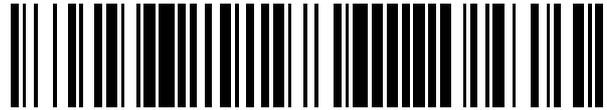


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 667**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/14** (2006.01)  
**A23L 1/03** (2006.01)  
**A23K 1/00** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)  
**A23K 1/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2006 E 06848643 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 1899453**

54 Título: **Microorganismos eucariotas para producir lípidos y antioxidantes**

30 Prioridad:

**07.06.2005 US 688207 P**  
**16.12.2005 US 751401 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.03.2014**

73 Titular/es:

**OCEAN NUTRITION CANADA LIMITED (100.0%)**  
**101 RESEARCH DRIVE**  
**DARTMOUTH NOVA SCOTIA B2Y 4T6, CA**

72 Inventor/es:

**BURJA, ADAM M.;**  
**RADIANINGTYAS, HELIA;**  
**BARROW, COLIN JAMES y**  
**WINDUST, ANTHONY JAMES**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 451 667 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

Microorganismos eucariotas para producir lípidos y antioxidantes

### 5 I. Antecedentes

Hay pruebas científicas abrumadoras de que los ácidos grasos altamente insaturados (n-3), tales como el ácido docosahexaenoico (DHA), tienen un efecto positivo en enfermedades cardio-circulatorias, inflamaciones crónicas y trastornos cerebrales. Por otro lado, los ácidos grasos (n-6) se han observado como metabolitos intermedios dentro de los esteroides eicosanoides, tales como prostaglandinas, leucotrienos o similares.

En la actualidad, la principal fuente de estos ácidos grasos altamente insaturados es el pescado, habiéndose observado DHA y ácido eicosapentaenoico (EPA) en diversos pescados azules (tales como sardinas y atún) en cantidades de aproximadamente 20 % y 10 %, respectivamente. Sin embargo, si se pretende usar aceite de pescado como la única fuente de estos lípidos, existen diversas desventajas, tales como problemas de contaminación del sabor, fluctuaciones incontrolables en cuanto a la disponibilidad, variabilidad del contenido de aceite de pescado natural, así como la posibilidad de acumular sustancias contaminantes ambientales perjudiciales. Además, si se pretende obtener un aceite altamente purificado (n-3) o (n-6) de estas fuentes, es muy difícil separar y purificar de modo preferencial.

En la base de datos de EMBL se depositó una secuencia de nucleótidos de una parte de un gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña de *Thraustochytrium striatum* con el número de referencia AF265338.

El documento EP 0 823 475 A1 desvela la producción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) por *Schizochytrium limacinum* SR21, en el que el microorganismo descrito en el mismo produce ácidos grasos en una cantidad de entre 30,3 y 58 % por biomasa celular seca. La fracción de ácido graso contiene DHA en cantidades que superan el 25 %. El microorganismo produce ácidos grasos que contienen EPA 0,4-0,8 %, DPA 8,4-11,1 % y DHA 34-43,7 %. El documento EP 0 823 475 A1 también desvela complementos nutricionales, productos alimentarios y formulaciones farmacéuticas que comprenden dicha composición de ácidos grasos.

### 30 II. Sumario

Se desvelan composiciones y métodos relacionados con un eucariota del orden *Thraustochytriales* y la familia *Thraustochytriaceae* que cuando se cultivan producen cantidades de ácidos grasos insaturados, tales como ácidos omega 3 (n-3) y/u omega 6 (n-6), tales como DHA, EPA y DPA, que pueden purificarse y usarse como se usan todas estas composiciones y más, debido a su medio de producción.

### III. Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de la presente memoria descriptiva, ilustran varias realizaciones y junto con la descripción ilustran las composiciones y métodos desvelados.

La Figura 1 muestra un diagrama que muestra los resultados obtenidos de la metilación de ácidos grasos de los lípidos derivados de ONC-T18.

La Figura 2 representa gráficamente una comparación de metil éster de ácido graso entre el aislado de ONC-T18 original recogido en Advocate Harbor y el del ONC-T18 de *Thraustochytrium* sp. depositado en la ATCC como PTA-6245. Todos los picos se identificaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas.

La Figura 3 muestra un gráfico de representación de dispersión de resultados de experimentos de optimización de biomasa ONC-T18 realizados. Estos experimentos usaron una técnica conocida como el método de Taguchi para determinar las condiciones óptimas para el crecimiento de ONC-T18 en diversas condiciones de medios.

La Figura 4 muestra un gráfico de barras del perfil de ácidos grasos de ONC-T18, cultivado en condiciones óptimas (ejemplo 4) durante un periodo de nueve días.

La Figura 5 muestra un diagrama de organismos productores de aceite aislados como se describe en cualquier parte en el presente documento.

La Figura 6 muestra un árbol filogenético ramificado de la relación entre el gen de ARNr 18S de ONC-T18 y otros *Thraustochytriales*.

La Figura 7 muestra la producción de lípidos y DHA de ONC-T18 en diferentes condiciones.

La Figura 8 muestra un gráfico modificado con información acerca de las condiciones de cultivo en él para los eucariotas desvelados en el presente documento. (Modificado de Ratledge, C. (2004), *ILipid. Technol.* 16:34-39).

La Figura 9 muestra una ruta metabólica propuesta para la producción de PUFA para los eucariotas desvelados.

La Figura 10 muestra una comparación de producción de ácidos grasos máxima y composiciones en diversas fuentes de carbono de bajo coste, alternativas.

La Figura 11 muestra un agrupamiento de aislados recogidos basándose en sus perfiles de PUFA C20 y C22. Los resultados se compararon con dos cepas de referencia: ATCC 20891 y MYA-1381.

La Figura 12 muestra un árbol de unión de vecinos de ARNr 18S de la cepa ONC-T18. La barra representa la distancia genética, mientras que los corchetes representan secuencias derivadas de GenBank usadas dentro de este árbol filogenético.

La Figura 13 muestra el perfil de ácidos grasos de ONC-T18 cultivado en medio que contiene extracto de levadura 2 g l<sup>-1</sup>, L-glutamato 8 g l<sup>-1</sup>, sal marina 6 g l<sup>-1</sup> y glucosa 60 g l<sup>-1</sup> en 3 tipos de fermentación diferentes: placa de agar (agar 1,5 %, 25 °C, 27 días), matraces (50 ml en matraz de 250 ml, 120 RPM, 25 °C, 3 días) y biorreactor de 5 l (aire 4 lpm, pO<sub>2</sub> 90 %, 25 °C, 3 días).

La Figura 14 muestra el cromatograma de HPLC de compuestos carotenoides aislados de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18. Por ejemplo, se aislaron Astaxantina, Zeaxantina, Cantaxantina, Equinenona y β-Caroteno de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18.

La Figura 15 muestra biomasa típica, producción de ácidos grasos totales (TFA), DHA y utilización de glucosa de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 mantenido en un biorreactor de 5 l durante 168 h con medio compuesto de glucosa 60 g l<sup>-1</sup>, extracto de levadura 2 g l<sup>-1</sup>, ácido glutámico 8 g l<sup>-1</sup> y sal 6 g l<sup>-1</sup> (aire 4 lpm, pO<sub>2</sub> 90 %, 25 °C, pH 7-9).

La Figura 16 muestra rutas hipotéticas implicadas en la formación de astaxantina en *Thraustochytrium* sp. ONC-T18.

#### IV. Descripción detallada

Antes de desvelar y describir los presentes compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o métodos, debe entenderse que no se limitan a métodos de síntesis específicos o a métodos de biotecnología recombinante específicos a no ser que se especifique de otro modo, o a reactivos particulares a no ser que se especifique de otro modo, ya que estos pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el único fin de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante.

Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar usando tan solo experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas del método y composiciones descritos en el presente documento. Se pretende que dichos equivalentes queden incluidos en las reivindicaciones posteriores.

##### A. Definiciones

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen los referentes plurales, a no ser que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un vehículo farmacéutico” incluye mezclas de dos o más de dichos vehículos, y similares.

Los intervalos pueden expresarse en el presente documento como de “aproximadamente” un valor particular y/o “aproximadamente” otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, otra realización incluye desde un valor particular y/o al otro valor particular. De forma similar, cuando se expresan valores como aproximaciones, mediante el uso del antecedente “aproximadamente”, se entenderá que el valor particular forma otra realización. También se entenderá que los extremos de cada uno de los intervalos son significativos ambos en relación con el otro extremo, e independientemente del otro extremo. También debe entenderse que hay diversos valores desvelados en el presente documento, y que cada valor también se desvela en el presente documento como “aproximadamente” ese valor particular además del valor en sí mismo. Por ejemplo, si se desvela el valor “10”, entonces también se desvela “aproximadamente 10”. También se entiende que cuando se desvela un valor que es “menor que o igual a” el valor, “mayor que o igual al valor” y posibles intervalos entre valores también se desvelan, como entiende apropiadamente el experto en la materia. Por ejemplo, si se desvela el valor “10” entonces también se desvela “menor que o igual a 10” así como “mayor que o igual a 10”. También se entiende que en toda la solicitud, se proporcionan datos en varios formatos diferentes, y que estos datos representan extremos y puntos de partida, e intervalos para cualquier combinación de los puntos de datos. Por ejemplo, si se desvela un punto de datos particular, “10” y un punto de datos particular “15”, se entiende que se consideran desvelados mayor que, mayor que o igual a, menor que, menor que o igual a e igual 10 y 15 así como entre 10 y 15. También se entiende que se desvela cada unidad particular entre dos unidades particulares. Por ejemplo, si se desvelan 10 y 15, entonces también se desvelan 11, 12, 13, y 14.

Por “reducir” u otras formas de reducir se entiende disminución de un acontecimiento o característica. Se entiende que esto es normalmente en relación con algún valor patrón o esperado, en otras palabras es relativo, pero que no siempre es necesario hacer referencia al valor patrón o relativo. Por ejemplo, “reduce la fosforilación” significa que disminuye la cantidad de fosforilación que tiene lugar en relación con un patrón o un control. Se entiende que, a no ser que se indique específicamente de otro modo, un compuesto o composición o condición puede reducirse en relación con otro compuesto o composición o condición.

Por “inhibir” u otras formas de inhibir se entiende obstaculizar o impedir una característica particular. Se entiende que esto es normalmente en relación con algún valor patrón o esperado, en otras palabras, es relativo, pero que no siempre es necesario hacer referencia al valor patrón o relativo. Por ejemplo, “inhibe la fosforilación” significa que obstaculiza o impide la cantidad de fosforilación que tiene lugar en relación con un patrón o un control. Se entiende que, a no ser que se indique específicamente de otro modo, un compuesto o composición o condición puede inhibirse en relación con otro compuesto o composición o condición.

Por “prevenir” u otras formas de prevenir se entiende detener una característica o condición particular. Prevenir no requiere comparación con un control ya que es normalmente más absoluto que, por ejemplo, reducir o inhibir. Como se usa en el presente documento, algo podría reducirse pero no inhibirse o prevenirse, pero algo que se reduce podría también inhibirse o prevenirse. Se entiende que cuando se usan reducir, inhibir o prevenir, a no ser que se indique específicamente de otro modo, el uso de las otras dos palabras también se desvela de forma expresa. Por lo tanto, si se desvela inhibir la fosforilación, entonces también se desvelan reducir y prevenir la fosforilación.

La expresión “terapéuticamente eficaz” significa que la cantidad de la composición usada es de suficiente cantidad para aliviar una o más causas o síntomas de una enfermedad o trastorno. Dicho alivio solamente requiere una reducción o alteración, no necesariamente eliminación.

El término “vehículo” significa un compuesto, composición, sustancia o estructura que, cuando está en combinación con un compuesto o composición, ayuda o facilita en la preparación, almacenamiento, administración, suministro, eficacia, selectividad o cualquier otra característica del compuesto o composición para su uso o fin pretendido. Por ejemplo, puede seleccionarse un vehículo para minimizar cualquier degradación del principio activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto.

En toda la descripción y en las reivindicaciones de la presente memoria descriptiva, la palabra “comprender” y variaciones de la palabra, tales como “que comprende” y “comprende”, significa “incluyendo pero sin limitación,” y no se pretende que excluya, por ejemplo, otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

El término “célula”, como se usa en el presente documento, también se refiere a células microbianas individuales, o a cultivos derivados de dichas células. Un “cultivo” se refiere a una composición que comprende células aisladas del mismo tipo o uno diferente.

El término “metabolito” se refiere a derivados activos producidos tras la introducción de un compuesto en un medio biológico, tal como un paciente.

Cuando se usa con respecto a composiciones farmacéuticas y nutracéuticas, se entiende generalmente en la técnica que el término “estable” significa menos que una cierta cantidad, habitualmente 10 %, de pérdida de principio activo en condiciones de almacenamiento específicas durante un periodo de tiempo indicado. El tiempo requerido para que una composición se considere estable es relativo al uso de cada producto y se determina por los aspectos prácticos comerciales de producir el producto, someterlo a control de calidad e inspección, transportarlo a un mayorista o directo a un cliente donde se mantiene de nuevo en almacenamiento antes de su uso posterior. Incluyendo un factor de seguridad de varios meses, la vida mínima del producto para productos farmacéuticos es habitualmente de un año, y preferentemente más de 18 meses. Como se usa en el presente documento, el término “estable” se refiere a estas realidades del mercado y a la capacidad de almacenamiento y transporte del producto en condiciones ambientales fácilmente obtenibles tales como condiciones refrigeradas, de 2 °C a 8 °C.

Las referencias en la memoria descriptiva y reivindicaciones concluyentes a partes en peso, de un elemento o componente particular en una composición o artículo, indica la relación en peso entre el elemento o componente y cualquier otro elemento o componente en la composición o artículo para la que se expresa una parte en peso. Por lo tanto, en un compuesto que contiene 2 partes en peso de componente X y 5 partes en peso de componente Y, X e Y están presentes a una relación en peso de 2:5, y están presentes en dicha relación independientemente de si el compuesto contiene componentes adicionales.

Un porcentaje en peso de un componente, a no ser que se indique específicamente lo contrario, se basa en el peso total de la formulación o composición en la que se incluye el componente.

“Aislamiento” y cualquier otra forma tal como “aislar” se refieren a una situación en la que algo está en una forma en la que puede manipularse o purificarse adicionalmente. Aislado y sus formas indica que algo está en un estado actual que es diferente de un estado previo. Por ejemplo, una molécula de ARN ribosómico puede estar “aislada” si está, por ejemplo, separada de un organismo, sintetizada o producida de forma recombinante. Con frecuencia, el “aislamiento” de algo es en relación con otra cosa. Por ejemplo, un eucariota como se analiza en el presente documento, puede estar aislado como se analiza en el presente documento, por ejemplo, cultivando el eucariota, de modo que el eucariota sobreviva en ausencia de cantidades apreciables (detectables) de otros organismos. Se entiende que a no ser que se indique específicamente de otro modo, cualquiera de las composiciones desveladas puede aislarse como se desvela en el presente documento.

“Purificar” y cualquier otra forma tal como “purificando” se refiere al estado en el que una sustancia o compuesto o composición está en un estado de mayor homogeneidad que lo que estaba antes. Se entiende que, como se desvela en el presente documento y a no ser que se indique de otro modo, algo puede tener una pureza de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94,

95, 96, 97, 98, 99, o 100 %. Por ejemplo, si una composición dada A tenía una pureza del 90 %, esto significaría que el 90 % de la composición era A, y que el 10 % de la composición era una o más cosas, tales como moléculas, compuestos u otras sustancias. Por ejemplo, si un microorganismo eucariota desvelado produce, por ejemplo, DHA al 35 %, este podría "purificarse" adicionalmente de modo que la composición de lípidos final fuera mayor de DHA al 90 %. A no ser que se indique de otro modo, la pureza se determinará por los "pesos" relativos de los componentes dentro de la composición. Se entiende que, a no ser que se indique específicamente de otro modo, puede purificarse cualquiera de las composiciones desveladas como se desvela en el presente documento.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el acontecimiento o circunstancia descrita a continuación puede suceder o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho acontecimiento o circunstancia sucede y casos en los que no.

Los "cebadores" son un subconjunto de sondas que pueden soportar algún tipo de manipulación enzimática y que pueden hibridarse con un ácido nucleico diana de modo que pueda producirse manipulación enzimática. Un cebador puede prepararse a partir de cualquier combinación de nucleótidos o derivados o análogos de nucleótidos disponibles en la técnica que no interfieran con la manipulación enzimática.

A lo largo de la presente solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones. Las divulgaciones de estas publicaciones en su totalidad describen más completamente el estado de la técnica a la cual pertenecen.

Se desvelan los componentes que se usan para preparar las composiciones desveladas así como las propias composiciones para usar dentro de los métodos desvelados en el presente documento. En el presente documento se desvelan estos y otros materiales, y se entiende que cuando se desvelan combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales que aunque pueden no desvelarse de forma explícita referencia específica a cada una de las diversas combinaciones y permutaciones individuales y colectivas de estos compuestos, se contempla cada una específicamente y se describe en el presente documento. Por ejemplo, si se desvela una especie particular de la familia *Thraustochytriaceae* y se analizan varias modificaciones que pueden realizarse a varios organismos, incluyendo especies de la familia *Thraustochytriaceae*, se contemplan específicamente todas y cada una de las combinaciones y permutaciones de estas especies de la familia *Thraustochytriaceae* y las modificaciones que sean posibles, a no ser que se indique específicamente lo contrario. Por lo tanto, si se desvela una clase de moléculas A, B y C, así como una clase de moléculas D, E, y F y se desvela un ejemplo de una molécula de combinación, A-D, entonces incluso si no se numera cada una individualmente cada una se contempla individual y colectivamente lo que significa que se consideran desveladas combinaciones, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E y C-F. De forma similar, también se desvela cualquier subconjunto o combinación de éstas. Por lo tanto, por ejemplo, el subgrupo de A-E, B-F y C-E se consideraría desvelado. Este concepto se aplica a todos los aspectos de la presente solicitud incluyendo, pero sin limitación, etapas en los métodos de preparación y uso de las composiciones desveladas. Por lo tanto, si hay diversas etapas adicionales que pueden realizarse se entiende que cada una de estas etapas adicionales puede realizarse con cualquier realización específica o combinación de realizaciones de los métodos desvelados.

## B. Composiciones

Se desvelan microorganismos eucariotas del orden *Thraustochytriales*, preferentemente especies de *Thraustochytrium* o *Schizochytrium*, que tienen la capacidad de producir lípidos, tales como ácidos grasos, tales como ácidos grasos insaturados, tales como ácidos grasos omega-3, tales como ácidos grasos omega-6 y ácidos grasos omega-9 tales como la serie (n-3) de ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), serie (n-6) de ácido docosapentaenoico (DPA) y la serie (n-9) de ácido palmítico y esteárico. Los microorganismos eucariotas desvelados también pueden producir antioxidantes, tales como, pero sin limitación, el compuesto carotenoide caroteno, (por ejemplo,  $\beta$ -caroteno) y los compuestos xantófilos astaxantina, zeaxantina, cantaxantina y equinenona.

También se desvelan condiciones para el aislamiento y cultivo de los microorganismos eucariotas. Por ejemplo, con la presente hay condiciones de crecimiento heterotróficas para la producción de los lípidos y antioxidantes desvelados, por ejemplo, tanto individual como acumulativamente. En consecuencia, es posible mediante el uso de este eucariota único, producir eficazmente la serie (n-3) de DHA y/o la serie (n-6) de DPA y/o la serie de carotenoides de compuestos antioxidantes y/o la serie de xantófilos de compuestos antioxidantes, que son útiles como o dentro de nutracéuticos, aditivos alimentarios, productos farmacéuticos o en la industria.

Se desvelan composiciones que comprenden un microorganismo eucariota que comprende o consiste en una especie de *Thraustochytrium*, siendo un ejemplo como se desvela en el presente documento la cepa ONC-T18 que tiene un número de depósito de la ATCC número de referencia PTA-6245.

Se entiende que el microorganismo eucariota y cualquier clon, organismo modificado o gen aislado de dicho organismo como se expone en ONC-T18 también se desvela. Los organismos desvelados tienen la capacidad de producir ácidos grasos insaturados, tales como lípidos que contienen la serie omega-3 de DHA y EPA, y la serie omega-6 de DPA y diversos antioxidantes tales como carotenoides, xantófilos y fenólicos.

