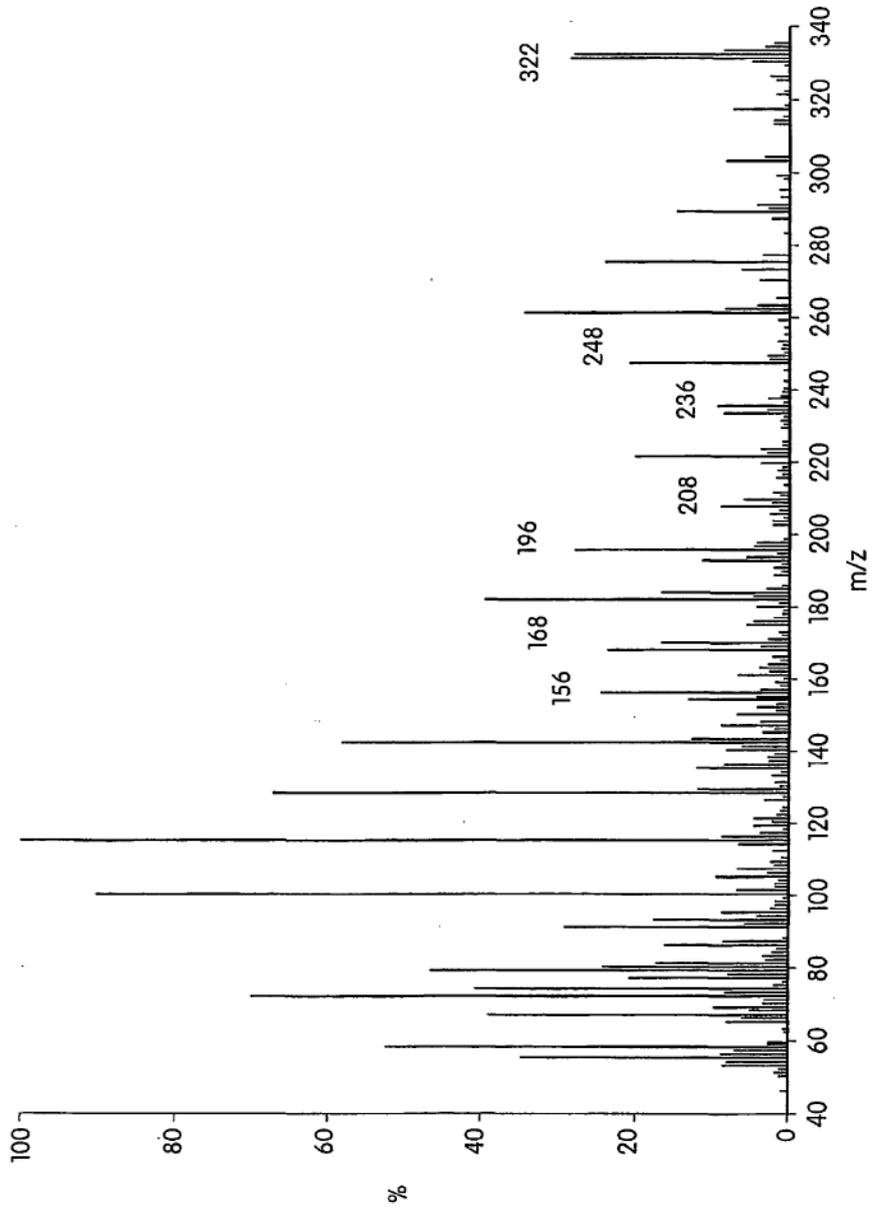


Fig. 5

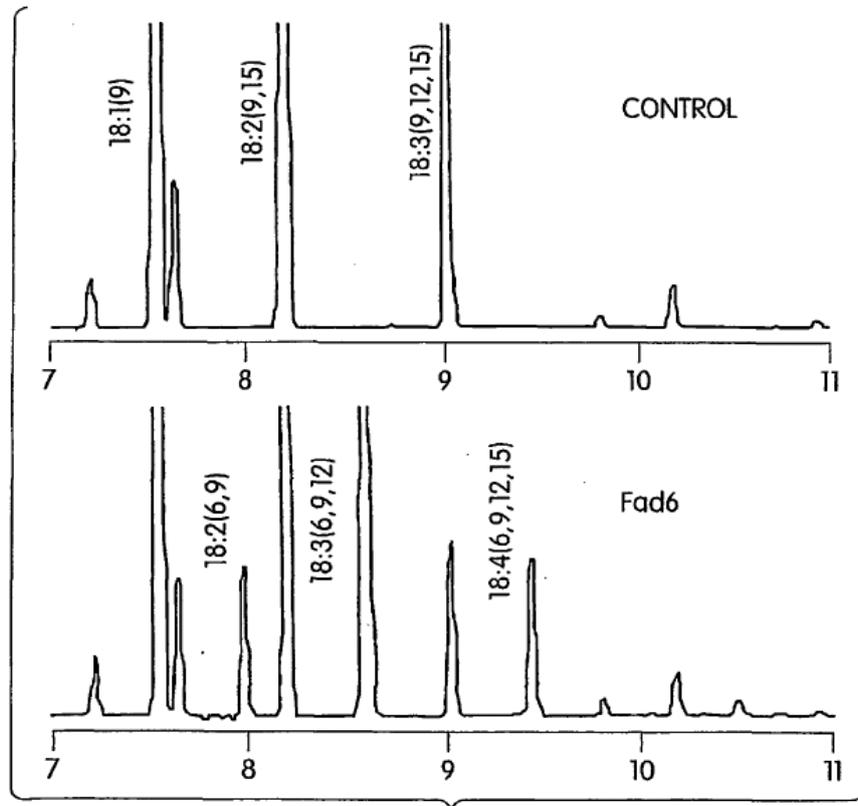


Fig. 6

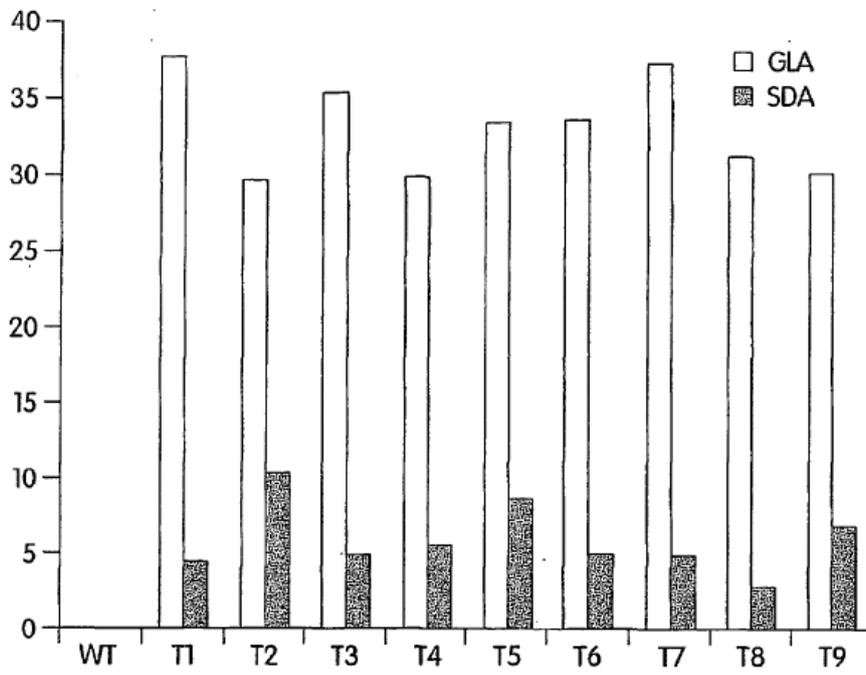


Fig. 7

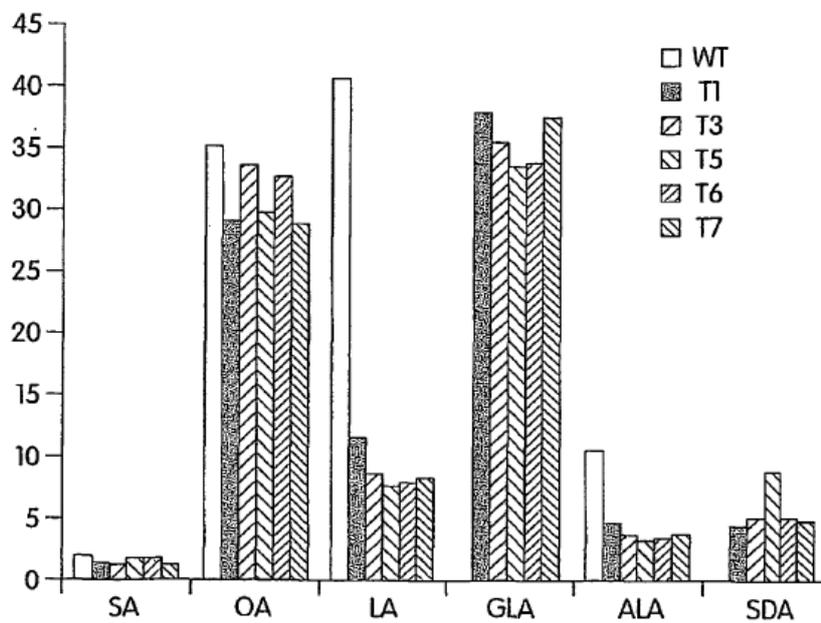


Fig. 8

Tabla 1. Pefiles de Ácido Graso de Pythium irregulare (% en peso)

16:0	16:1	18:0	18:1	18:2 (LA)	18:3 (GLA)	18:3 (ALA)	20:4 (AA)	20:5 (EPA)
16.2	5.5	0.9	8.9	15.3	<0.1	<0.1	8.9	20.3

Fig. 9

Tabla 2. Acumulación de ácidos grasos desaturados en semillas de lino transgénicas (Solin y Normandy) que expresan Fad6 bajo el control del promotor napina. Los niveles de ácido graso se muestran como los porcentajes en peso de los ácidos grasos totales.

Estirpes transgénicas	Ácido linoleico	Ácido gama-linolénico	Ácido alfa-linoleico	Ácido estearidónico
tipo natural S	71.1	0	2.1	0
S-1-2	64.5	1.3	2.3	0.1
S-2-1	67.1	4.3	2.5	0.1
S-3-3	62.4	2.9	2.0	0.1
tipo natural N	14.9	0	56.6	0
N-5-3	7.0	0.6	51.9	1.4
N-6-2	6.2	0.3	43.7	0.9
N-7-5	4.5	0.5	49.9	0.6
N-11-3	7.5	0.4	49.6	0.8
N-13-1	5.9	0.3	41.8	0.5

Notas: S, tipo Solin; N, tipo tradicional Normandy de lino

Fig. 10