También se desvelan procesos para la producción de biomasa que contiene dichos compuestos. Se desvelan además procesos para preparar omega-3, omega-6 y compuestos carotenoides utilizando el microorganismo eucariota. También se desvelan procesos para la producción de aceite derivados de microbios (o monocelulares).

Además, se desvelan los ácidos grasos y carotenoides producidos por el microorganismo eucariota desvelado y cualquier descendencia (modificada genéticamente u otra), diversos productos alimentarios, nutracéuticos, productos farmacéuticos y alimentos complementados con los lípidos y antioxidantes, así como un procedimiento para utilizar estos compuestos como un aditivo para diversos productos alimentarios y alimentos.

La patente de Estados Unidos N° 5.130.242 de Barclay desveló un proceso de recogida y cribado para aislar cepas de microorganismos con las siguientes características para la producción de ácidos grasos omega-3: 1) ser capaces de crecimiento heterotrófico; 2) producir un alto contenido de ácidos grasos omega-3; 3) ser unicelulares; 4) producir un bajo contenido de ácidos grasos convencionales y omega-6; 5) tener células no pigmentadas, blancas o incoloras; 6) ser termotolerantes (por ejemplo, poder crecer por encima de 30 °C); y 7) ser eurhalinos (por ejemplo, poder crecer en una amplia serie de salinidades, pero preferentemente a baja salinidad).

La divulgación 242 también describe un proceso para la producción heterotrófica de productos microbianos extraídos o de células completas con una alta concentración de ácidos grasos omega-3, que después pueden usarse en productos alimentarios animales o humanos. Este proceso usa microorganismos identificados por el proceso de recogida y cribado desvelado en el mismo. Estos microorganismos, que son del orden Taustochytriales, se cultivan en grano molido. Para potenciar la producción de ácidos grasos omega-3, se usa estrés a baja temperatura y altas cantidades de oxígeno disuelto, así como la adición de antioxidantes, factores de crecimiento, vitaminas y fósforo. Los productos extraídos contienen altas concentraciones de ácidos grasos omega-3 (por ejemplo, C20: 5w3, C22: 5w3, y C22: 6w3) y bajas concentraciones de ácidos grasos omega-6 (por ejemplo, C20: 4w6 y C22: 5w6). Específicamente, las relaciones de los ácidos grasos C20: 5w3 y C22: 6w3 varía de 1:1 a 1:30. Las relaciones de ácidos grasos C22: 5w3 y C22: 6w3 varía de 1:12 a solamente cantidades traza de C22: 5w3. Además, los microorganismos producen DHA de 0,6 a 0,72 %, DPA de 0 a 5 % y EPA de 0 a 18,9 %, en peso de ácidos grasos totales.

La Patente de Estados Unidos N° 6.451.567 de Barclay desveló un procedimiento para cultivar *Thraustochytrium* y *Schizochytrium* en un medio sin cloruro (< de 3 g/l) que contenía sales sódicas (por ejemplo, sulfato sódico). El medio sin cloruro da como resultado tamaños de agregados celulares de menos de 150 µm. Este procedimiento desvelado produce microorganismos y extractos que son útiles en productos alimentarios para acuicultura. Los componentes adicionales de los productos alimentarios incluyen linaza, colza, soja y harina de aguacate. Los microorganismos pueden producir 1,08 g/l de medio por día de ácidos grasos omega-3. La divulgación '567 describe además diversos medios de cultivo, que incluyen agua salada, glucosa (1, 3, 5 o 10 g/l), extracto de levadura (0,01, 0,2, 0,4 y 5 g/l), fuentes de nitrógeno adicionales, tales como hidrosilato proteico (1 g/l), extracto de hígado (1 g/l), glutamato (5 g/l), MSG (3 g/l), y sales adicionales, vitaminas y minerales traza (por ejemplo, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, y extracto de gelatina).

La patente de Estados Unidos N° 6.582.941 de Yokochi *et al.* desvela una especie de *Schizochytrium*, cepa SR21 y otra cepa de *Schizochytrium* que pertenece a la misma especie que tienen la capacidad de producir fracciones de ácidos grasos que tienen una alta concentración de DHA omega-3 y/o de DPA omega-6 y una baja concentración de EPA. Además, se desvelan métodos para cultivar dichos microorganismos y aislar dichos ácidos grasos. El medio usado contiene sal marina, extracto de levadura (0,2, 1,0 o 10 g/l), agua de macerado de maíz (0,5, 1,0 o 10 g/l), glucosa (10-120 g/l), más sales adicionales (por ejemplo, NH<sub>4</sub>OAc, fosfatos). Las composiciones de ácidos grasos contienen DHA de aproximadamente el 15 al 20 % en peso de biomasa (aproximadamente 28 % en peso de ácidos grasos totales). Las composiciones pueden usarse en productos alimentarios (por ejemplo, leche para lactantes).

La Patente de Estados Unidos N° 6.607.900 de Bailey *et al.* desveló un procedimiento para cultivar microorganismos eucariotas (por ejemplo, *Schizochytrium* sp. ATCC N° 20888) que son capaces de producir al menos 20 % de su biomasa como lípidos poliinsaturados (particularmente ácidos grasos omega-3 y 6). El procedimiento implica cultivar los microorganismos en un medio que contenga una fuente de carbono y nitrógeno. También se desvela el uso de niveles bajos de oxígeno disuelto (menos de 3 %) y niveles bajos de ión cloruro (menos de 3 g/l) para potenciar la producción. Los microorganismos tienen una velocidad de producción de lípidos de al menos 0,5 g/l/h. La fracción lipídica de DHA es del 15 al 20 % en peso de biomasa (aproximadamente 35 % en peso de metil éster de ácidos grasos total).

La Publicación de Estados Unidos N° 2004/0161831 de Komazawa *et al.* desvela una cepa de *Thraustochytrium* (LEF1; ATCC N° FERM BP-08568) que tiene la capacidad de producir DHA. Cultivando en medios convencionales, el microorganismo puede producir aceite con al menos 50 % en peso de DHA. El aceite puede tratarse con una lipasa antes del aislamiento de DHA. El aceite puede usarse en alimentos o bebidas o el DHA puede hidrolizarse para producir ácido behénico.

## 1. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son cadenas de hidrocarburo que terminan en un grupo carboxilo, que se denominan insaturadas si contienen al menos un doble enlace de carbono-carbono, y poliinsaturadas cuando contienen múltiples de dichos enlaces. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) o los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) de cadena larga, pueden dividirse en la serie (n-3) y (n-6) como resultado de la localización de estos dobles enlaces. Hay pruebas científicas abrumadoras de que los ácidos grasos altamente insaturados (n-3), tales como DHA, tienen un efecto positivo en enfermedades cardio-circulatorias, inflamación crónica y trastornos cerebrales. Por otro lado, los ácidos grasos (n-6) se han observado como metabolitos intermedios dentro de los esteroides eicosanoides, tales como prostaglandinas, leucotrienos o similares.

Los ácidos grasos poliinsaturados pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 dobles y/o triples enlaces carbono-carbono. Por ejemplo, los ácidos grasos poliinsaturados pueden comprender 3-8, 4-7, 5-6 dobles y/o triples enlaces carbono-carbono.

En la actualidad, la principal fuente de estos ácidos grasos altamente insaturados es el pescado, observándose DHA y EPA dentro de diversos pescados azules (tales como sardinas y atún) en cantidades de aproximadamente 20 % y 10 %, respectivamente. Sin embargo, si se pretende usar aceite de pescado como la única fuente de estos lípidos, existen varias desventajas, tales como problemas de contaminación del sabor, fluctuaciones incontrolables en cuanto a la disponibilidad, variabilidad del contenido de aceite de pescado natural, así como la posibilidad de acumular sustancias contaminantes ambientales perjudiciales. Además, si se pretende obtener un aceite altamente purificado (n-3) o (n-6) de estas fuentes, es muy difícil separar y purificar de modo preferencial. Específicamente, se dispone de un amplio comercio dentro del comercio de complementos neonatales para una forma altamente concentrada de DHA. Si el aceite de pescado fuera la fuente de dichos productos, entonces el DHA tendría que aislarse preferentemente en grandes cantidades de EPA. Claramente se necesita una fuente alternativa de recursos altamente purificados y adaptados para la producción de estos ácidos grasos altamente insaturados.

Además de aceites de pescado, diversos microorganismos (principalmente marinos) son capaces de producir y/o acumular la serie (n-3) de ácido docosahexaenoico. Es de interés particular el hecho de que la producción microbiana no se somete a fluctuaciones ocasionadas por variables externas tales como estacionalidad, clima y suministro alimentario. Por ejemplo, se sabe que los siguientes microorganismos tienen la capacidad de producir DHA: la bacteria *Vibrio marinus* (ATCC 15381) procedente de mares profundos, *Vibrio* sp.T3615, *Photobacterium profundum* SS9, *Mortierella marina* MP-1 y *Psychromonas kaikoa* (ATCC BAA-363T); especies de microalgas, tales como, *Cryptocodinium cohmii*, *Cyclotella cryptica*, y *Mortierella alpina* (1S-4); y los protistas *Thraustochytrium* sp. (ATCC 20892), *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) y *Thraustochytrium roseum*. Sin embargo, de acuerdo con un procedimiento que utiliza estos organismos purificados, la cantidad de ácido docosahexaenoico producido por gramo de biomasa por litro es baja, estando en el intervalo de 10 a 500 mg. En la Figura 5 se muestran algunos ejemplos y organismos microbianos representativos productores de aceite.

Se ha mostrado que los omega 3 tienen efectos beneficiosos y los aceites y las composiciones que se desvelan en el presente documento pueden usarse para conseguir un efecto anti-inflamatorio en la fibrosis quística (Cochrane Database Syst Rev. 3), artritis reumatoide (Drugas 63: 845-53), asma (Ann Allergy Asthma Immunol 90: 371-7) e ictus trombótico (Prev Cardiol 6: 38-1), cardio-protector, así como un efecto directo en la arteriosclerosis y arritmia (Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 63:351-62), inhibición de la proliferación del cáncer en líneas celulares de cáncer de mama y próstata y reducción en experimentos animales (Am J Clin Nutr 77: 532-43), efecto antipsicótico en esquizofrenia (J Neural Transm Suppl 64:105-17) y otras enfermedades psiquiátricas (Can J Psychiatry 48: 195-203), complemento inmunonutriente usado en el desarrollo neonatal normal y en el tratamiento de infecciones neonatales (Eur J Pediatr 162: 122-8), y tratamiento del dolor patológico atenuando directamente los procesos neuronales y ganglionares que son la base del dolor neuropático e inflamatorio (Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 68:219-24).

## 2. Thraustochytriaceae

### a) ONC-T18

El organismo marino ONC-T18, como se desvela en el presente documento, se recogió como parte de un viaje de aislamiento microbiano productor de PUFA, con más de 60 aislados de cultivos puros (véase la Tabla 7 para detalles). Además, se aisló ONC-T18 de las hojas de hierbas de marisma en Advocate Harbor, Bahía de Fundy, Nueva Escocia, Canadá. Mediante exámenes microscópicos y técnicas de purificación de cultivo en serie, se cree que la cepa es un microorganismo individual que pertenece al género *Thraustochytrium*. Se cultivaron todas las cepas y dos cultivos de comparación de la ATCC (ATCC 20891 y MYA-1381) en glucosa 0,5 %, peptona 0,2 %, extracto de levadura 0,2 % en agua de mar (SW, *Sea-water*) y se sometieron a análisis GC (metil éster de ácidos grasos, FAME).

La Figura 6 muestra un árbol filogenético propuesto de la relación entre ONC-T18, y otros organismos estrechamente relacionados.

ONC-T18 se aisló originalmente como un único microbio usando técnicas de cebadura de polen de pino clásico, seguido de cultivo en medio selectivo. Específicamente, se preparó un medio nutriente que contenía glucosa 5 g l<sup>-1</sup>, peptona 2 g l<sup>-1</sup>, extracto de levadura 2 g l<sup>-1</sup> a 1 l agua de mar filtrada 0,2 µm. El perfil de ácidos grasos de ONC-T18 se determinó después usando el método de extracción de Bligh y Dyer y técnicas cromatográficas de gases PUFA. Los resultados cromatográficos demostraron la capacidad de esta cepa para producir grandes cantidades de TFA, DHA, así como cantidades notables de EPA y DPA.

El microorganismo eucariota desvelado puede usarse en un procedimiento para preparar un lípido o grasa que contenga DHA, EPA y DPA, pero no se limita a las cepas ONC-T18 o PTA-6245 anteriormente mencionadas, sino a cualquier derivación de dicha cepa ya sea por modificación genética, mutagénesis química, adaptación fermentativa o cualquier otro medio para producir mutantes de la cepa, por lo que el producto de estas modificaciones tiene características genéticas o morfológicas y funcionales tales como el microorganismo eucariota, como se desvela en el presente documento.

Se desvelan microorganismo eucariotas capaces de producir una composición lipídica que tiene propiedades de clase de lípidos distintivas, y la solución al problema de mantener una fuente estable, fiable y económica para dicho lípido que tenga alta funcionalidad y valor añadido de acuerdo con lo mismo. Por lo tanto, en el presente documento se desvelan cepas de tipo silvestre que producen la serie (n-3) de DHA y la serie (n-6) de DPA a un mayor grado así como cepas variante y recombinantes diseñadas para producir estos ácidos grasos poliinsaturados a un mayor grado. Dichos microorganismos variante o recombinantes incluyen los diseñados para tener un mayor contenido de dichos lípidos que los producidos por la cepa de tipo silvestre original, cuando se cultivan usando las mismas condiciones y medios. Además, pueden seleccionarse microorganismos diseñados para producir un lípido que contenga cantidades similares de la serie (n-3) de DHA, EPA y la serie (n-6) de DPA, en comparación con las cepas de tipo silvestre correspondientes, usando eficazmente sustratos que tienen una rentabilidad superior.

Se desvelan composiciones que comprenden un microorganismo eucariota del orden Thraustochytriales en el que el microorganismo eucariota produce ácidos grasos insaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados pueden ser, por ejemplo, ácidos grasos omega 3 u omega 6, tales como DHA y DPA.

Se desvelan composiciones que comprenden un eucariota, en el que la composición produce un lípido.

También se desvelan composiciones en las que el lípido comprende un lípido como se desvela en el presente documento.

También se desvelan composiciones, en las que el eucariota comprende un miembro de la orden Thraustochytriales.

También se desvelan composiciones, en las que el eucariota tiene una secuencia génica de ARN ribosómico 18S que tiene una identidad de al menos 80 % con la SEC ID N° 1.

Se entiende que, para los microorganismos eucariotas, puede usarse cualquier forma de caracterización descrita en el presente documento, tal como mediante firmas genéticas o lipídicas o mediante las clasificaciones, para caracterizar los microorganismos como se desvela en el presente documento. El microorganismo eucariota puede comprender uno o más microorganismos de la familia Thraustochytriaceae y son ejemplos los números de referencia 20888, 20889, 20890, 20891 y 20892 de la ATCC. Existe diversas características que pueden usarse en relación con los organismos y los ácidos grasos insaturados que producen. Se entiende que estos pueden usarse en cualquier combinación o permutación para definir un conjunto o conjuntos de organismos o aceites o antioxidantes, por ejemplo. Una característica es la clasificación de los propios organismos, la identificación genética de los organismos, los perfiles lipídicos y antioxidantes de los organismos, y las condiciones de cultivo de los mismos, por ejemplo.

## b) Clasificación

El microorganismo eucariota puede ser del filo Labyrinthulomycota. El microorganismo eucariota puede ser de la clase Labyrinthulomycetes. El microorganismo eucariota puede ser de la subclase Thraustochytridae. El microorganismo eucariota puede ser del orden Thraustochytriales. El microorganismo eucariota puede ser de la familia Thraustochytriaceae. El microorganismo eucariota puede ser del género *Thraustochytrium*. El microorganismo eucariota puede ser *Thraustochytrium* sp. El microorganismo eucariota puede ser *Thraustochytrium aureum*. El microorganismo eucariota puede ser *Thraustochytrium roseum*. El microorganismo eucariota puede ser *Thraustochytrium striatum*. El microorganismo eucariota puede ser del género *Schizochytrium*. El microorganismo eucariota puede ser *Schizochytrium* sp. El microorganismo eucariota puede ser una versión modificada de cualquiera de los microorganismos eucariotas enumerados. El microorganismo eucariota también puede comprender cualquier miembro actualmente desconocido o aislado de dicha clase, subclase, orden, familia o género de procariotas. Una combinación de microorganismos eucariotas puede ser cualquier combinación de cualquier organismo desvelado en el presente documento, incluyendo, uno o más de *Thraustochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium striatum* y *Thraustochytrium roseum*.

Los microorganismos eucariotas de la familia Thraustochytriaceae pueden ser cualquiera de los desvelados anteriormente. El microorganismo eucariota puede comprender el organismo que tiene el número de referencia PTA-6245 de la ATCC.

### 5 c) Genética

El microorganismo eucariota puede tener la secuencia de ARNr 18S de la SEC ID N° 1. El microorganismo eucariota puede tener una secuencia de ARNr 18S que tiene, por ejemplo, una homología de aproximadamente el 90 %, o cualquier otra identidad desvelada en el presente documento, con la SEC ID N° 1. El microorganismo eucariota puede tener una secuencia de ARNr 18S que se hibrida en condiciones rigurosas, o cualquier otra condición como se desvela en el presente documento, con la SEC ID N° 1, o con una parte de la SEC ID N° 1.

La similitud/identidad de secuencia e hibridación de ácidos nucleicos de los ácidos nucleicos de los organismos pueden ser como se describe en el presente documento. Específicamente, la comparación de la SEC ID N° 1 con las secuencias de ácidos nucleicos encontradas en la base de datos genómica, GenBank (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología, National Institute of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos) usando el algoritmo BLAST (herramienta de búsqueda de alineamiento local básica) identificó que la SEC ID N° 1 estaba relacionada (91 % de similitud) con varias especies de traustochytridos eucariotas, estrechamente relacionadas con *Thraustochytrium* sp. CHN-1 [AB126669] (94,5 % de similitud) y *Thraustochytriidae* sp. N1-27 [AB073308] (95,5 % de similitud), y más estrechamente relacionada con *Thraustochytrium striatum* [AF265338] (97,5 % de similitud).

### 3. (1) Similitudes de secuencia

Se entiende que, como se analiza en el presente documento, el uso de los términos homología e identidad significan lo mismo que similitud. Por lo tanto, por ejemplo, si el uso de la palabra homología se utiliza entre dos secuencias no naturales se entiende que esta no indica necesariamente una relación evolutiva entre estas dos secuencias, sino que considera más bien la similitud o la relación entre sus secuencias de ácidos nucleicos. Muchos de los métodos para determinar la homología entre dos moléculas evolutivamente relacionadas se aplican rutinariamente a dos o más ácidos nucleicos o proteínas con el fin de medir la similitud de secuencia independientemente de si están relacionadas evolutivamente o no

En general, se entiende que un modo de definir cualquier variante y derivado conocidos o los que puedan surgir, de los genes y proteínas desvelados en el presente documento, es mediante la definición de las variantes y derivados en términos de homología con secuencias específicas conocidas. Esta identidad de secuencias particulares desveladas en el presente documento también se desvela en otra parte del presente documento. En general, las variantes de ácidos nucleicos y proteínas que se desvelan en el presente documento tienen normalmente una homología de al menos aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94; 95, 96, 97, 98 o 99 por ciento con la secuencia indicada o la secuencia nativa. Los expertos en la materia comprenden fácilmente cómo determinar la homología de dos proteínas o ácidos nucleicos, tales como genes. Por ejemplo, la homología puede calcularse después de alinear las dos secuencias de modo que la homología esté a su nivel más alto.

Otro modo de calcular la homología puede realizarse mediante algoritmos publicados. El alineamiento óptimo de secuencias puede realizarse por comparación mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearsan y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA:* 85:2444, 1988, mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, PASTA y TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección.

Los mismos tipos de homología pueden obtenerse para los ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante los algoritmos desvelados en Zuker, M. *Science* 244:48-52, 1989, Jaeger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7706-7710, 1989, Jaeger *et al. Methods Enzymol.* 183:281-306, 1989. Se entiende que normalmente puede usarse cualquiera de los métodos y que en determinados casos los resultados de estos diversos métodos pueden diferir, pero el experto en la materia entiende que si se encuentra identidad con al menos uno de estos métodos, se diría que las secuencias tienen la identidad indicada, y se desvelan en el presente documento.

Por ejemplo, como se usa en el presente documento, una secuencia que se ha indicado que tiene un porcentaje de homología particular con otra secuencia se refiere a secuencias que tienen la homología indicada como se calcula por uno cualquiera o más de los métodos de cálculo descritos anteriormente. Por ejemplo, una primera secuencia tiene una homología del 80 por ciento, como se define en el presente documento, con una segunda secuencia, si se calcula que la primera secuencia tiene una homología del 80 por ciento con la segunda secuencia usando el método de cálculo de Zuker incluso si la primera secuencia no tiene una homología del 80 por ciento con la segunda secuencia como se calcula por cualquiera de los otros métodos de cálculo. Como otro ejemplo, una primera secuencia tiene una homología del 80 por ciento, como se define en el presente documento, con una segunda secuencia si se calcula que la primera secuencia tiene una homología del 80 por ciento con la segunda secuencia

usando tanto el método de cálculo de Zuker como el método de cálculo de Pearson y Lipman incluso si la primera secuencia no tiene una homología del 80 por ciento con la segunda secuencia como se calcula por el método de cálculo de Smith y Waterman, el método de cálculo de Needleman y Wunsch, los métodos de cálculo de Jaeger o cualquiera de los otros métodos de cálculo. Como otro ejemplo más, una primera secuencia tiene una homología del 80 por ciento, como se define en el presente documento, con una segunda secuencia si se calcula que la primera secuencia tiene una homología del 80 por ciento con la segunda secuencia usando cada uno de los métodos de cálculo (aunque, en la práctica, los diferentes métodos de cálculo con frecuencia dan como resultado diferentes porcentajes de homología calculada).

## 10 (2) Hibridación/hibridación selectiva

El término hibridación significa normalmente una interacción conducida por secuencia entre al menos dos moléculas de ácido nucleico, tales como un cebador o una sonda y un gen. La interacción conducida por secuencia significa una interacción que se produce entre dos nucleótidos o análogos de nucleótidos o derivados de nucleótidos de una manera específica de nucleótidos. Por ejemplo, G que interacciona con C o A que interacciona con T son interacciones conducidas por secuencia. Normalmente las interacciones conducidas por secuencia se producen en la cara de Watson-Crick o en la cara de Hoogsteen del nucleótido. La hibridación de dos ácidos nucleicos se ve afectada por diversas condiciones y parámetros conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, si dos moléculas de ácido nucleico van a hibridarse, las concentraciones salinas, el pH y la temperatura de la reacción, todas ellas, afectarán.

Los expertos en la materia conocen bien los parámetros de la hibridación selectiva entre dos moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las condiciones de hibridación selectiva pueden definirse como condiciones de hibridación rigurosas. Por ejemplo, la rigurosidad de la hibridación se controla tanto por la temperatura como por la concentración salina de una o ambas de las etapas de hibridación y lavado. Por ejemplo, las condiciones de hibridación para conseguir hibridación selectiva pueden implicar hibridación en solución de alta fuerza iónica (SSC 6 x o SSPE 6 x) a una temperatura que está aproximadamente 12-25 °C por debajo de la  $T_m$  (la temperatura de fusión a la cual la mitad de las moléculas se disocia de sus compañeros de hibridación), seguido de lavado a una combinación de temperatura y concentración salina seleccionada de tal modo que la temperatura de lavado esté aproximadamente 5-20 °C por debajo de la  $T_m$ . Las condiciones de temperatura y salinidad se determinan fácilmente de forma empírica en experimentos preliminares en los que muestras de ADN de referencia inmovilizado en filtros se hibridan con un ácido nucleico marcado de interés y después se lavan en condiciones de diferentes rigurosidades. Las temperaturas de hibridación son normalmente más altas para la hibridación de ADN-ARN y ARN-ARN. Las condiciones pueden usarse como se ha descrito anteriormente para conseguir rigurosidad, o como se conoce en la técnica. (Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989; Kunkel *et al*, Methods Enzymol. 154:367, 1987). Una condición de hibridación rigurosa preferible para una hibridación ADN: ADN puede ser a aproximadamente 68 °C (en solución acuosa) en SSC 6 x o SSPE 6 x seguido de lavado a 68 °C. La rigurosidad de la hibridación y del lavado, si se desea, puede reducirse en consecuencia a medida que se reduce el grado de complementariedad deseado, y adicionalmente, dependiendo de la riqueza de G-C o A-T de cualquier área en la que se busque variabilidad. De forma similar, si se desea, la rigurosidad de la hibridación y del lavado, puede aumentarse en consecuencia a medida que aumenta la homología deseada, y además, dependiendo de la riqueza de G-C o A-T de cualquier área en la que se desee alta homología, como se conoce en la técnica.

Otro modo de definir la hibridación selectiva es considerando la cantidad (porcentaje) de uno de los ácidos nucleicos unido al otro ácido nucleico. Por ejemplo, en algunas realizaciones las condiciones de hibridación selectiva serían cuando al menos aproximadamente el 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 por ciento del ácido nucleico limitante está unido al ácido nucleico no limitante. Normalmente, los cebadores no limitantes, por ejemplo, en un exceso de 10, 100 o 1000 veces. Este tipo de ensayo puede realizarse en condiciones en las que tanto el cebador limitante como no limitante, están, por ejemplo, 10, 100 o 1000 veces por debajo de su  $k_d$  o en las que solamente una de las moléculas de ácido nucleico está 10, 100 o 1000 veces o en las que una o ambas moléculas de ácido nucleico están por encima de su  $k_d$ .

Otro modo de definir la hibridación selectiva es considerando el porcentaje de cebador que se manipula enzimáticamente en condiciones en las que se requiere hibridación para promover la manipulación enzimática deseada. Por ejemplo, en algunas realizaciones las condiciones de hibridación selectiva serían cuando al menos aproximadamente el 50, 55, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 por ciento de los cebadores está manipulado enzimáticamente en condiciones que promueven la manipulación enzimática, por ejemplo, si la manipulación enzimática es extensión de ADN, entonces las condiciones de hibridación selectiva serían cuando al menos aproximadamente el 50, 55, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 por ciento de las moléculas cebadoras están extendidas. Las condiciones preferidas también incluyen las sugeridas por el fabricante o las indicadas en la técnica como apropiadas para realizar la manipulación enzimática.

Al igual que con la homología, se entiende que hay diversos métodos desvelados en el presente documento para determinar el nivel de hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico. Se entiende que estos métodos y

condiciones pueden proporcionar diferentes porcentajes de hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico, pero a no ser que se indique de otro modo sería suficiente cumplir los parámetros de cualquiera de los métodos. Por ejemplo, si se requiere 80 % de hibridación y siempre que se produzca hibridación dentro de los parámetros requeridos en uno cualquiera de estos métodos, se considera desvelado en el presente documento.

5 Se entiende que los expertos en la materia entienden que si una composición o método cumple uno cualquiera de estos criterios para determinar la hibridación de forma colectiva o individual es una composición o método que se desvela en el presente documento.

#### 10 **d) Composición de moléculas producidas**

Se entiende que los eucariotas desvelados en el presente documento pueden producir diversos compuestos y composiciones. Los compuestos y composiciones pueden usarse como una firma, un modo de identificar el organismo. Por ejemplo, un modo de caracterizar un organismo es por el perfil lipídico que produce el organismo. 15 Como se desvela en el presente documento, estos diversos perfiles lipídicos pueden usarse para caracterizar el organismo así como purificarse, manipularse y recogerse por diversas razones.

##### **(1) Lípidos**

20 Se entiende que cada organismo puede producir algún perfil de ácidos grasos insaturados, como se desvela en el presente documento. Estos perfiles son característicos de los organismos. Posteriormente hay algunos ejemplos de perfiles de lípidos insaturados y otros de los organismos.

El microorganismo eucariota puede producir, por ejemplo, un lípido o una fracción de ácidos grasos de al menos aproximadamente 4 % en peso a 6 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 5 % en peso), que comprende de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 2 % en peso de ácido mirístico (por ejemplo, aproximadamente 1 % en peso), de aproximadamente 16 % en peso a aproximadamente 20 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 18 % en peso) de ácido palmítico, de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 2 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 1 % en peso) de ácido palmitoleico, de aproximadamente 4 % en peso a aproximadamente 8 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 6 % en peso) de ácido esteárico, de aproximadamente 30 % en peso a aproximadamente 34 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 32 % en peso) de ácido oleico, de aproximadamente 40 % en peso a aproximadamente 44 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 42 % en peso) de ácido linoleico, y de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 3 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 2 % en peso) de EPA n-3 por biomasa celular seca.

El microorganismo eucariota también puede producir, por ejemplo, un lípido o una fracción de ácidos grasos de al menos aproximadamente 1 % en peso a 3 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 1,25 % en peso), que comprende de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 4 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 3 % en peso) de ácido mirístico, de aproximadamente 50 % en peso a aproximadamente 60 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 55 % en peso) de ácido palmítico, de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 4 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 3 % en peso) de ácido palmitoleico, de aproximadamente 16 % en peso a aproximadamente 20 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 18 % en peso) de ácido esteárico, de aproximadamente 9 % en peso a aproximadamente 13 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 11 % en peso) de ácido oleico, de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 3 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 2 % en peso) de ácido eicosadienoico y de aproximadamente 6 % en peso a aproximadamente 10 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 8 % en peso) de EPA n-3 por biomasa celular seca.

El microorganismo eucariota, por ejemplo, tal como ONC-T18, puede producir al menos aproximadamente 30 % en peso, 40 % en peso, 50 % en peso, 60 % en peso, 70 % en peso u 80 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 80 % en peso) de una composición lipídica por biomasa celular seca. Por ejemplo, el microorganismo eucariota puede producir una composición lipídica que comprende de aproximadamente 25 % a aproximadamente 40 % de un ácido graso omega 3, tal como DHA n-3 (por ejemplo, al menos 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 % o 60 % en peso) y de aproximadamente 0 % a aproximadamente 3 % del ácido graso omega 3, EPA, (por ejemplo, al menos 1 % o 2 % en peso) y de aproximadamente 4 % a aproximadamente 12 % de un ácido graso omega 6, tal como DPA n-6 (por ejemplo, al menos 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % en peso).

Se entiende que la composición del lípido producido por el microorganismo eucariota puede manipularse basándose en las condiciones de cultivo en las que existe el microorganismo eucariota. Cambiando diversos parámetros, como se desvela en el presente documento, las composiciones pueden manipularse para producir, por ejemplo, un mejor rendimiento de DHA o DPA. Por ejemplo, la manipulación puede no producir más gramos reales, pero la manipulación puede producir una mejor relación de DHA o DHA y EPA y otros PUFA deseados, lo que puede ser deseable desde un punto de vista de la purificación. En el presente documento se analizan diversas condiciones.

La Figura 10 muestra una posible ruta metabólica para los diversos PUFA producidos por el microorganismo eucariota desvelado, coherente con el rastreo de metabolitos de metil éster de ácidos grasos. Son proteínas que pueden identificarse dentro de las rutas, que se desvela en el presente documento, la poliquétido sintasa, usando, por ejemplo, un estudio con cebadores degenerativos (Metz *et al.* (2001), Science 293:290-3 y Kuhnann y Hertweck

(2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:1866-9). También puede identificarse elongasas y desaturasas, usando, por ejemplo un estudio con sondas de hibridación. También pueden identificarse ácido graso sintasas usando, por ejemplo, un estudio con sondas de hibridación y/o con cebadores degenerativos.

#### 5 4. Crecimiento y cultivo

Se realizó un estudio fenotípico en microplacas que incluía carbono; nitrógeno (nitrógeno peptídico); fósforo y azufre; osmolitos y pH.

10 Se usó un método de matriz ortogonal (Taguchi) para determinar las configuraciones de medios óptimas y variaciones en la concentración de nitrógeno, carbono y sal (Joseph J & Piganatiells JR (1998) *IIE Trans.* 20:247-254).

15 Si se aumenta la agitación o el  $dO_2$  se aumenta la producción de biomasa y TFA pero se reduce el DHA. Si se produce la agitación o el  $dO_2$  se reduce la biomasa celular (g) y se reduce TFA pero se aumenta DHA, pero también se reduce C16: 0, C16: 1 y C18: 1.

20 Si se aumenta la temperatura se aumenta la producción de biomasa y TFA pero se reduce el DHA. Si se reduce la temperatura se reduce la biomasa celular (g) y se reduce el TFA pero se aumenta DHA, pero se reduce C16: 0, C16: 1 y C18: 1.

25 Puede obtenerse biomasa celular derivada del microorganismo eucariota desvelado inoculando un medio natural adecuado o de agua marina artificial, que contiene de aproximadamente 2 % a aproximadamente 100 % de agua marina. Este microorganismo eucariota puede utilizar diversos componentes nutricionales dentro de este medio. Son ejemplos de una fuente de carbono usada dentro del medio carbohidratos tales como glucosa, fructosa, dextrosa, lactulosa, galactosa, maltotriosa, maltosa, lactosa, glucógeno, gelatina, almidón (de maíz o de trigo) así como derivados de azúcares tales como acetato, m-inositol (derivado de agua de macerado de maíz), ácido galacturónico (derivado de pectina), L-fucosa (derivada de galactosa), gentiobiosa, glucosamina,  $\alpha$ -D-glucosa-1-fosfato (derivado de glucosa), celobiosa (derivada de celulosa) dextrina (derivada de maíz) y  $\alpha$ -ciclodextrina (derivada de almidón) y polioles tales como maltitol, eritritol, adonitol y ácidos oleicos tales como glicerol y Tween 80 y amino azúcares tales como N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil- $\beta$ -D-manosamina. Al mismo tiempo son ejemplos de una fuente de nitrógeno fuentes de nitrógeno naturales tales como peptona, extracto de levadura, extracto de malta y harina de pescado, o una fuente de nitrógeno orgánica tal como glutamato sódico, pero sin limitación a las mismas. Además, si es necesario, como nutrientes traza pueden usarse fosfatos, tales como fosfato potásico y fosfato sódico, sales inorgánicas tales como sulfato de amonio, bicarbonato sódico, ortovanadato sódico, cromato potásico, molibdato sódico, ácido selenioso, sulfato de níquel, sulfato de cobre, sulfato de cinc, cloruro de cobalto, cloruro de hierro, cloruro de manganeso y cloruro cálcico, junto con el compuesto quelante, ácido etilendiaminotetraacético, solo o junto con vitaminas tales como clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, pantotenato cálcico, ácido p-aminobenzoico, riboflavina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>.

30 Después de preparar el medio, el pH se ajusta a entre 3,0 y 10,0 usando ácido o base para ajustar cuando sea apropiado, por ejemplo, a un pH de entre 4,0 y 6,5, y el medio se esteriliza, por ejemplo, mediante autoclave. El cultivo puede realizarse durante 1 a 30 días, 1 a 21 días, 1 a 15 días, 1 a 12 días, 1 a 9 días, o preferentemente 3 a 5 días a temperaturas entre 4 y 30 °C, preferentemente 18 y 28 °C, por cultivo de agitación-aireación, cultivo de agitación, cultivo estacionario, cultivo discontinuo, cultivo continuo, cultivo discontinuo rotatorio o cultivo en oleadas, o similares.

35 Las siguientes condiciones son un ejemplo de condiciones que pueden permitir la producción de un conjunto de lípidos en rendimientos que permiten su uso como una materia prima. La investigación de las condiciones de cultivo para ONC-T18 reveló que el microorganismo eucariota desvelado en el presente documento crecía bien en agua marina natural o artificial o en un medio que contenía hasta un 5 % de concentración de agua marina natural o artificial. Las fuentes de nitrógeno y carbono añadidas al medio pueden ser las usadas convencionalmente como se ha descrito anteriormente. La fuente de nitrógeno que es de naturaleza natural u orgánica es relativamente igual y la concentración de nitrógeno total dentro del medio se mantiene constante. Estas fuentes se añaden al medio a concentraciones convencionales. Si se cumplen estas condiciones, se produce poca influencia en el contenido de lípido, proporciones o la cantidad de DHA, DPA y EPA acumulada, como se desvela en el presente documento.

40 Para fermentación de alta concentración de ONC-T18, es posible usar varios métodos para aumentar tanto la biomasa celular como las velocidades de producción de lípidos. Estos incluyen aumentar tanto la concentración de carbono como de nitrógeno en el medio (a una relación de entre 6:1 y 15:1, preferentemente entre 6:1 y 13:1 y a temperaturas entre 4 y 30 °C, preferentemente 18 y 28 °C) del intervalo 5 g l<sup>-1</sup> a 60 g l<sup>-1</sup> al intervalo 100 g l<sup>-1</sup> y 160 g l<sup>-1</sup> y del intervalo 4 g l<sup>-1</sup> a 10 g l<sup>-1</sup> al intervalo 40 g l<sup>-1</sup> a 60 g l<sup>-1</sup>, respectivamente. Usando este método también se aumenta la proporción de biomasa y lípido producida a velocidades comparables. Además, es posible aumentar la producción de lípidos mediante el uso de fuentes de carbono aumentadas desde el intervalo de 5 g l<sup>-1</sup> a 60 g l<sup>-1</sup> al intervalo de 100 g l<sup>-1</sup> y 160 g l<sup>-1</sup>, mientras que la fuente de nitrógeno permanece constante. Adicionalmente, es posible aumentar la producción de biomasa manteniendo al mismo tiempo el contenido de lípidos, mediante el uso de cantidades aumentadas de fuentes de nitrógeno desde el intervalo de 10 g l<sup>-1</sup> a 60 g l<sup>-1</sup> mientras que la fuente de

carbono permanece constante. Además, la experimentación ha determinado que la producción de biomasa y lípidos aumenta en gran medida con aumento de la agitación desde el intervalo de 100 y 1000 rpm, mejor entre 350 y 600 rpm y óptimo entre 350 y 450 rpm, solamente con una reducción marginal del contenido de lípidos y ninguna reducción de los perfiles de ácidos grasos, con agitación particularmente relevante en los estadios tempranos de fermentación heterotrófica. La experimentación también ha determinado que se consigue producción de lípidos óptima cuando el contenido de oxígeno disuelto del medio de cultivo está entre 1 y 10 %, óptimamente a 5 %. Finalmente, la adición de acetato, oligoelementos, metales y vitaminas al medio de producción (como se ha mencionado anteriormente) aumenta la producción de DHA, EPA y DPA con respecto a otros ácidos grasos sin reducir los valores de lípidos totales.

Realizando fermentación heterotrófica, como se ha descrito anteriormente, es posible producir uniformemente biomasa celular que produce un lípido que contiene la serie (n-3) de DHA en un cultivo de alta concentración de no menos de 5 g y más preferentemente no menos de 20 g/l de medio. Además, la experimentación ha mostrado que la mayoría de estos lípidos se acumulan durante los estadios de transición/exponencial posteriores de cultivo, después de alcanzarse los niveles de biomasa máximos. Sin embargo, durante el proceso de fermentación, el contenido de lípidos normalmente no cae por debajo del 25 % de la biomasa total, normalmente maximizándose a aproximadamente el 80 %. El cultivo en las condiciones anteriores puede realizarse usando un fermentador de agitación convencional. También es posible usar una columna de burbujas fermentada (cultivos discontinuos o continuos) o un fermentador en oleadas.

La recogida de biomasa celular antes del procesamiento para la separación de lípidos puede realizarse usando diversos métodos convencionales tales como centrifugación (tal como centrifugas de eyección de sólidos) o filtración (tal como filtración de flujo cruzado) y también pueden incluir el uso de un agente de precipitación para la recogida acelerada de biomasa celular (tal como fosfato sódico, cloruro cálcico o poliacridamida).

## 5. Aislamiento de lípidos

La Figura 7 muestra perfiles de lípidos y DHA en función de diversos parámetros. Todos estos datos pueden usarse para extraer características específicas acerca del microorganismo eucariota ONC-T18. La Figura 13 muestra un perfil de ácidos grasos general para el eucariota desvelado.

La grasa que contiene la serie (n-3) de DHA y la serie (n-6) de DPA puede obtenerse degradando o rompiendo la biomasa celular recogida, por ejemplo, mediante molienda, sometiendo a ultrasonido y llevando a cabo después la extracción con un disolvente tal como cloroformo, hexano, metanol, etanol o mediante medios de extracción de fluidos supercríticos. El contenido de la grasa resultante que contiene la serie (n-3) de DHA y la serie (n-6) de DPA por gramo de biomasa celular seca es preferentemente mayor de 0,25 g y más preferentemente mayor de 0,6 g.

Los microorganismos eucariotas desvelados, tales como ONC-T18, pueden producir lípido obtenido de este modo, cualquiera de sus variantes y cualquier asociación entre miembros de la misma especie de microorganismos eucariotas por lo que el perfil lipídico es el siguiente. El porcentaje de lípidos neutros puede ser de al menos 95 % en peso de lípidos totales. Una composición típica de ácidos grasos para el microorganismo eucariota, tal como ONC-T18, en los lípidos neutros es la siguiente: 15 % de ácido mirístico, 8 % de ácido pentadecanoico, 35 % de ácido palmítico, 7 % de ácido palmitoleico, 1 % de ácido esteárico, 2 % de ácido oleico, 1 % de ácido eicosapentaenoico, 6 % de ácido decosapentaenoico y 25 % de ácido docosahexaenoico (espectros de GC mostrados en la Figura 1).

Los microorganismos eucariotas desvelados, tales como ONC-T18, pueden producir lípido obtenido de este modo, cualquiera de sus variantes y cualquier asociación entre miembros de la misma especie de microorganismos eucariotas por lo que el perfil lipídico es el siguiente. El porcentaje de mono, di y triglicéridos en la fracción de lípidos neutros de ONC-T18 es de 0 % a aproximadamente 2 %, de 0 % a aproximadamente 2 % y de 96 a aproximadamente 100 %, respectivamente. Mientras que la fracción de lípidos polares, que comprende entre 5 % y aproximadamente 10 % de la fracción de lípidos, comprende fosfatidilcolina, fosfatidilserina y ácido fosfatídico tanto unido como no unido a lípidos neutros.

Se entiende que estos lípidos pueden encontrarse en cualquier combinación o permutación dentro del organismo. También se entiende que las concentraciones de estos lípidos pueden manipularse cambiando las condiciones de cultivo y las condiciones de los medios como se analiza en el presente documento.

### (1) Lípido como concentración

El microorganismo eucariota puede producir una fracción de lípidos que comprende DHA n-3, EPA y DPA n-6 a más de o igual a aproximadamente  $4,0 \text{ g l}^{-1}$  de medio. El microorganismo eucariota puede producir una composición de lípidos que comprende DHA n-3, EPA y DPA n-6 a más de o igual a aproximadamente  $20,0 \text{ g l}^{-1}$  de medio. El microorganismo eucariota puede producir una composición de lípidos que comprende DHA n-3, EPA y DPA n-6 a más de o igual a aproximadamente  $14,0 \text{ g l}^{-1}$  de medio. El microorganismo eucariota puede producir de aproximadamente  $1,5 \text{ g l}^{-1}$  a aproximadamente  $5,0 \text{ g l}^{-1}$  (por ejemplo, aproximadamente  $4,6 \text{ g l}^{-1}$ ) del DHA n-3, de aproximadamente  $0,5 \text{ g l}^{-1}$  a aproximadamente  $1,5 \text{ g l}^{-1}$  (por ejemplo, aproximadamente  $0,22 \text{ g l}^{-1}$ ) del EPA n-3 y de

aproximadamente 0,5 g l<sup>-1</sup> a aproximadamente 1,5 g l<sup>-1</sup> del DPA n-6. Además, el microorganismo eucariota puede producir una fracción de lípidos que comprende ácidos mirístico, miristoleico, pentadecanoico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, eicosadienoico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico y docosapentaenoico entre 301,2 y 360,3 mg g<sup>-1</sup> o incluso hasta 790 mg g<sup>-1</sup> de biomasa celular. El microorganismo eucariota también puede producir una fracción que comprende entre 44,3 y 57 mg g<sup>-1</sup> de ácido mirístico (igual a de 1134,5 a 1458,1 mg l<sup>-1</sup>), de 0,5 a 0,65 ácido miristoleico (igual a de 13,3 a 16,63 mg l<sup>-1</sup>), de 33,5 a 34,6 mg g<sup>-1</sup> de ácido pentadecanoico (igual a de 856,9 a 885,1 mg l<sup>-1</sup>), 121,9 y 165,1 mg g<sup>-1</sup> de ácido palmítico (igual a de 3118,2 a 4223,3 mg l<sup>-1</sup>), de 7,9 a 28,5 mg g<sup>-1</sup> de ácido palmitoleico (igual a de 202,1 a 729 mg l<sup>-1</sup>), de 4,38 a 5,9 mg g<sup>-1</sup> de ácido esteárico (igual a de 112 a 151 mg l<sup>-1</sup>), de 6,94 a 9,9 mg g<sup>-1</sup> de ácido oleico (igual a de 177,5 a 253,2 mg l<sup>-1</sup>), de 0,4 a 1,3 mg g<sup>-1</sup> de ácido linoleico (igual a de 11,26 a 33,3 mg l<sup>-1</sup>), de 0,5 a 1,0 mg g<sup>-1</sup> de ácido eicosadienoico (igual a de 12,8 a 25,6 mg l<sup>-1</sup>), de 0,4 a 0,5 mg g<sup>-1</sup> de ácido araquidónico (igual a de 10,2 a 13 mg l<sup>-1</sup>), de 75 a 100 mg g<sup>-1</sup> de ácido docosahexanoico (igual a de 1918 a 2560 mg l<sup>-1</sup>), de 1,9 a 6 mg g<sup>-1</sup> de ácido eicosapentaenoico (igual a de 48,6 a 153,5 mg l<sup>-1</sup>) y de 17,1 a 33,7 mg g<sup>-1</sup> de ácido docosapentaenoico (igual a de 437,4 a 862,1 mg l<sup>-1</sup>), que tienen un contenido de ácidos grasos total dentro de la biomasa celular de entre 301 y 790 mg g<sup>-1</sup> (igual a de 7.700 a 20.209 mg l<sup>-1</sup>).

## (2) Otras moléculas

Adicionalmente, el microorganismo eucariota puede producir carotenoides y xantófilos. Los ejemplos de dichos carotenoides y xantófilos incluyen beta-caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, fenicoxantina, zeaxantina, equinenona, beta-criptoxantina, capsantina, lutina, bija, beta-apo-8-carotenal y beta-apo-8-carotenal-éster.

Los xantófilos producidos por los microorganismos eucariotas desvelados pueden conjugarse con los diversos PUFA también producidos por los microorganismos eucariotas desvelados.

## (A) Antioxidantes

En general, los antioxidantes son compuestos que reaccionan con, y normalmente se consumen por oxígeno. Puesto que los antioxidantes normalmente reaccionan con oxígeno, los antioxidantes también reaccionan normalmente con los generadores de radicales libres y radicales libres. ("The Antioxidants - The Nutrients that Guard Your Body" por Richard A. Passwater, Ph. D., 1985, Keats Publishing Inc.). Las composiciones pueden contener cualquier antioxidante, y una lista no limitante incluiría, pero sin limitación, antioxidantes no flavonoides y nutrientes que pueden eliminar directamente radicales libres incluyendo multi-carotenos, beta-carotenos, alfa-carotenos, gamma-carotenos, licopeno, luteína y zeaxantinas, selenio, vitamina E, incluyendo alfa, beta y gamma (tocoferol, particularmente alfa-tocoferol, etc., succinato de vitamina E y trolox (un análogo de vitamina E soluble) vitamina C (ácido ascórbico) y niacina (vitamina B<sub>3</sub>, ácido nicotínico y nicotinamida), vitamina A, ácido 13-cis retinoico, N-acetil-L-cisteína (NAC), ascorbato sódico, pirrolidin-editio-carbamato, y coenzima Q<sub>10</sub>; enzimas que catalizan la destrucción de radicales libres incluyendo peroxidasa tales como glutatión peroxidasa (GSHPX) que actúa en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tales como peróxidos orgánicos, incluyendo catalasa (CAT) que actúa en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superóxido dismutasa (SOD) que desproporciona O<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutatión transferasa (GSHTx), glutatión reductasa (GR), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (46PD) y miméticos, análogos y polímeros de los mismos (análogos y polímeros de enzimas antioxidantes, tales como SOD, se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° de serie 5.171.680); glutatión, ceruloplasmina, cisteína y cisteamina (beta-mercaptoetilamina) y flavonoides y moléculas de tipo flavonoide como ácido fólico y folato. Puede encontrarse una revisión de enzimas antioxidantes y miméticos de las mismas y nutrientes antioxidantes en Kumar *et al*, Pharmac. Ther. 39: 301,1988 y Machlin L.J. y Bendich, FASEB Journal 1:441-445, 1987.

Los flavonoides, también conocidos como "fenilcromonas", son compuestos de origen natural, solubles en agua, que tienen características antioxidantes. Los flavonoides se distribuyen ampliamente en plantas vasculares y se encuentran en numerosas verduras, frutas y bebidas tales como té y vino (particularmente vino tinto). Los flavonoides son compuestos aromáticos conjugados. Los flavonoides más ampliamente extendidos son flavonas y flavonoles (por ejemplo, miricetina, (3,5,7,3',4',5',-hexahidroxiflavona), quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona), kempferol (3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona) y flavonas apigenina (5,7,4'-trihidroxiflavona) y luteolina (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona) y glucósidos de los mismos y quercetina).

Los carotenoides son pigmentos naturales importantes producidos por muchos microorganismos y plantas, habitualmente de color rojo, naranja o amarillo. Tradicionalmente, los carotenoides se han usado en las industrias de piensos, alimentaria y nutracéutica. Se sabe que son esenciales para el crecimiento y la fotosíntesis de las plantas, y son una fuente dietética importante de vitamina A en seres humanos. Los antioxidantes dietéticos, tales como carotenoides (beta-caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, zeaxantina, capsantina, luteína, bija, beta-apo-8-carotenal y beta-apo-8-carotenal-éster), muestran actividades anticancerosas significativas y desempeñan un papel importante en la prevención de enfermedades crónicas. Los carotenoides son fuertes antioxidantes biológicos que pueden absorber la energía excitada del oxígeno singlete en la cadena de carotenoide, lo que conduce a la degradación de la molécula de carotenoide pero evita que se dañen otras moléculas o tejidos.

Se requiere oxígeno para funciones metabólicas, pero también presenta inconvenientes a las células. El organismo

humano tiene una amplia serie de enzimas metabólicas y antioxidantes para liberar a sus células de moléculas derivadas del oxígeno. Se supone que esta tensión oxidativa es un factor contribuyente a afecciones tales como artritis reumatoide, cardiopatía isquémica e ictus, demencia de Alzheimer, cáncer y envejecimiento. Por lo tanto, los antioxidantes permiten proteger contra un amplio espectro de enfermedades. Se han aislado varios compuestos antioxidantes de fuentes microbianas marinas; estas incluyen astaxantina, beta-caroteno y otros carotenoides.

Los carotenoides son un grupo ampliamente distribuido de pigmentos de origen natural, con más de 700 pigmentos solubles en lípidos naturales principalmente producidos por especies de microalgas, macroalgas, bacterianas y fúngicas, siendo astaxantina y sus derivados particularmente interesantes desde el punto de vista comercial. La astaxantina es un protector antioxidante extremadamente eficaz. Sin embargo, a diferencia del beta-caroteno, la astaxantina atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica/retina, y por lo tanto permite proteger de enfermedades cerebrales y oculares. Los estudios preclínicos sugieren diversos efectos beneficiosos de consumir astaxantina tales como: (i) inhibir la formación y crecimiento de cáncer en la vejiga, colon, hígado, glándulas mamarias y la cavidad oral, (ii) proteger la retina del ojo del daño oxidativo y de este modo tiene un efecto contra la enfermedad macular relacionada con la edad; (iii) promover el aumento de la actividad inmunitaria, (iv) proporcionar protección del daño por luz ultravioleta, así como (v) proporcionar aumento de la resistencia muscular.

#### **b) Aislamiento de microorganismos**

Se desvelan microorganismos de la familia Thraustochytriaceae obtenidos por un método que comprende cebar una muestra vegetativa en agua salina (marina natural o artificial) con granos de polen e incubar; separar y transferir los granos a un medio heterotrófico e incubar; identificar un aislado que produzca ácidos grasos, aislar el microorganismo de la familia Thraustochytriaceae del aislado identificado. Otras formas de aislamiento incluyen medios complementados con antibióticos apropiados e identificación mediante medios microscópicos, como se ha mencionado anteriormente, o mediante el uso de cebadores o sondas de genes de ARNr 18S. El medio heterotrófico puede ser como se describe más adelante.

#### **5. Lípidos y otras moléculas producidas por el microorganismo eucariota**

Se desvelan composiciones lipídicas que comprenden de aproximadamente 25 % en peso a aproximadamente 40 % en peso de DHA n-3, de aproximadamente 6 % en peso a aproximadamente 10 % en peso de DPA n-6, y de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 3 % en peso de EPA n-3.

La composición lipídica puede comprender además de aproximadamente 11 % en peso a aproximadamente 15 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 13 % en peso) de ácido mirístico, de aproximadamente 7 % en peso a aproximadamente 11 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 9 % en peso) de ácido pentadecanoico, de aproximadamente 37 % en peso a aproximadamente 41 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 39 % en peso) de ácido palmítico, de aproximadamente 3 % en peso a aproximadamente 7 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 5 % en peso) de ácido palmitoleico, de aproximadamente 0 a aproximadamente 3 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 1 % en peso) de ácido esteárico o de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 4 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 2 % en peso) de ácido oleico.

La composición lipídica puede comprender DHA n-3 en concentraciones de más de aproximadamente 400 mg de biomasa, DPA n-6 en concentraciones de más de 100 mg de biomasa.

La composición lipídica puede comprender además carotenoides. Los ejemplos de dichos carotenoides incluyen beta-caroteno, licopeno, astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenona, fenicoxantina, capsantina, luteína, bija, beta-apo-8-carotenal y beta-apo-8-carotenal-éster.

En un aspecto, la composición puede comprender al menos aproximadamente 24 % en peso de DHA n-3, aproximadamente 1 % de DPA n-3, aproximadamente 6 % en peso de DPA n-6 y aproximadamente 1 % en peso de EPA n-3.

#### **6. Composiciones que contienen las moléculas producidas por el microorganismo eucariota**

Un complemento de producto alimentario, composición farmacéutica tanto para seres humanos como para animales (incluyendo marinos) puede comprender la composición (lípidos, lípidos con antioxidante y solamente antioxidante).

También se desvela una fórmula infantil que comprende la composición (lípidos, lípidos con antioxidante y solamente antioxidante).

## C. Métodos

### 1. Métodos para preparar lípidos

5 Se desvelan métodos para preparar una composición lipídica, comprendiendo el método: cultivar un microorganismo eucariota que comprende uno o más microorganismos de la familia Thraustochytriaceae, y aislar la composición lipídica.

10 Puede emplearse diversos procedimientos en la recuperación de la biomasa celular resultante de fermentación en diversos medios de cultivo, tales como por filtración o centrifugación. Las células pueden después lavarse, congelarse, liofilizarse o secarse por pulverización y almacenarse en una atmósfera no oxidante para eliminar la presencia de oxígeno, antes de la incorporación en un alimento o producto alimentario procesado.

15 También pueden extraerse lípidos celulares que contienen los PUFA DHA (n-3), EPA y DPA (n-6) de la biomasa celular por métodos tales como extracción de fluido supercrítico, o mediante extracción con disolventes tales como cloroformo, hexano, cloruro de metileno, o metanol, y el extracto resultante se evapora bajo presión negativa para producir una muestra de material lipídico concentrado. Los PUFA omega-3 y omega-6 pueden concentrarse adicionalmente hidrolizando los lípidos y concentrando la fracción altamente insaturada empleando métodos tradicionales tales como aducción de urea o destilación fraccional, cromatografía en columna o por fraccionamiento de fluido supercrítico. Las células también pueden degradarse o lisarse y extraerse los lípidos en aceites vegetales o animales (por ejemplo, aceites de pescado). Los aceites extraídos pueden refinarse por procedimientos bien conocidos empleados habitualmente para refinar aceites vegetales (por ejemplo, por refinamiento químico o físico). Estos procedimientos de refinamiento retiran impurezas de aceites extraídos antes de usarse o venderse como aceites comestibles. Después de refinar, los aceites pueden usarse directamente como un aditivo de pienso o alimento para producir productos enriquecidos con omega-3 y/u omega-6. Como alternativa, el aceite puede procesarse y purificarse adicionalmente como se perfila posteriormente y después usarse en las aplicaciones anteriores y también en aplicaciones farmacéuticas.

30 En otro procedimiento para la producción de aceites enriquecidos con omega-3 u omega-6 (concentrados), la biomasa celular recogida (fresca o seca) puede romperse o permeabilizarse por técnicas bien conocidas tales como sonicación, métodos de rotura de cizallamiento líquido, molienda con perlas, prensa en alta presión, congelación-descongelación o digestión enzimática de la pared celular. Los lípidos de las células rotas se extraen mediante el uso de un disolvente o mezcla de disolvente tal como hexano, cloroformo, éter o metanol. El disolvente se retira y los lípidos se hidrolizan usando cualquiera de los métodos bien conocidos para convertir triglicéridos a ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos incluyendo hidrólisis básica, ácida o enzimática. Después de completarse la hidrólisis, los compuestos no saponificables se extraen en un disolvente tal como éter, hexano o cloroformo y se retiran. La solución restante se acidifica después mediante la adición de un ácido, y se extrae el ácido graso libre en un disolvente tal como hexano, éter o cloroformo. La solución de disolvente que contiene los ácidos grasos libres puede después enfriarse a una temperatura suficientemente baja para cristalización de los compuestos no de PUFA, que después pueden retirarse mediante filtración, centrifugación o sedimentación, dando como resultado la concentración de los compuestos de PUFA restantes y usarse como complementos nutricionales para seres humanos, como un aditivo alimentario o como aplicaciones farmacéuticas.

45 Además se desvela una composición lipídica preparada por el método desvelado anteriormente. Los microorganismos de la familia Thraustochytriaceae pueden ser cualquiera de los microorganismos desvelados anteriormente.

#### a) Medio

50 El medio heterotrófico puede comprender sal marina (artificial o natural), una o más fuentes de carbono, y una o más fuentes de nitrógeno. La sal marina puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 40,0 g l<sup>-1</sup>. La concentración de la fuente de carbono y nitrógeno usada en condiciones de cultivo convencionales (no para alta concentración, sino más bien para fermentación rentable) queda dentro del intervalo de 5 g l<sup>-1</sup> a 60 g l<sup>-1</sup> y 4 g l<sup>-1</sup> a 10 g l<sup>-1</sup>, respectivamente. Para fermentación de alta concentración, la concentración de la fuente de carbono y nitrógeno usada en condiciones de cultivo convencionales queda dentro del intervalo de 100 g l<sup>-1</sup> y 160 g l<sup>-1</sup> y 40 g l<sup>-1</sup> a 60 g l<sup>-1</sup>, respectivamente. Siendo la tendencia la de la acumulación de aceite, el microorganismo eucariota se cultiva en un medio de cultivo (como los descritos anteriormente) en el que el aporte de nitrógeno se limita después de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas, mientras que el aporte de carbono permanece abundante. Este microorganismo eucariota continúa asimilando el carbono (en forma de azúcares sencillos) pero ya no puede experimentar división celular debido a una falta de nitrógeno para la generación de proteínas relevantes y ácidos nucleicos, siendo el resultado que estos azúcares se convierten en aceites de almacenamiento, de una manera muy similar a la que describe Ratledge C. (Lipid Tech. 16:34-39, 2004) y la Figura 9 representa este fenómeno específico para este organismo.

65 La fuente de nitrógeno puede ser una o más de peptona, extracto de levadura; extracto de malta y glutamato sódico. La fuente de nitrógeno también puede ser agua de macerado de maíz o extracto de semilla de algodón. La fuente de

5 nitrógeno puede comprender extracto de levadura y/o peptona o glutamato monosódico. Por ejemplo, la fuente de nitrógeno puede incluir, pero sin limitación EMD™ YE-MSG, EMD™ YE, EMD™ Peptona-MSG, Sigma™ YE-MSG, Sigma™ YE, Fermtech™ YE-MSG, Fermtech™ YE, o harina de pescado (62 % de proteína). El extracto de levadura puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 2 g l<sup>-1</sup>. El glutamato monosódico puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 8 g l<sup>-1</sup>.

10 La fuente de carbono puede ser una o más de D-trehalosa, glicerol, ácido D-glucónico, ácido L-láctico, ácido D, L-málico, D-ribosa, Tween 20, D-fructosa, acetato, ácido acético, alfa-D-glucosa, maltosa, timidina, L-asparagina, D-xilosa, Tween 40, ácido α-ceto-glutárico, sacarosa, L-glutamina, Tween 80, beta-metil-D-glucósido, maltotriosa, adenosina, ácido fumárico, ácido bromo succínico, L-serina, D-celobiosa, L-alanil-glicina, metil piruvato, ácido L-málico, glicil-L-prolina, D-palcosa, L-lixosa, ácido pirúvico, alfa-D-lactosa, dextrina, D-arabinosa, 2-desoxi-D-ribosa, gelatina, dextrosa, almidón, 3-0-beta-D-galactopiranosil-D-arabinosa, D-tagatosa, ácido 5-ceto-D-glucónico, ácido oxalomálico, ácido sórbico, L-ornitina y dihidroxi acetato. En un aspecto, la fuente de carbono puede ser ácido D, L-málico, D-fructosa, D-xilosa, ácido fumárico, D-celobiosa, ácido 5-ceto-D-glucónico, ácido pirúvico, alfa-D-lactosa, dextrina de maíz, gelatina, almidón de maíz o almidón de trigo. La fuente de carbono puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1 g l<sup>-1</sup> a aproximadamente 60 g l<sup>-1</sup> y hasta aproximadamente 200 g l<sup>-1</sup>.

15 En un ejemplo, el medio puede comprender aproximadamente 5 g de D-glucosa, aproximadamente 2 g de peptona y aproximadamente 2 g de extracto de levadura por litro de agua salada (natural o artificial). En otro, el medio puede comprender aproximadamente 60 g de D-glucosa, aproximadamente 10 g de extracto de levadura por litro de agua salada (natural o artificial). En otro, el medio puede comprender aproximadamente 8 g de extracto de levadura, 32 g de MSG, 24 g de sal marina (natural y artificial) y 300 g de D-glucosa por litro.

20 El medio puede comprender además fosfatos (por ejemplo, fosfato potásico y fosfatos sódicos). El medio puede comprender además sales inorgánicas (por ejemplo, sulfato de amonio, bicarbonato sódico, ortovanadato sódico, cromato potásico, molibdato sódico, ácido selenoso, sulfato de níquel, sulfato de cobre, sulfato de cinc, cloruro de cobalto, cloruro de hierro, cloruro de manganeso). El medio puede comprender además un compuesto quelante (por ejemplo, EDTA). El medio puede comprender además vitaminas (por ejemplo, clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, pantotenato de calcio, ácido p-aminobenzoico, riboflavina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>). El medio puede estar a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,5. La incubación puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 9 días (por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 días). La incubación puede ser a de aproximadamente 18 a aproximadamente 30 °C (por ejemplo, de aproximadamente 18 a 25 °C). La incubación puede comprender además agitación o aireación.

25 El aislamiento del lípido puede comprender poner en contacto los microorganismos con un disolvente de extracción. El disolvente puede comprender uno o más disolventes seleccionados de cloroformo, hexano, metanol o etanol o CO<sub>2</sub> supercrítico.

30 El método puede producir cualquiera de las composiciones como se han desvelado anteriormente.

35 El microorganismo eucariota puede producir una composición lipídica que comprende DHA n-3 a más de o igual a aproximadamente 20 g l<sup>-1</sup> del medio. El microorganismo eucariota puede producir una composición lipídica que comprende DHA n-3 a más de o igual a aproximadamente 40 g l<sup>-1</sup> del medio. El microorganismo eucariota puede producir una composición lipídica que comprende DHA n-3 a más de o igual a aproximadamente 80 g l<sup>-1</sup> del medio.

## 40 2. Métodos de cribado e identificación

45 El microorganismo eucariota como se desvela en el presente documento puede producir un lípido que contenga la serie (n-3) de ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico y la serie (n-6) de DPA. Estos microorganismos eucariotas pueden seleccionarse, por ejemplo, con el siguiente método de cribado. Pueden colocarse (y se colocaron) muestras vegetativas en frascos de 20 ml que contienen 10 ml de agua marina natural filtrada en 0,2 μm estéril que contiene penicilina y estreptomina a 300 y 500 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente. Los frascos se cebaron después con granos de polen estériles y se incubaron durante 48 horas a 18 a 25 °C. Los granos de polen se transfirieron después a placas de agar que contenían antibióticos (como anteriormente) y se incubaron en las mismas condiciones. Se seleccionaron colonias hialinas, irregulares, individuales compuestas de células esféricas o limaciformes y atípicas de colonias de levadura o bacterianas y se sub-cultivaron en el mismo medio y en las mismas condiciones que anteriormente. Estos aislados se cribaron después con respecto al crecimiento y ácidos grasos usando un medio líquido nutriente, preparado con agua marina natural filtrada en 0,2 μm que contenía 5 g l<sup>-1</sup> de glucosa, 2 g l<sup>-1</sup> de peptona y 2 g l<sup>-1</sup> de extracto de levadura, con la biomasa celular resultante recogida por centrifugación o sedimentación dentro de un medio líquido. Los ácidos grasos se transesterificaron directamente usando métodos convencionales, con la composición de metil éster de ácidos grasos analizada mediante cromatografía de gases, con cepas que producen cantidades apropiadas de la serie n-3 de DHA y la serie n-6 de DPA seleccionadas para trabajos posteriores.

50 Se desvelan métodos para identificar un microorganismo eucariota, comprendiendo el método: cebar una muestra vegetativa en agua salada (marina natural o artificial) con granos de polen e incubar; transferir los granos a un medio

heterotrófico e incubar; e identificar aislados que producen ácidos grasos.

También se desvelan composiciones lipídicas producidas por los microorganismos eucariotas anteriormente identificados.

5 También se desvelan composiciones lipídicas producidas por los métodos usando los microorganismos eucariotas desvelados y los métodos desvelados en el presente documento.

10 También se desvelan microorganismos eucariotas (ONC-T18) que tienen el Número de Referencia de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-6245.

También se desvelan microorganismos eucariotas que pertenecen al orden thraustochytriales (ONC-T18) que tienen ARNr 18S, tal como SEC ID 1, e identificados como un *Thraustochytrium* sp.

15 También se desvela un microorganismo eucariota, *Thraustochytrium* sp. capaz de producir DHA y DPA en concentraciones de más de 400 mg l<sup>-1</sup> y 100 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente.

20 También se desvela un microorganismo eucariota, *Thraustochytrium* sp. capaz de producir carotenoides mediante fermentación heterotrófica como se ha mencionado anteriormente en el intervalo de 50 a 1.250 mg kg<sup>-1</sup> y astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenina y beta-caroteno en el intervalo de 1 a 20 mg kg<sup>-1</sup>, 0,25 a 10 mg kg<sup>-1</sup>, 1 a 20 mg kg<sup>-1</sup>, 1 a 20 mg kg<sup>-1</sup> y 1 a 200 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

25 También se desvelan procedimientos para cultivar un microorganismo eucariota que comprenden cultivar el microorganismo eucariota en condiciones en las que las condiciones comprenden un medio que comprende cloruro sódico en forma de sal marina artificial (marina trófica) entre 2,0 y 15,0 g l<sup>-1</sup>; una fuente de nitrógeno en forma de extracto de levadura y glutamato monosódico a 2,0 y 8,0 g de L<sup>-1</sup>, respectivamente; y carbono en forma de glucosa hasta 130 g l<sup>-1</sup>.

30 Los procedimientos desvelados pueden, por ejemplo, cultivar ONC-T18, por lo que al menos el 24 % del peso es DHA, al menos el 6 % en peso es DPA y al menos el 1 % es EPA de ácidos grasos totales.

35 Los procedimientos desvelados para el cultivo también pueden, por ejemplo, cultivar ONC-T18 de modo que al menos el 1 % en peso sea material carotenoide, siendo al menos del 1 al 2 % y al menos 1,2 % de ese astaxantina, siendo del 0,25 y 1 % y al menos 0,45 % zeaxantina, siendo del 5 al 16 % y al menos 9 % cantaxantina, siendo del 1 al 2 % y al menos 1,2 % de ese equinenona y siendo del 12 al 16 % y al menos 14 % en peso beta-caroteno.

### 3. Ácidos nucleicos

40 Hay diversas moléculas desveladas en el presente documento que están basadas en ácidos nucleicos, incluyendo por ejemplo los ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, ARNr, así como cualquier otra proteína desvelada en el presente documento, así como diversos ácidos nucleicos funcionales. Los ácidos nucleicos desvelados están compuestos, por ejemplo, de nucleótidos, análogos de nucleótidos o sustitutos de nucleótidos. Se analizan en el presente documento ejemplos no limitantes de estas y otras moléculas. Se entiende que, por ejemplo, cuando se expresa un vector en una célula, que el ARNm expresado normalmente estará compuesto de A, C, G y U/T. De forma similar, se entiende que si, por ejemplo, una molécula antisentido se introduce en una célula o ambiente celular mediante, por ejemplo, suministro exógeno, es ventajoso que la molécula antisentido esté compuesta de análogos de nucleótidos que reduzcan la degradación de la molécula antisentido en el ambiente celular.

#### a) Nucleótidos y moléculas relacionadas

50 Un nucleótido es una molécula que contiene un resto básico, un resto de azúcar y un resto de fosfato. Los nucleótidos pueden estar unidos entre sí mediante sus restos fosfato y restos de azúcares creando un enlace nucleosídico. El resto básico de un nucleótido puede ser adenin-9-ilo (A), citosin-1-ilo (C), guanin-9-ilo (G), uracil-1-ilo (U), y timin-1-ilo (T). El resto de azúcar de un nucleótido es una ribosa o una desoxirribosa. El resto de fosfato de un nucleótido es fosfato pentavalente. Un ejemplo no limitante de un nucleótido sería 3'-AMP (3'-adenosin monofosfato) o 5'-GMP (5'-guanosin monofosfato).

60 Un análogo de nucleótido es un nucleótido que contiene algún tipo de modificación de los restos de base, azúcar o fosfato. Las modificaciones de nucleótidos se conocen bien en la técnica e incluirían por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina y 2-aminoadenina así como modificaciones en los restos de azúcares o fosfato.

65 Los sustitutos de nucleótidos son moléculas que tienen propiedades funcionales similares a los nucleótidos, pero que no contienen un resto de fosfato, tales como ácido péptido nucleico (PNA). Los sustitutos de nucleótidos son moléculas que reconocerán ácidos nucleicos de una manera Watson-Crick o Hoogsteen, pero que están unidos entre sí mediante un resto distinto de un resto fosfato. Los sustitutos de nucleótidos son capaces de conformarse en

una estructura de tipo doble hélice cuando interactúan con el ácido nucleico diana apropiado.

También es posible unir otros tipos de moléculas (conjugados) con nucleótidos o análogos de nucleótidos para potenciar por ejemplo, la captación celular. Los conjugados pueden estar unidos químicamente al nucleótido o los análogos de nucleótido. Dichos conjugados incluyen pero sin limitación restos lipídicos tales como un resto de colesterol. (Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86:6553-6556, 1989).

Una interacción de Watson-Crick es al menos una interacción con la cara Watson-Crick de un nucleótido, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido. La cara Watson-Crick de un nucleótido, análogo de un nucleótido o sustituto de nucleótido incluye las posiciones C2, N1 y C6 de un nucleótido basado en purina, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido y las posiciones C2, N3, C4 de un nucleótido basado en pirimidina, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido.

Una interacción Hoogsteen es la interacción que tiene lugar en la cara Hoogsteen de un nucleótido o análogo de nucleótido, que se expone en el surco principal de ADN bicatenario. La cara Hoogsteen incluye la posición N7 y grupos reactivos (NH<sub>2</sub> u O) en la posición C6 de nucleótidos de purina.

#### b) Secuencias

Hay diversas secuencias relacionadas con, por ejemplo, SEC ID N° 1, así como cualquier otro ácido nucleico y proteína desvelado en el presente documento que pueda desvelarse en GenBank, y estas secuencias y otras se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad así como para subsecuencias individuales contenidas en las mismas.

Se proporciona diversas secuencias en el presente documento y estas y otras pueden encontrarse en GenBank, en [www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov). Los expertos en la materia entienden cómo resolver discrepancias y diferencias de secuencia y ajustar las composiciones y métodos relacionados con una secuencia particular o con otras secuencias relacionadas. Pueden diseñarse cebadores y/o sondas para cualquier secuencia dada la información desvelada en el presente documento y conocida en la técnica.

#### c) Cebadores y sondas

Se desvelan composiciones que incluyen cebadores y sondas, que son capaces de interactuar con los genes desvelados en el presente documento. En ciertas realizaciones, los cebadores se usan para apoyar reacciones de amplificación de ADN. Normalmente los cebadores serán capaces de extenderse de una manera específica de secuencia. La extensión de un cebador de una manera específica de secuencia incluye cualquier método en el que la secuencia y/o composición de la molécula de ácido nucleico con la que el cebador se hibrida o se asocia de otro modo dirige o influye en la composición o secuencia del producto producido por la extensión del cebador. La extensión del cebador de una manera específica de secuencia incluye por lo tanto, pero sin limitación, PCR, secuenciación de ADN, extensión de ADN, polimerización de ADN, transcripción de ARN o transcripción inversa. Se prefieren técnicas y condiciones que amplifiquen el cebador de una manera específica de la secuencia. En ciertos aspectos los cebadores pueden usarse como sondas específicas de especie o género para el *Thraustochytrium* o *Bacillus* mencionados en el presente documento. En este caso, los cebadores se diseñarían para ser específicos del microorganismo eucariota, con reacciones de PCR llevadas a cabo posteriormente. La presencia de especies diana se determinaría después mediante formación de producto por PCR exitosa. En ciertos aspectos los cebadores también pueden usarse para reacciones de amplificación de ADN, tales como PCR o secuenciación directa. Se entiende que en ciertos aspectos los cebadores también pueden extenderse usando técnicas no enzimáticas, en las que, por ejemplo, los nucleótidos u oligonucleótidos usados para extender el cebador se modifican de tal modo que reaccionen químicamente para extender el cebador de una manera específica de secuencia. Normalmente los cebadores desvelados hibridan con el ácido nucleico o región del ácido nucleico o hibridan con el complemento del ácido nucleico o complemento de una región del ácido nucleico.

#### d) Suministro de ácido nucleico

En los métodos descritos anteriormente que incluyen la administración y captación de ADN exógeno en las células de un sujeto (es decir, transducción o transfección génica), los ácidos nucleicos desvelados pueden estar en forma de ADN o ARN desnudo, o los ácidos nucleicos pueden estar en un vector para suministrar los ácidos nucleicos a las células, por lo que el fragmento de ADN que codifica anticuerpos está bajo la regulación transcripcional de un promotor, como se entendería bien por un experto habitual en la materia. El vector puede ser una preparación disponible en el mercado, tal como un vector de adenovirus (Quantum Biotechnologies, Inc. (Laval, Quebec, Canadá)). El suministro del ácido nucleico o vector a células puede ser mediante diversos mecanismos. Como un ejemplo, el suministro puede ser mediante un liposoma, usando preparaciones de liposomas disponibles en el mercado tales como LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), así como otros liposomas desarrollados de acuerdo con procedimientos convencionales en la técnica. Además, el ácido nucleico o vector desvelado puede suministrarse *in vivo* por electroporación, cuya tecnología está disponible de Genetronics, Inc. (San

Diego, CA) así como por medio de una máquina de sonoporación (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, AZ).

Como un ejemplo, el suministro del vector puede ser mediante un sistema viral, tal como un sistema de vector retroviral que puede empaquetar un genoma retroviral recombinante (véase, por ejemplo, Pastan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:4486, 1988; Miller *et al.*, Mol. Cell. Biol. 6:2895, 1986). El retrovirus recombinante puede después usarse para infectar y de este modo suministrar a las células infectadas ácido nucleico que codifica un anticuerpo ampliamente neutralizador (o fragmento activo del mismo). El método exacto para introducir el ácido nucleico alterado en células de mamífero, por supuesto, no está limitado al uso de vectores retrovirales. Otras técnicas están ampliamente disponibles para este procedimiento incluyendo el uso de vectores adenovirales (Mitani *et al.*, Hum. Gene Ther. 5:941-948, 1994), vectores virales adeno-asociados (AAV) (Goodman *et al.*, Blood 84:1492-1500, 1994), vectores lentivirales (Naidini *et al.*, Science 272:263-267, 1996), vectores retrovirales pseudotipados (Agrawal *et al.*, Exper. Hematol. 24:738-747, 1996). También pueden usarse técnicas de transducción física, tales como suministro por liposomas y mecanismos mediados por receptor y otros de endocitosis (véase, por ejemplo, Schwartzberger *et al.*, Blood 87:472-478, 1996). Estas composiciones y métodos desvelados pueden usarse junto con cualquiera de estos u otros métodos de transferencia de genes.

#### 4. Sistemas de expresión

Los ácidos nucleicos que se suministran a células normalmente contienen sistemas de control de la expresión. Por ejemplo, los genes insertados en sistemas virales y retrovirales habitualmente contienen promotores y/o potenciadores para ayudar a controlar la expresión del producto génico deseado. Un promotor generalmente es una secuencia o secuencias de ADN que actúan cuando están en una localización relativamente fija con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Un promotor contiene elementos principales requeridos para la interacción básica de ARN polimerasa y factores de transcripción, y pueden contener elementos cadena arriba y elementos de respuesta.

Se entiende que hay diversos sistemas de control de la transcripción que pueden usarse en los organismos desvelados en el presente documento, además de los sistemas generales analizados posteriormente. Se entiende que los organismos desvelados en el presente documento pueden transfectarse y transformarse con diversos genes, tales como genes marcadores, como se analiza en el presente documento, o genes que tienen otros atributos deseables, tales como características de crecimiento potenciadas o únicas.

##### a) Promotores y potenciadores virales

Pueden obtenerse promotores preferidos que controlan la transcripción de vectores en células hospedadoras de mamífero de diversas fuentes, por ejemplo, los genomas de virus tales como: poliovirus, virus de simio 40 (SV40), adenovirus, retrovirus, virus de hepatitis B y más preferentemente citomegalovirus o de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotor de beta actina. Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40 (Fiers *et al.*, Nature, 273:113, 1978). El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de *HindIII* E (Greenway, P.J. *et al.*, Gene 18:355-360, 1982). Por supuesto, los promotores de la célula hospedadora o especies relacionadas también son útiles en el presente documento.

El potenciador generalmente se refiere a una secuencia de ADN que actúa a una distancia no fija del sitio de inicio de la transcripción y puede estar 5' (Laimins, L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 78:993, 1981) o 3' (Lusky, M.L., *et al.*, Mol. Cell Bio. 3:1108, 1983) de la unidad de transcripción. Además, los potenciadores pueden estar dentro de un intrón (Banerji, J.L. *et al.*, Cell 33:729, 1983) así como dentro de la secuencia codificante en sí misma (Osborne, T.F., *et al.*, Mol. Cell Bio. 4:1293, 1984). Son habitualmente de entre 10 y 300 pb de longitud, y actúan en *cis*. Los potenciadores actúan para aumentar la transcripción de promotores cercanos. Los potenciadores también contienen con frecuencia elementos de respuesta que median en la regulación de la transcripción. Los promotores también pueden contener elementos de respuesta que median en la regulación de la transcripción. Los potenciadores con frecuencia determinan la regulación de expresión de un gen. Aunque se conocen en la actualidad muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina), normalmente uno usará un potenciador de un virus de células eucariotas para expresión general. Son ejemplos preferidos el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

El promotor y/o potenciador puede activarse específicamente mediante luz o acontecimientos químicos específicos que desencadenan su función. Los sistemas pueden regularse por reactivos tales como tetraciclina y dexametasona. También hay maneras de potenciar la expresión génica del vector viral mediante exposición a irradiación, tal como irradiación gamma, o fármacos quimioterapéuticos alquilantes.

En ciertas realizaciones el promotor y/o región potenciadora puede actuar como un promotor y/o potenciador constitutivo para maximizar la expresión de la región de la unidad de transcripción para transcribir. En ciertas construcciones el promotor y/o región potenciadora puede estar activo en todos los tipos celulares eucariotas,

incluso si solamente se expresa en un tipo particular de célula en un momento particular. Un promotor preferido de este tipo es el promotor de CMV (650 pb). Otros promotores preferidos son promotores de SV40, citomegalovirus (promotor de longitud completa) y vector retroviral LTF.

5 Se ha mostrado que todos los elementos reguladores específicos pueden clonarse y usarse para construir vectores de expresión que se expresan selectivamente en tipos celulares específicos tales como células de melanoma. El promotor de proteínas acéticas fibrilares gliales (GFAP) se ha usado para expresar selectivamente genes en células de origen glial.

10 Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o nucleadas) también pueden contener secuencias necesarias para la terminación o transcripción que pueden afectar a la expresión del ARNm. Estas regiones se transcriben como segmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica la proteína del factor tisular. Las regiones no traducidas 3' también incluyen sitios de terminación de la transcripción. Se prefiere que la unidad de transcripción  
15 también contenga una región de poliadenilación. Un beneficio de esta región es que aumenta la probabilidad de que la unidad transcrita se procese y transporte como ARNm. La identificación y uso de señales de poliadenilación en construcciones de expresión está bien establecida. Se prefiere que se usen señales de poliadenilación homóloga en las construcciones de transgenes. En ciertas unidades de transcripción, la región de poliadenilación deriva de la señal de poliadenilación temprana de SV40 y consiste en aproximadamente 400 bases. También se prefiere que las  
20 unidades transcritas contengan otras secuencias convencionales solas o en combinación con las secuencias anteriores que mejoran la expresión de, o estabilidad de, la construcción.

#### b) Marcadores

25 Los vectores virales pueden incluir secuencias de ácidos nucleicos que codifican un producto marcador. Este producto marcador se usa para determinar si el gen se ha suministrado a la célula y una vez suministrado se expresa. Son genes marcadores preferidos el gen *lacZ* de *E. coli*, que codifica  $\beta$ -galactosidasa, y la proteína verde fluorescente.

30 En algunas realizaciones el marcador puede ser un marcador seleccionable. Son ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina quinasa, neomicina, análogo de neomicina G418, hidromicina y puromicina. Cuando dichos marcadores seleccionables se transfieren de forma exitosa a una célula hospedadora de mamífero, la célula hospedadora de mamífero transformada puede sobrevivir si se sitúa bajo presión selectiva. Hay dos categorías distintas ampliamente usadas de regímenes selectivos. La primera categoría se basa en el metabolismo de una célula y el uso de una línea celular mutante que carece de la capacidad para crecer independiente de un medio complementado. Son dos ejemplos: células CHO  
35 DHFR y células LTK de ratón. Estas células carecen de la capacidad para crecer sin la adición de nutrientes tales como timidina o hipoxantina. Debido a que estas células carecen de ciertos genes necesarios para una ruta de síntesis de nucleótidos completa, no pueden sobrevivir a no ser que los nucleótidos ausentes se proporcionen en un medio complementado. Una alternativa a complementar el medio es introducir un gen de DHFR o TK intacto en células que carecen de los genes respectivos, alterando de este modo sus requisitos de crecimiento. Las células individuales que no se transformaron con el gen de DHFR o TK no serán capaces de sobrevivir en medios no complementados.

45 La segunda categoría es selección dominante lo que se refiere a un esquema de selección usado en cualquier tipo celular y no requiere el uso de una línea celular mutante. Estos esquemas normalmente usan un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Las células que tienen un nuevo gen expresarían una proteína que transmitiría resistencia a fármacos y sobreviviría a la selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, (Southern P. y Berg, P., J. Molec. Appl. Genet. 1:327, 1982), ácido micofenólico, (Mulligan, R.C. y Berg, P. Science 209:1422,1980) o higromicina, (Sugden, B. *et al.*, Mol. Celular. Biol. 5:410-413, 1985). Los tres ejemplos emplean genes bacterianos bajo el control eucariota para transmitir resistencia al fármaco apropiado G418 o neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofenólico) o higromicina, respectivamente. Otros incluyen el análogo de neomicina G418 y puramicina.

#### 55 5. Péptido

##### a) Variantes proteicas

60 Como se analiza en el presente documento hay numerosas variantes de las proteínas de organismos desvelados que se conocen y se contemplan en el presente documento. Además, para la cepa de thraustochytriales funcional hay derivados de las proteínas de thraustochytriales que también actúan en los métodos y composiciones desvelados. Se entienden bien por los expertos en la materia las variantes y derivados de proteínas y pueden implicar modificaciones de secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones de secuencia de aminoácidos normalmente quedan en una o más de tres clases: variantes de sustitución, de inserción o de delección. Las inserciones incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales así como inserciones intrasecuencia de restos de  
65 aminoácidos individuales o múltiples. Las inserciones habitualmente serán inserciones más pequeñas que las de

fusiones amino o carboxilo terminales, por ejemplo, en el orden de uno a cuatro restos. Se preparan derivados de proteínas de fusión inmunogénica, tales como los descritos en los ejemplos, fusionando un polipéptido suficientemente grande para conferir inmunogenicidad a la secuencia diana por reticulación *in vitro* o por cultivo de células recombinantes transformado con ADN que codifica la fusión. Las delecciones se caracterizan por la retirada de uno o más restos de aminoácidos de la secuencia de proteína. Normalmente, no se suprimen más de aproximadamente 2 a 6 restos en ningún sitio único dentro de la molécula proteica. Estas variantes habitualmente se preparan por mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína, produciendo de este modo ADN que codifica la variante, y a continuación expresando el ADN en cultivo celular recombinante. Se conocen bien técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en ADN que tenga una secuencia conocida, por ejemplo mutagénesis de cebador M13 y mutagénesis por PCR. Las sustituciones de aminoácidos son normalmente de restos individuales, pero pueden producirse en varias localizaciones diferentes a la vez; las inserciones habitualmente serán en el orden de aproximadamente 1 a 10 restos de aminoácidos; y las delecciones variarán de aproximadamente 10 a 30 restos. Se realizan preferentemente delecciones o inserciones en pares adyacentes, es decir una delección de 2 restos o inserción de 2 restos. Las sustituciones, delecciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas pueden combinarse para llegar a una construcción final. Las mutaciones no deben colocar la secuencia fuera de la fase de lectura y preferentemente no crearán regiones complementarias que puedan producir estructura de ARNm secundaria. Son variantes de sustitución aquellas en las que se ha retirado al menos un resto y se ha insertado un resto diferente en su lugar. Dichas sustituciones generalmente se preparan de acuerdo con las siguientes Tablas 1 y 2 y se denominan sustituciones conservativas.

Se realizan cambios sustanciales en la función o identidad inmunológica seleccionando sustituciones que son menos conservativas que las de la Tabla 2, es decir, seleccionando restos que difieren más significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que se espera en general que produzcan los mayores cambios en las propiedades de la proteína serán aquellas en las que (a) un resto hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, sustituya a (o se sustituya por) un resto hidrófobo, por ejemplo leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina sustituya a (o se sustituya por) cualquier otro resto; (c) un resto que tenga una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo, sustituya a (o se sustituya por) un resto electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un resto que tenga una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina sustituya a (o se sustituya por) uno que no tenga una cadena lateral, por ejemplo, glicina, en este caso, (e) aumentando el número de sitios para sulfatación y/o glucosilación.

TABLA 1: Abreviaturas de aminoácidos

Aminoácido	Abreviaturas
Alanina	Ala A
Arginina	Arg R
Asparagina	Asn N
Ácido aspártico	Asp D
Cisteína	Cys C
Glutamina	Gln Q
Ácido glutámico	Glu E
Glicina	Gly T
Histidina	His H
Isoleucina	Ile I
Leucina	Leu L
Lisina	Lys K
Metionina	Met M
Fenilalanina	Phe F
Prolina	Pro P
Serina	Ser S
Treonina	Thr T
Triptófano	Trp W
Tirosina	Tyr Y
Valina	Val V

TABLA 2: Sustituciones de aminoácidos

Resto original	Sustituciones conservativas ejemplares*
Ala	Ser
Arg	Lys; Gln
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn; Lys
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Pro	Gly
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

\* Se conocen otras en la técnica

- Por ejemplo, el reemplazo de un resto de aminoácido con otro que es biológicamente y/o químicamente similar se conoce por los expertos en la materia como una sustitución conservativa. Por ejemplo, una sustitución conservativa sería reemplazar un resto hidrófobo por otro, o un resto polar por otro. Las sustituciones incluyen combinaciones tales como, por ejemplo, Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu, Asn, Gln; Ser, Thr, Lys, Arg, y Phe, Tyr. Dichas variaciones sustituidas de forma conservativa de cada secuencia desvelada de forma explícita se incluyen dentro de los polipéptidos mosaico proporcionados en el presente documento.
- 5
- 10 Puede emplearse mutagénesis de sustitución o deleción para insertar sitios para N-glucosilación (Asn-X-Thr/Ser) u O-glucosilación (Ser o Thr). También pueden ser deseables deleciones de cisteína u otros restos lábiles. Se consiguen deleciones o sustituciones de sitios de proteólisis potenciales, por ejemplo, Arg, por ejemplo suprimiendo uno de los restos básicos o sustituyendo uno por restos de glutaminilo o histidilo.
- 15 Ciertas derivatizaciones post-traduccionales son el resultado de la acción de células hospedadoras recombinantes en el polipéptido expresado. Los restos de glutaminilo y asparaginilo frecuentemente se desamidán post-traduccionamente a los restos de glutamilo y asparilo correspondientes. Como alternativa, estos restos se desamidán en condiciones suavemente ácidas. Otras modificaciones post-traduccionales incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos de serilo o treonilo, metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco págs. 79-86, 1983), acetilación de la amina N-terminal y, en algunos casos, amidación del carboxilo C-terminal.
- 20
- 25 Se entiende que un modo de definir las variantes y derivados de las proteínas desveladas en el presente documento es definiendo las variantes y derivados con respecto a homología/identidad con secuencias conocidas específicas. Específicamente se desvelan variantes de proteínas desveladas en el presente documento que tienen al menos, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de homología con la secuencia indicada. Los expertos en la técnica entienden fácilmente cómo determinar la homología de dos proteínas. Por ejemplo, la homología puede calcularse después de alinear las dos secuencias de modo que la homología esté en su máximo nivel.
- 30
- 35 Otro modo de calcular la homología puede realizarse por algoritmos publicados. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 2444, 1988, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección.
- Los mismos tipos de homología pueden obtenerse para ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante los algoritmos

desvelados en Zuker, M. *Science* 244:48-52, 1989, Jaeger *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:7706-7710, 1989, Jaeger *et al.* *Methods Enzymol.* 183:281-306, 1989.

Se entiende que la descripción de mutaciones conservativas y homología pueden combinarse entre sí en cualquier combinación, tal como realizaciones que tienen al menos 70 % de homología con una secuencia particular en la que las variantes son mutaciones conservativas.

Como la presente memoria descriptiva analiza diversas proteínas y secuencias proteicas se entiende que los ácidos nucleicos que pueden codificar esas secuencias proteicas también se desvelan. Esto incluiría todas las secuencias degeneradas relacionadas con una secuencia proteica específica, es decir, todos los ácidos nucleicos que tienen una secuencia que codifica una secuencia proteica particular así como todos los ácidos nucleicos, incluyendo ácidos nucleicos degenerados, que codifican las variantes desveladas y derivados de las secuencias proteicas. Por lo tanto, aunque cada secuencia de ácido nucleico particular puede no estar escrita en el presente documento, se entiende que todas y cada una de las secuencias se desvelan de hecho y se describen en el presente documento mediante la secuencia proteica desvelada. También se entiende que aunque ninguna secuencia de aminoácidos indica qué secuencia de ADN particular codifica esa proteína dentro de un organismo, cuando se desvelan en el presente documento variantes particulares de una proteína desvelada, la secuencia de ácido nucleico conocida que codifica esa proteína en la cepa particular de la que surge esa proteína también se conoce y se desvela y se describe en el presente documento.

Se entiende que hay numerosos análogos de aminoácidos y péptidos que pueden incorporarse en las composiciones desveladas. Por ejemplo, hay numerosos aminoácidos D o aminoácidos que tienen un sustituyente funcional diferente de los aminoácidos mostrados en la Tabla 1 y la Tabla 2. Se desvelan los estereoisómeros opuestos de péptidos de origen natural, así como los estereoisómeros de análogos peptídicos. Estos aminoácidos pueden incorporarse fácilmente en cadenas polipeptídicas cargando moléculas de ARNt con los aminoácidos elegidos y obteniendo por ingeniería genética construcciones genéticas que utilizan, por ejemplo, codones ámbar, para insertar el aminoácido análogo en una cadena peptídica de una manera específica de sitio (Thorson *et al.*, *Methods in Mol. Biol.* 77:43-73, 1991, Zoller, *Curr. Opin. Biotech.*, 3:348-354, 1992; Ibbá, *Biotechnol. Genet. Eng.* 13:197-216, 1995, Cahill *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 14:400-403, 1989; Benner, *Trends Biotechnol.*, 12:158-163, 1994).

Pueden producirse moléculas que se asemejan a péptidos, pero que no están conectadas mediante un enlace peptídico natural. Por ejemplo, los enlaces para aminoácidos o análogos de aminoácidos pueden incluir  $\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-$  (cis y trans),  $-\text{COCH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$  y  $-\text{CH}_2\text{SO}$  (estas y otras pueden encontrarse en Spatola, A.F. en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267, 1983, Spatola, A.F., Vega Data (marzo de 1983), Vol.1, N° 3, Modifications (revisión general); Morley, *Trends Pharm. Sci.* 463-468, 1980; Hudson, D. *et al.*, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 14:177-185, 1979 ( $\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), Spatola *et al.* *Life Sci.* 38:1243-1249, 1986 ( $-\text{CH}_2-\text{S}$ ); Hann J. *Chem. Soc. Perkin Trans.* 1307-314, 1982 ( $-\text{CH}-\text{CH}-$ , cis y trans); Almquist *et al.* *J. Med. Chem.* 23:1392-1398, 1980 ( $-\text{COCH}_2-$ ); Jennings-White *et al.* *Tetrahedron Lett.* 23:2533, 1982 ( $-\text{COCH}_2-$ ); Szelke *et al.* *Europea Appln.* EP 45665 CA: 97:39405, 1982 ( $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ); Holladay *et al.* *Tetrahedron Lett.* 24:4401-4404, 1983 ( $-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ), y Hruby *Life Sci.* 31:189-199, 1982 ( $-\text{CH}_2-\text{S}$ ).

Un enlace no peptídico particularmente preferido es  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ . Se entiende que los análogos peptídicos pueden tener más de un átomo entre los átomos del enlace, tales como  $\beta$ -alanina, ácido g-aminobutírico, y similares.

Los análogos de aminoácidos y análogos y análogos peptídicos con frecuencia tienen propiedades potenciadas o deseables, tales como, producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas potenciadas (semivida, absorción, potencia, eficacia, etc.), especificidad alterada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas), antigenicidad reducida y otras.

Pueden usarse D-aminoácidos para generar péptidos más estables, debido a que los aminoácidos D no se reconocen por peptidasas y similares. Puede usarse sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un aminoácido D del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) para generar péptidos más estables. Pueden usarse restos de cisteína para ciclar o unir dos o más péptidos entre sí. Esto puede ser beneficioso para restringir los péptidos a conformaciones particulares. (Rizo y Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387, 1992).

## 6. Complementos

También se desvelan en el presente documento complementos nutricionales. Un complemento nutricional es cualquier compuesto o composición que puede administrarse a o tomarse por un sujeto para proporcionar, aportar, o aumentar un nutriente (o nutrientes) (por ejemplo, vitamina, mineral, oligoelemento esencial, aminoácido, péptido, ácido nucleico, oligonucleótido, lípido, colesterol, esteroide, carbohidrato y similares). En un aspecto, se desvelan en el presente documento complementos nutricionales que comprenden cualquiera de los compuestos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, un complemento nutricional puede comprender cualquiera de los lípidos

desvelados en el presente documento. Los restos de ácidos grasos de estos lípidos pueden ser cualquier ácido graso como se desvela en el presente documento (por ejemplo, restos de ácidos grasos saturados o insaturados).

El complemento nutricional puede comprender cualquier cantidad de los compuestos desvelados en el presente documento, pero normalmente contendrán una cantidad determinada para aportar a un sujeto una dosis deseada de un derivado de bencenodiol (por ejemplo, CoQ<sub>10</sub>) y/o ácidos grasos. La cantidad exacta de compuesto requerida en el complemento nutricional variará entre sujetos, dependiendo de la especie, edad, peso y condición general del sujeto, la gravedad de la deficiencia dietética que se trate, el modo particular de administración y similares. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada complemento nutricional. Sin embargo, puede determinarse una cantidad apropiada por un experto en la materia usando solamente experimentación rutinaria, dadas las enseñanzas del presente documento. En un ejemplo específico, un complemento nutricional puede comprender de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 1 a aproximadamente 7,5 % o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 % en peso del compuesto. En otro ejemplo, el complemento nutricional puede comprender de aproximadamente 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 15,5, 16,0, 16,5, 17,0, 17,5, 18,0, 18,5, 19,0, 19,5 o 20,0 % en peso del compuesto, en el que cualquiera de los valores indicados pueden formar un punto final superior o inferior cuando sea apropiado. En otro aspecto, cuando sea el complemento nutricional, el complemento puede estar compuesto de hasta 100 % del complemento.

El complemento nutricional también puede comprender otro nutriente (o nutrientes) tales como vitaminas, oligoelementos, minerales y similares. Además, el complemento nutricional puede comprender otros componentes tales como conservantes, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, espesantes, saporíferos, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión y/o aglutinantes.

Los complementos nutricionales se toman generalmente por vía oral y pueden estar en cualquier forma adecuada para administración oral. Por ejemplo, un complemento nutricional puede estar normalmente en una forma de comprimido, cápsula de gelatina, cápsula, líquido, sobrecito o jarabe.

## 7. Dispositivos de suministro

Puede incorporarse cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento en un dispositivo de suministro. Los ejemplos de dispositivos de suministro incluyen, pero sin limitación, microcápsulas, microesferas, nanoesferas o nanopartículas, liposomas, niosomas, nanoeritosomas, nanopartículas de sólido-líquido, geles, cápsulas de gelatina, comprimidos, lociones, cremas, pulverizaciones o emulsiones. Otros ejemplos de dispositivos de suministro que son adecuados para administración no oral incluyen Pulmosphere. Se describen posteriormente ejemplos de dispositivos de suministro particulares útiles en el presente documento.

Los compuestos desvelados pueden incorporarse en liposomas. Como se conoce en la técnica, los liposomas generalmente derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas se forman por cristales líquidos hidratados mono o multilamelares que se dispersan en un medio acuoso. Puede usarse cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las composiciones desveladas en forma de liposoma pueden contener, además de un compuesto desvelado en el presente documento, estabilizadores, conservantes, excipientes y similares.

Son ejemplos de lípidos adecuados los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. Se conocen en la técnica métodos para formar liposomas. Véase, por ejemplo, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, p. 33 y siguientes, 1976.

En otros ejemplos, los liposomas pueden ser liposomas catiónicos (por ejemplo, DOTMA, DOPE, colesterol DC) o liposomas aniónicos. Los liposomas pueden comprender además proteínas para facilitar la dirección a una célula particular, si se desea. La administración de una composición que comprende un compuesto y un liposoma catiónico puede administrarse a la sangre aferente a un órgano diana o inhalarse en el tracto respiratorio a células diana del tracto respiratorio. Con respecto a los liposomas, véase, por ejemplo, Brigham, *et al.*, *Am J Resp Cell Mol Biol.* 1:95-100, 1989; Felgner, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:74113-7, 1987; y Patente de Estados Unidos N° 4.897.355. Como un ejemplo, el suministro puede ser mediante un liposoma usando preparaciones liposómicas disponibles en el mercado tales como LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), así como otros liposomas desarrollados de acuerdo con procedimientos convencionales en la técnica. También pueden usarse liposomas en los que la difusión del compuesto o suministro del compuesto del liposoma se diseña para una velocidad o dosificación específica.

Como se describe en el presente documento, los niosomas son dispositivos de suministro que pueden usarse para suministrar las composiciones desveladas en el presente documento. Los niosomas son vesículas multilamelares o unilamelares que implican tensioactivos no iónicos. Una solución acuosa de soluto está incluida en una bicapa resultante de la organización de macromoléculas tensioactivas. De forma similar a los liposomas, se usan niosomas

en el suministro dirigido de, por ejemplo, fármacos antineoplásicos, incluyendo metotrexato, doxorubicina e inmunoadyuvantes. Se entiende generalmente que son diferentes de transferosomas, vesículas preparadas a partir de carbohidrato anfífilico y polímeros que contienen grupo amino, por ejemplo, quitosano.

5 Como se describen en el presente documento, los nanoeritrosomas son dispositivos de suministro que pueden usarse para suministrar las composiciones desveladas en el presente documento. Los nanoeritrosomas son nanovesículas hechas de glóbulos rojos mediante diálisis a través de filtros de tamaño de poro definido. En estas vesículas puede cargarse una serie diversa de moléculas biológicamente activas, incluyendo proteínas y las composiciones desveladas en el presente documento. Generalmente actúan como vehículos ideales para agentes antineoplásicos como bleomicina, actinomicina D, pero pueden usarse para esteroides, otros lípidos, etc.

10 Los glóbulos rojos artificiales, como se describen en el presente documento, son dispositivos de suministro adicionales que pueden usarse para suministrar las composiciones desveladas en el presente documento. Pueden generarse glóbulos rojos artificiales mediante polimerización interfacial y métodos de emulsión complejos. Generalmente, la pared "celular" está compuesta de polímero de polifitaloil L-lisina/poliestireno y el núcleo está hecho de una solución de hemoglobina de hemolisado de oveja. Las microesferas cargadas con hemoglobina normalmente tienen tamaños de partícula de aproximadamente 1 a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . Su tamaño, flexibilidad y capacidad de portar oxígeno es similar a los glóbulos rojos.

15 Las nanopartículas de lípido-sólido, como se describen en el presente documento, son otros dispositivos de suministro que pueden usarse para suministrar las composiciones desveladas en el presente documento. Las nanopartículas de lípido-sólido son nanopartículas que están dispersas en una solución tensioactiva acuosa. Están comprendidas de un núcleo hidrófobo sólido que tiene una monocapa de un recubrimiento de fosfolípidos y se preparan habitualmente por técnicas de homogeneización de alta presión. Los complejos inmunomoduladores (ISCOMS) son ejemplos de nanopartículas de lípido-sólido. Son ensamblajes supramoleculares de 40 nm de tipo jaula que comprenden fosfolípidos, colesterol y antígenos hidrófobos y se usan principalmente como inmunoadyuvantes. Por ejemplo, se usan ISCOM para prolongar los niveles en plasma sanguíneo de ciclosporina inyectada por vía subcutánea.

20 Las microesferas y microcápsulas, como se describen en el presente documento, son otros dispositivos de suministro más que pueden usarse para suministrar las composiciones desveladas en el presente documento. A diferencia de los sistemas de suministro liposómicos, las microesferas y microcápsulas normalmente no tienen un núcleo acuoso sino una matriz polimérica sólida o membrana. Estos dispositivos de suministro se obtienen por precipitación controlada de polímeros, reticulación química de polímeros solubles y polimerización interfacial de dos monómeros o técnicas de homogeneización de alta presión. El compuesto encapsulado se libera gradualmente del depósito por erosión o difusión de las partículas. Se han desarrollado formulaciones exitosas de péptidos de acción corta, tales como agonistas de LHRH como leuprorelina y triptorelina. En la actualidad se usan microesferas de poli (lactida co-glicolida) (PLGA) como formas de dosificación mensuales y trimestrales en el tratamiento de cáncer de próstata avanzado, endometriosis y otras afecciones sensibles a hormonas. Se incorporó Leuprolide, un superagonista de LHRH, en diversas matrices de PLGA usando un método de evaporación/extracción de disolvente. Como se ha observado, todos estos dispositivos de suministro pueden usarse en los métodos desvelados en el presente documento.

25 Las Pulmosphere son otros ejemplos más de dispositivos de suministro que pueden usarse en el presente documento. Las Pulmosphere son partículas porosas huecas con una baja densidad (menos de aproximadamente  $0,1 \text{ g ml}^{-1}$ ). Las Pulmosphere normalmente tienen excelente capacidad de redispersión y habitualmente se preparan por tecnología de condensación de fluido supercrítico. El secado por pulverización conjunto con ciertas matrices, tales como carbohidratos, albúmina de suero humano, etc., puede mejorar la estabilidad de proteínas y péptidos (por ejemplo, insulina) y otras biomoléculas para suministro pulmonar. Este tipo de suministro también puede conseguirse con micro-emulsiones y emulsiones lipídicas, que son emulsiones ultrafinas, delgadas, transparentes, de aceite en agua (O/W) formadas de forma espontánea sin aplicación significativa de energía mecánica. En esta técnica, puede prepararse una emulsión a una temperatura, que debe ser mayor que la temperatura de inversión de fase del sistema. A temperatura elevada la emulsión es de tipo agua en aceite (w/o) y a medida que se enfría a la temperatura de inversión de fase, esta emulsión se invierte para convertirse en o/w. Debido a su fase interna muy pequeña, son extremadamente estables y se usan para liberación prolongada de esteroides y vacunas. Las emulsiones lipídicas comprenden un núcleo lipídico neutro (es decir, triglicéridos) estabilizado por una monocapa de lípido anfífilico (es decir, fosfolípido) usando tensioactivos como triglicéridos de lecitina de huevo y migliol. Son adecuados para dirección pasiva y activa.

30 Hay otros sistemas de suministro orales que se están investigando que se basan en la modulación de la presión osmótica, modulación de pH, modulación de hinchamiento, densidad alterada y sistemas de flotación, mucoadhesión, etc. Estas formulaciones y formulaciones retardadas en el tiempo para suministrar fármacos de acuerdo con el ritmo circadiano de la enfermedad que se usan o se investigan actualmente pueden aplicarse para suministro de las composiciones desveladas en el presente documento.

35 En un aspecto particular desvelado en el presente documento, los compuestos desvelados, incluyendo complemento

nutricional y formulaciones farmacéuticas del mismo, pueden incorporarse en microcápsulas como se describe en el presente documento.

En un aspecto desvelado en el presente documento, los compuestos desvelados pueden incorporarse en microcápsulas. En un aspecto, la microcápsula comprende una aglomeración de microcápsulas primarias y los compuestos de cromo descritos en el presente documento, teniendo cada microcápsula primaria individual una cubierta primaria, en la que el compuesto de cromo está encapsulado por la cubierta primaria, en la que la aglomeración está encapsulada por una cubierta exterior. Estas microcápsulas se denominan en el presente documento "microcápsulas multinúcleo".

En otro aspecto, se describen en el presente documento microcápsulas que comprenden un compuesto de cromo, una cubierta primaria y una cubierta secundaria, en las que la cubierta primaria encapsula el compuesto de cromo, y la cubierta secundaria encapsula la sustancia de carga y cubierta primaria. Estas microcápsulas se denominan en el presente documento "microcápsulas de núcleo individual".

Opcionalmente, pueden encapsularse otras sustancias de carga con el compuesto de cromo. La sustancia de carga puede ser cualquier sustancia que no sea completamente soluble en la mezcla acuosa. En un aspecto, la sustancia de carga es un sólido, un líquido hidrófobo o una mezcla de un sólido y un líquido hidrófobo. En otro aspecto, la sustancia de carga comprende una grasa, un aceite, un lípido, un fármaco (por ejemplo, molécula pequeña), una sustancia biológicamente activa, un complemento nutricional (por ejemplo, vitaminas), un compuesto saporífero o una mezcla de los mismos. Los ejemplos de aceites incluyen, pero sin limitación, aceites animales (por ejemplo, aceite de pescado, aceite de mamífero marino, etc.), aceites vegetales (por ejemplo, canola o colza), aceites minerales, derivados de los mismos o mezclas de los mismos. La sustancia de carga puede ser una sustancia oleosa purificada o parcialmente purificada tal como un ácido graso, un triglicérido o un éster de los mismos, o una mezcla de los mismos. En otro aspecto, la sustancia de carga puede ser un carotenoide (por ejemplo, licopeno), un agente de saciedad, un compuesto saporífero, un fármaco (por ejemplo, un fármaco insoluble en agua), partículas, un producto químico agrícola (por ejemplo, herbicidas, insecticidas, fertilizantes) o un ingrediente de acuicultura (por ejemplo, pienso, pigmento).

En un aspecto, la sustancia de carga puede ser un ácido graso omega-3. Los ejemplos de ácidos grasos omega-3 incluyen, pero sin limitación, ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3n3), ácido octadecatetraenoico (18:4n3), ácido eicosapentaenoico (20:5n3) (EPA), ácido docosahexaenoico (22:6n3) (DHA), ácido docosapentaenoico (22:5n3) (DPA), ácido eicosatetraenoico (20:4n3), ácido uncosapentaenoico (21:5n3), ácido docosapentaenoico (22:5n3) y derivados de los mismos y mezclas de los mismos. Muchos tipos de derivados de ácidos grasos omega-3 se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de derivados adecuados incluyen, pero sin limitación, ésteres, tales como ésteres de fitosterol, alquil ésteres C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> ramificados o no ramificados, alquenil ésteres, C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub> ramificados o no ramificados o cicloalquil ésteres C<sub>3</sub>-C<sub>30</sub> ramificados o no ramificados tales como ésteres de fitosterol y alquil ésteres C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Pueden derivarse fuentes de aceites de organismos acuáticos (por ejemplo, anchoas, capelán, bacalao del Atlántico, arenque del Atlántico, caballa del Atlántico, lacha del Atlántico, salmónidos, sardinas, tiburón, atún, etc.) y plantas (por ejemplo, lino, verduras, etc.) y microorganismos (por ejemplo, hongos y algas).

En un aspecto, la sustancia de carga puede contener un antioxidante. Los ejemplos de antioxidantes incluyen, pero sin limitación, vitamina E, CoQ<sub>10</sub>, tocoferoles, derivados solubles en lípidos de antioxidantes más polares tales como ésteres de ácidos grasos de ascorbilo (por ejemplo, palmitato de ascorbilo), extractos vegetales (por ejemplo, aceites de romero, salvia y orégano), extractos de algas y antioxidantes sintéticos (por ejemplo, BHT, TBHQ, etoxiquina, alquil galatos, hidroquinonas, tocotrienoles).

Pueden usarse varios polímeros diferentes para producir las capas de cubierta de las microcápsulas de núcleo individual y multinúcleo. Los ejemplos de dichos polímeros incluyen, pero sin limitación, una proteína, un polifosfato, un polisacárido, o una mezcla de los mismos. En otro aspecto, el material de cubierta usado para preparar las microcápsulas de núcleo individual y multinúcleo comprende además gelatina de tipo A, gelatina de tipo B, polifosfato, goma arábiga, alginato, quitosano, carragenina, pectina, almidón, almidón modificado, alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina, ovoalbúmina, polisorbitón, maltodextrinas, ciclodextrinas, celulosa, metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, proteína de la leche, proteína del suero, proteína de la soja, proteína de colza, albúmina, quitina, polilactidas, poli-lactida-co-glicolidas, quitina derivatizada, quitosano, polilisina, diversos compuestos inorgánicos-orgánicos, o cualquier mezcla de los mismos. También se contempla que pueden usarse además derivados de estos polímeros. En otro aspecto, el polímero puede ser gelatina kosher, gelatina no kosher, gelatina halal o gelatina no halal.

En un aspecto, una o más de las capas de cubierta en las microcápsulas de núcleo individual y multinúcleo comprenden gelatina que tiene un número de Bloom menor de 50. Esta gelatina se denomina en el presente documento "gelatina de Bloom bajo". El número de Bloom describe la fuerza del gel formado a 10 °C con una solución 6,67 % gelificada durante 18 horas. En un aspecto, la gelatina de Bloom bajo tiene un número de Bloom menor de 40, menor de 30, menor de 20 o menor de 10. En otro aspecto, la gelatina tiene un número de Bloom de 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0, en el que dos valores cualesquiera pueden usarse para producir un intervalo. En otro aspecto, la gelatina de Bloom bajo está tanto en la cubierta primaria como en la

cubierta exterior de la microcápsula multinúcleo. En un aspecto, la gelatina de Bloom bajo es gelatina de tipo A. En otro aspecto, la gelatina de Bloom bajo es gelatina de tipo A producida por Kenney & Ross Ltd., RR N° 3 Shelburne, NS Canadá. En otro aspecto, la gelatina que tiene un número de Bloom de cero está tanto en la cubierta primaria como en la cubierta exterior de la microcápsula multinúcleo.

5 En un aspecto, el material usado para realizar las cubiertas de las microcápsulas de núcleo individual o multinúcleo es un sistema de dos componentes compuesto de una mezcla de dos tipos diferentes de polímeros. En un aspecto, el material es un coacervado complejo entre los componentes poliméricos. La coacervación compleja está provocada por la interacción entre dos polímeros cargados de forma opuesta. En un aspecto, el material de cubierta  
10 usado para producir las microcápsulas de núcleo individual y multinúcleo está compuesto de (1) gelatina de Bloom bajo y (2) gelatina de tipo B, polifosfato, goma arábiga, alginato, quitosano, carragenina, pectina, carboximetilcelulosa, proteína del suero, proteína de la soja, proteína albúmina de la colza, o una mezcla de los mismos. La relación molar de los diferentes polímeros puede variar. Por ejemplo, la relación molar de gelatina de Bloom bajo y el otro componente polimérico es de 1:5 a 15:1. Por ejemplo, cuando se usa gelatina de Bloom bajo y polifosfato, la relación molar de gelatina de Bloom bajo y polifosfato es de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 12:1; cuando se usa gelatina de Bloom bajo y gelatina de tipo B, la relación molar es de 2:1 a 1:2; y cuando se usan gelatina de Bloom bajo y alginato, la relación molar es 3:1 a 8:1.

20 Pueden incluirse adyuvantes de procesamiento en el material de cubierta (por ejemplo, cubiertas primarias o exteriores). Pueden usarse adyuvantes de procesamiento por diversas razones. Por ejemplo, pueden usarse para promover la aglomeración de las microcápsulas primarias, estabilizar el sistema de emulsión, mejorar las propiedades de las cubiertas exteriores, controlar el tamaño de la microcápsula y/o actuar como un antioxidante. En un aspecto, el adyuvante de procesamiento puede ser un emulsionante, un ácido graso, un lípido, una cera, una célula microbiana (por ejemplo, líneas celulares de levadura), una arcilla, o un compuesto inorgánico (por ejemplo, carbonato cálcico). Sin desear quedar ligado a la teoría, estos adyuvantes de procesamiento pueden mejorar las  
25 propiedades de barrera de las microcápsulas. En un aspecto, uno o más antioxidantes pueden añadirse al material de cubierta. Las propiedades antioxidantes son útiles tanto durante el proceso (por ejemplo durante la coacervación y/o secado por pulverización) como en las microcápsulas después de formarse (es decir para extender el periodo de validez, etc.). Preferentemente, puede usarse un número pequeño de adyuvantes de procesamiento que realizan un gran número de funciones. En un aspecto, el antioxidante puede ser un compuesto fenólico, un extracto vegetal o un aminoácido que contiene azufre. En un aspecto, puede usarse ácido ascórbico (o una sal del mismo tal como ascorbato sódico o potásico) para promover la aglomeración de las microcápsulas primarias, para controlar el tamaño de la microcápsula y para actuar como un antioxidante. El antioxidante puede usarse en una cantidad de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 12.000 ppm o de aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente  
30 5.000 ppm. También pueden usarse otros adyuvantes de procesamiento tales como, por ejemplo, quelantes metálicos. Por ejemplo, puede usarse ácido diamin tetraacético para unir iones metálicos, que pueden reducir la oxidación catalítica de la sustancia de carga.

40 En un aspecto, las microcápsulas primarias (cubiertas primarias) tienen un diámetro medio de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , de 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , de 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , de 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 8  $\mu\text{m}$ , de 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 6  $\mu\text{m}$ , de 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  o de 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ , o 1  $\mu\text{m}$ . En otro aspecto, las microcápsulas multinúcleo pueden tener un diámetro medio de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2000  $\mu\text{m}$ , de 20  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 80  $\mu\text{m}$ . En otro aspecto, las  
45 microcápsulas de núcleo individual tienen un diámetro externo de 1  $\mu\text{m}$  a 2000  $\mu\text{m}$ .

Las microcápsulas descritas en el presente documento generalmente tienen una combinación de carga útil alta y fuerza estructural. Por ejemplo, las cargas útiles de sustancia de carga pueden ser de 20 % a 90 %, 50 % a 70 % en peso o 60 % en peso de las microcápsulas de núcleo individual o multinúcleo.

50 En un aspecto, los métodos desvelados en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0193102, que se incorpora por referencia en su totalidad, puede usarse para encapsular los compuestos de cromo descritos en el presente documento. También se contempla que puede situarse una o más capas de cubierta adicionales en la cubierta externa de las microcápsulas de núcleo individual o multinúcleo. En un aspecto, las técnicas descritas en la Publicación Internacional N° WO 2004/041251 A1 pueden usarse para añadir capas de cubierta adicionales a las microcápsulas de núcleo individual y multinúcleo.

#### a) Composiciones farmacéuticas y nutracéuticas

60 Estos lípidos y antioxidantes se dirigen para su uso en piensos animales, productos farmacéuticos, productos nutracéuticos (especialmente fórmula infantil), así como en la industria. También deben incluirse formas nutracéuticas de suministro tales como cápsulas de gelatina y similares, microencapsulaciones comunes, etc.

65 Como se ha descrito anteriormente, las composiciones también pueden administrarse *in vivo* en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente

o de otro modo indeseable, es decir, el material puede administrarse a un sujeto, junto con el ácido nucleico o vector, sin provocar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de una manera deletérea con ninguno de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que se contiene. El vehículo se seleccionaría naturalmente para minimizar cualquier degradación del principio activo y minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como se conoce bien por un experto en la materia.

Las composiciones pueden administrarse por vía oral, por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa), por inyección intramuscular, por inyección intraperitoneal, por vía transdérmica, por vía extracorpórea, por vía tópica o similares, incluyendo administración intranasal tópica o administración por inhalante. Como se usa en el presente documento "administración intranasal tópica" significa suministro de las composiciones a la nariz y los orificios nasales a través de una o ambas de las narinas y puede comprender suministro por un mecanismo de pulverización o un mecanismo de gotas o mediante aerosolización del ácido nucleico o vector. La administración de las composiciones por inhalante puede ser a través de la nariz o la boca mediante suministro por un mecanismo de pulverización o gotas. El suministro también puede ser directamente a cualquier área del sistema respiratorio (por ejemplo, pulmones) mediante intubación. La cantidad exacta de las composiciones requerida variará entre sujetos, dependiendo de la especie, edad, peso y condición general del sujeto, la gravedad del trastorno alérgico que se trate, el ácido nucleico o vector particular usado, su modo de administración y similares. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada composición. Sin embargo, puede determinarse una cantidad apropiada por un experto habitual en la materia usando solamente experimentación rutinaria dadas las enseñanzas del presente documento.

La administración parenteral de la composición, si se usa, se caracteriza generalmente por inyección. Pueden prepararse inyectables en formas convencionales, bien como soluciones o bien como suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Un enfoque más recientemente revisado para la administración parenteral implica el uso de una liberación lenta o sistema de liberación prolongada de modo que se mantenga una dosificación constante. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 3.610.795.

Los materiales pueden estar en solución, suspensión (por ejemplo, incorporados en micropartículas, liposomas o células). Estos pueden dirigirse a un tipo celular particular mediante anticuerpos, receptores o ligandos de receptores. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas a tejido tumoral (Senter, *et al*, *Bioconjugate Chem.*, 2:447-451,1991; Bagshawe, K.D., *Br. J. Cancer*, 60:275-281,1989; Bagshawe, *et al.*, *Br. J. Cancer*, 58: 700-703,1988; Senter, *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 4:3-9,1993; Battelli, *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 35: 425 1992; Pietersz y McKenzie, *Immunolog. Reviews*, 129:57-80,1992; y Roffler, *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 42: 2062-2065,1991). Vehículos tales como "sigilosos" y otros liposomas conjugados con anticuerpo (incluyendo dirección farmacológica mediada por lípidos a carcinoma colónico), dirección mediada por receptor de ADN a través de ligandos específicos de células, dirección tumoral dirigida por linfocitos y dirección retroviral terapéutica altamente específica de células de glioma murino *in vivo*. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas a tejido tumoral (Hughes *et al.*, *Cancer Research*, 49:6214-6220,1989); y Litzinger y Huang, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104:179-187,1992). En general, están implicados receptores en las rutas de endocitosis, bien constitutivas o bien inducidas por ligando. Estos receptores se agrupan en invaginaciones recubiertas de clatrina, entran en la célula mediante vesículas recubiertas con clatrina, pasan a través de un endosoma acidificado en el que se seleccionan los receptores, y después se recicla a la superficie celular, se almacena intracelularmente o se degrada en lisosomas. Las rutas de internalización cumplen diversas funciones, tales como captación de nutrientes, retirada de proteínas activadas, eliminación de macromoléculas, entrada oportunista de virus y toxinas, disociación y degradación del ligando y regulación al nivel del receptor. Muchos receptores siguen más de una ruta intracelular, dependiendo del tipo celular, concentración del receptor, tipo de ligando, valencia del ligando y concentración del ligando. Se han revisado mecanismos moleculares y celulares de endocitosis mediada por receptor (Brown y Greene, *DNA and Cell Biology* 10:399-409,1991).

#### **(1) Vehículos farmacéuticamente aceptables**

Las composiciones, incluyendo anticuerpos, pueden usarse de forma terapéutica en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se describen vehículos adecuados y sus formulaciones en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (19ª ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995. Normalmente, se usa en la formulación una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para hacer a la formulación isotónica. Los ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen, pero sin limitación, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Los vehículos adicionales incluyen preparaciones de liberación prolongada tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Resultará evidente para los expertos en la materia que ciertos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración y la concentración de la composición que se administra.

Se conocen por los expertos en la materia vehículos farmacéuticos. Estos serían más normalmente vehículos convencionales para administración de fármacos a seres humanos, incluyendo soluciones tales como agua estéril, solución salina y soluciones tamponadas a pH fisiológico. Las composiciones pueden administrarse por vía intramuscular o por vía subcutánea. Otros compuestos se administrarán de acuerdo con procedimientos convencionales usados por los expertos en la materia.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos y similares además de la molécula elegida. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos y similares.

La composición farmacéutica puede administrarse de varias maneras dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico, y del área para tratar. La administración puede ser por vía tópica (incluyendo por vía oftálmica, por vía vaginal, por vía rectal, por vía intranasal), por vía oral, por inhalación o por vía parenteral, por ejemplo por goteo intravenoso, inyección subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Los anticuerpos desvelados pueden administrarse por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intracavitaria o por vía transdérmica.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como etil oleato. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen refuerzos de fluidos y nutrientes, refuerzos de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

Las formulaciones para administración tópica pueden incluir pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares.

Las composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas, sobrecitos o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, saporíferos, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes.

Algunas de las composiciones pueden potencialmente administrarse como una sal de adición de ácidos o bases farmacéuticamente aceptable, formada por reacción con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico y ácido fumárico o mediante reacción con una base inorgánica tal como hidróxido sódico, hidróxido de amonio, hidróxido potásico, y bases orgánicas tales como mono, di, trietil y aril aminas y etanolaminas sustituidas.

## (2) Usos terapéuticos

Pueden determinarse dosificaciones y programas eficaces para administrar las composiciones de forma empírica y la realización de dichas determinaciones está dentro de la experiencia de la técnica. Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son los suficientemente grandes para producir el efecto deseado en las que se afecta a los síntomas del trastorno. La dosificación no debería ser tan grande que provoque efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas y similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, condición, sexo y alcance de la enfermedad en el paciente, vía de administración, o si se incluyen otros fármacos en el régimen, y puede determinarse por un experto en la materia. La dosificación puede ajustarse por el médico individual en el caso de cualquier contraindicación. La dosificación puede variar, y puede administrarse en una o más administraciones de dosis diariamente, durante uno o varios días. Pueden encontrarse directrices en la bibliografía para dosificaciones apropiadas para clases dadas de productos farmacéuticos. Por ejemplo, pueden encontrarse directrices para seleccionar dosis apropiadas para anticuerpos en la bibliografía sobre usos terapéuticos de anticuerpos, por ejemplo, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone *et al.*, eds., Noyes Publications, Park Ridge, N. J., (1985), c. 22 y pp 303-357; Smith *et al.*, Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber *et al.*, eds., Raven Press, Nueva York (1977) pp 365-389. Una dosificación diaria típica del anticuerpo usado solo podría variar de aproximadamente 1 µg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

## b) Suministro dirigido

Los liposomas y las microcápsulas desvelados pueden dirigirse a un tipo celular particular, tales como células de islotes, mediante anticuerpos, receptores o ligandos de receptores. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigirse al tejido específico (Senter, *et al.*, *Bioconjugate Chem* 2:447-51, 1991; Bagshawe, *Br J Cancer* 60:275-81, 1989; Bagshawe, *et al.*, *Br J Cancer* 58:700-3, 1988; Senter, *et al.*, *Bioconjugate Chem* 4:3-9, 1993; Battelli, *et al.*, *Cancer Immunol Immunother* 35:421-5, 1992; Pietersz y McKenzie, *Immunolog Reviews* 129:57-80, 1992; y Roffler, *et al.*, *Biochem Pharmacol* 42:2062-5, 1991). Estas técnicas pueden usarse para diversos tipos celulares específicos distintos.

## 8. Productos alimentarios

También se desvelan en el presente documento productos alimentarios que comprenden cualquiera de las microcápsulas y emulsiones desveladas en el presente documento. Por "producto alimentario" se entiende cualquier artículo que pueda consumirse (por ejemplo, comerse, beberse o ingerirse) por un sujeto. En un aspecto, las microcápsulas pueden usarse como complementos nutricionales para un producto alimentario. Por ejemplo, las microcápsulas y emulsiones pueden cargarse con vitaminas, ácidos grasos omega-3 y otros compuestos que proporcionan beneficios para la salud. En un aspecto, el producto alimentario es un producto horneado, una pasta, un producto de carne, un producto lácteo congelado, un producto lácteo, un producto de queso, un producto de huevos, un condimento, una mezcla de sopa, un tentempié, un producto de nueces; un producto de proteína vegetal, un caramelo duro, un caramelo blando, un producto de ave de corral, un zumo de frutas procesado, un azúcar granulado (por ejemplo, blanco o morena), una salsa, una salsa de carne, un jarabe, una barra nutricional, una bebida, un polvo de bebida seco, una mermelada o gelatina, un producto de pescado, o un alimento de mascota. En otro aspecto, el producto alimentario es pan, tortillas, cereal, salchicha, pollo, helado, yogurt, leche, aliño para ensaladas, salvado de arroz, zumo de frutas, un polvo de bebida seco, rollos, galletas, galletas saladas, tentempiés, tartas de frutas o pasteles.

## 9. Microplacas y micromatrices

Se desvelan microplacas en las que al menos una dirección es las secuencias o parte de las secuencias expuestas en cualquiera de las secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento. También se desvelan microplacas en las que al menos una dirección es las secuencias o parte de las secuencias expuestas en cualquiera de las secuencias peptídicas desveladas en el presente documento.

También se desvelan microplacas en las que al menos una dirección es una variante de las secuencias o parte de las secuencias expuestas en cualquiera de las secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento. También se desvelan microplacas en las que al menos una dirección es una variante de las secuencias o parte de las secuencias expuestas en cualquiera de las secuencias peptídicas desveladas en el presente documento.

## 10. Medios leíbles por ordenador

Se entiende que los ácidos nucleicos y proteínas desvelados pueden representarse como una secuencia que consiste en los nucleótidos de aminoácidos. Hay diversos modos de presentar estas secuencias, por ejemplo, el nucleótido guanosina puede representarse por G o g. De forma similar el aminoácido valina puede representarse por Val o V. Los expertos en la materia entienden cómo presentar y expresar cualquier secuencia de ácido nucleico o proteína en cualquiera de la diversidad de maneras que existen, cada una de las cuales se considera desvelada en el presente documento. Se contempla específicamente en el presente documento la presentación de estas secuencias en medios leíbles por ordenador, tales como disquetes, cintas, microplacas, discos duros, discos compactos y discos de vídeo disponibles en el mercado, u otros medios leíbles por ordenador. También se desvelan las representaciones en código binario de las secuencias desveladas. Los expertos en la materia entienden qué medios leíbles por ordenador. Por lo tanto, los medios leíbles por ordenador en los que se registran, almacenan o guardan las secuencias de ácidos nucleicos o proteínas.

Se desvelan medios leíbles por ordenador que comprenden las secuencias e información con respecto a las secuencias expuestas en el presente documento.

## 11. Kits

Se desvela en el presente documento kits que se aplican a reactivos que pueden usarse en la práctica de los métodos desvelados en el presente documento o en el uso o mantenimiento de las composiciones desveladas en el presente documento. Los kits pueden incluir cualquier reactivo o combinación de reactivos analizado en el presente documento o que se entendería que se requiere o es beneficioso en la práctica de los métodos desvelados. Por ejemplo, los kits podrían incluir uno o más de los microorganismos eucariotas desvelados en el presente documento junto con, por ejemplo, medios para su mantenimiento. Los kits también podrían incluir, por ejemplo, los lípidos o antioxidantes, junto con medios para usarlos o administrarlos.

## 12. Composiciones con funciones similares

Se entiende que las composiciones desveladas en el presente documento tienen ciertas funciones, tales como producir ciertas relaciones de lípidos. Se desvelan en el presente documento ciertos requisitos estructurales, genéticos y funcionales para realizar las funciones desveladas, y se entiende que hay diversas estructuras, fondos genéticos y fondos funcionales que pueden realizar la misma función que está relacionada con las estructuras desveladas, y que estas estructuras en última instancia conseguirán el mismo resultado, por ejemplo producción de una cierta relación de lípidos.

#### D. Métodos para realizar las composiciones

Las composiciones desveladas en el presente documento y las composiciones necesarias para realizar los métodos desvelados pueden realizarse usando cualquier método conocido por los expertos en la materia para ese reactivo o compuesto particular a no ser que se indique específicamente de otro modo.

##### 1. Síntesis de ácidos nucleicos

Por ejemplo, los ácidos nucleicos, tales como los oligonucleótidos para usar como cebadores pueden realizarse usando métodos de síntesis química convencionales o pueden producirse usando métodos enzimáticos o cualquier otro método conocido. Dichos métodos pueden variar de digestión enzimática convencional seguida de aislamiento de fragmentos de nucleótidos (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) capítulos 5, 6) a métodos puramente sintéticos, por ejemplo, por el método de cianoetil fosforamídita usando un sintetizador de ADN Milligen o Beckman System 1 plus (por ejemplo, sintetizador automático Modelo 8700 o Milligen-Biosearch, Burlington, MA o Modelo 380B ABI). También se describen métodos de síntesis útiles para realizar oligonucleótidos en Ikuta *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 53:323-356, 1984, (métodos de fosfotriéster y fosfito-triéster) y Narang *et al.*, Methods Enzymol., 65:610-620, 1980, (método de fosfotriéster). Puede realizarse moléculas de ácido nucleico de proteínas usando métodos conocidos tales como los descritos en Nielsen *et al.*, Bioconjug.Chem. 5:3-7, 1994.

##### 2. Síntesis peptídica

Un método para producir las proteínas desveladas es unir dos o más péptidos o polipéptidos entre sí por técnicas de química proteica. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos pueden sintetizarse químicamente usando equipamiento de laboratorio disponible en la actualidad usando química de Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo) o Boc (terc-butiloxicarbonilo) (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Un experto en la materia puede apreciar fácilmente que un péptido o polipéptido correspondiente a las proteínas desveladas, por ejemplo, puede sintetizarse por reacciones químicas convencionales. Por ejemplo, un péptido o polipéptido puede sintetizarse y no escindirse de su resina de síntesis mientras que el otro fragmento de un péptido o proteína puede sintetizarse y escindirse posteriormente de la resina, exponiendo de este modo un grupo terminal que está bloqueado funcionalmente en el otro fragmento. Por reacciones de condensación de péptidos, estos dos fragmentos pueden unirse covalentemente mediante un enlace peptídico en sus extremos carboxilo y amino terminal, respectivamente, para formar un anticuerpo, o fragmento del mismo. (Grant GA (1992) Synthetic Peptides: A User Guide. W.H. Freeman and Co., N.Y. (1992); Bodansky M y Trost B., Ed. (1993) Principles of Peptide Synthesis. Springer-Verlag Inc., NY). Como alternativa, el péptido o polipéptido se sintetiza independientemente *in vivo* como se describe en el presente documento. Una vez aislados, estos péptidos o polipéptidos independientes pueden unirse para formar un péptido o fragmento del mismo mediante reacciones de condensación de péptidos similares.

Por ejemplo, el ligamiento enzimático de segmentos peptídicos clonados o sintéticos permite que se unan fragmentos peptídicos relativamente cortos para producir fragmentos peptídicos mayores, polipéptidos o dominios proteicos completos (Abrahmsen L *et al.*, Biochemistry, 30:4151, 1991). Como alternativa, el ligamiento químico nativo de péptidos sintéticos puede utilizarse para construir de forma sintética péptidos o polipéptidos grandes a partir de fragmentos peptídicos más cortos. Este método consiste en una reacción química de dos etapas (Dawson *et al.* Science, 266:776-779, 1994). La primera etapa es la reacción quimioselectiva de un péptido-tioéster sintético no protegido con otro segmento peptídico no protegido que contiene un resto Cys amino-terminal para proporcionar un intermedio unido por tioéster como el producto covalente inicial. Sin un cambio en las condiciones de reacción, este intermedio experimenta reacción intramolecular, rápida espontánea para formar un enlace peptídico nativo en el sitio de ligamiento (Baggiolini M *et al.* FEBS Lett. 307:97-101, 1992; Clark-Lewis I *et al.*, J. Biol. Chem., 269:16075, 1994; Clark-Lewis I *et al.*, Biochemistry, 30:3128, 1991; Rajarathnam K *et al.*, Biochemistry 33:6623-30, 1994).

Como alternativa, los segmentos peptídicos no protegidos se unen químicamente cuando el enlace formado entre los segmentos peptídicos como resultado de ligamiento químico sea un enlace no natural (no peptídico) (Schnolzer, *et al.* Science, 256:221, 1992). Esta técnica se ha usado para sintetizar análogos de dominios proteicos así como grandes cantidades de proteínas relativamente puras con actividad biológica completa (de Lisle Milton RC *et al.*, Techniques in Protein Chemistry IV. Academic Press, Nueva York, pp 257-267, 1992).

##### 3. Procedimientos para realizar las composiciones

Se desvelan procedimientos para realizar las composiciones así como realizar los intermedios que conducen a las

composiciones. Por ejemplo, se desvelan microorganismos eucariotas que pueden producir lípidos y antioxidantes deseados así como métodos para aislar y purificar los lípidos y antioxidantes deseados. Existe diversos métodos que pueden usarse para realizar estas composiciones, tales como métodos químicos de síntesis y métodos de biología molecular convencional. Se entiende que los métodos para realizar estas y las otras composiciones desveladas se desvelan específicamente.

Se desvelan células producidas por el procedimiento de transformar la célula con cualquier ácido nucleico. Se desvelan células producidas por el procedimiento de transformar la célula con cualquiera de los ácidos nucleicos desvelados de origen no natural.

Se desvela cualquiera de los lípidos producidos por los microorganismos eucariotas desvelados. Se desvela cualquier péptido producido por el procedimiento de expresar el péptido en los organismos desvelados.

#### 4. Métodos para usar las composiciones como herramientas de investigación

Las composiciones desveladas pueden usarse de diversas maneras como herramientas de investigación y de la producción de, por ejemplo, lípidos y antioxidantes.

Las composiciones desveladas pueden usarse como se analiza en el presente documento como reactivos en micromatrices o como reactivos para cribar o analizar micromatrices existentes. Las composiciones desveladas pueden usarse en cualquier método conocido para aislar o identificar polimorfismos de un único nucleótido. Las composiciones también pueden usarse en cualquier método para determinar el análisis alélico de, por ejemplo, las cepas de los organismos desvelados en el presente documento, particularmente análisis alélico que se refiere a la producción de lípidos y antioxidantes. Las composiciones pueden usarse también en cualquier método conocido para cribar ensayos, relacionados con micropelículas/micromatrices. Las composiciones también pueden usarse de cualquier manera conocida para usar las realizaciones leibles por ordenador de las composiciones desveladas, por ejemplo, para estudiar la relación o para realizar análisis de modelación molecular relacionado con las composiciones desveladas.

#### 5. Métodos de modificación génica y alteración génica

Las composiciones y métodos desvelados pueden usarse para alteración y modificación génica dirigida en cualquier animal que pueda experimentar estos acontecimientos. La modificación génica y alteración génica se refieren a los métodos, técnicas y composiciones que rodean la retirada o alteración selectiva de un gen o tramo de cromosoma en un organismo, tal como los eucariotas desvelados en el presente documento, de un modo que propaga la modificación a través de la replicación del organismo. En general, por ejemplo, una célula se transforma con un vector que se diseña para recombinar de forma homóloga con una región de un cromosoma o ácido nucleico particular contenido dentro de la célula, como, por ejemplo, se describe en el presente documento. Este acontecimiento de recombinación homólogo puede producir un cromosoma que tiene ADN exógeno introducido, por ejemplo, en fase, con el ADN circundante. Este tipo de protocolo permite introducir mutaciones muy específicas, tales como mutaciones puntuales, en el genoma contenido dentro de la célula. Se desvelan en el presente documento métodos para realizar este tipo de recombinación homóloga.

#### V. Realizaciones específicas

Se desvela en el presente documento un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en la que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1. El microorganismo eucariota puede producir ácidos grasos insaturados que tienen un perfil mostrado en la Figura 2. El microorganismo eucariota puede ser del filo Labyrinthulomycota, la clase Labyrinthulomycetes, la subclase Thraustochytridae, el orden Thraustochytriales, la familia Thraustochytriaceae y/o el género *Thraustochytrium*. El microorganismo eucariota puede ser *Thraustochytrium* sp., *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium roseum*, o *Thraustochytrium striatum*. El microorganismo eucariota también puede ser de la familia Thraustochytriaceae y puede tener el número de referencia de ATCC 20888, 20889, 20890, 20891 o 20892.

También se desvela en el presente documento un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, en el que el microorganismo es del género *Schizochytrium*. El microorganismo eucariota puede ser *Schizochytrium* sp.

También se desvela en el presente documento un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, en el que el microorganismo eucariota comprende un ácido graso omega 3 u omega 6. El microorganismo eucariota también puede comprender DHA o DPA.

También se desvela en el presente documento un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1; en el que el microorganismo produce un lípido o fracción de ácidos grasos de al menos aproximadamente 4 % en peso a 6 % en

- 5 peso. El lípido puede comprender DHA. La composición lipídica también puede comprender de aproximadamente 25 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente 40 % en peso de fracción de ácidos grasos de DHA n-3, de aproximadamente 6 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente el 10 % en peso de fracción de ácidos grasos de DPA n-6 y de aproximadamente 0 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente 3 % en peso de fracción de ácidos grasos de EPA n-3.
- 10 También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1. La composición puede comprender además un medio y/o nutrientes.
- 15 También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, en la que la composición es una biomasa. El microorganismo eucariota de la composición puede ser del filo Labyrinthulomycota, la clase Labyrinthulomycetes, la subclase Thraustochytridae, el orden Thraustochytriales, la familia Thraustochytriaceae o el género *Thraustochytrium*. El microorganismo eucariota puede ser *Thraustochytrium* sp., *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium roseum*, o *Thraustochytrium striatum*. El microorganismo eucariota también puede ser de la familia Thraustochytriaceae y puede tener el número de referencia de ATCC 20888, 20889, 20890, 20891 o 20892.
- 20 También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, en el que el microorganismo es del género *Schizochytrium*. El microorganismo eucariota puede ser *Schizochytrium* sp.
- 25 También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, en el que el microorganismo eucariota produce ácidos grasos insaturados que tienen un perfil mostrado en la Figura 2. El ácido graso insaturado puede comprender un ácido graso omega 3 u omega 6. El ácido graso insaturado también puede comprender DHA o DPA.
- 30 También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, en el que el microorganismo eucariota puede producir un lípido o fracción de ácido graso de al menos aproximadamente 4 % en peso a 6 % en peso. El lípido puede comprender DHA. El lípido puede comprender también de aproximadamente 25 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente 40 % en peso de fracción de ácidos grasos de DHA n-3, de aproximadamente 6 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente 10 % en peso de fracción de ácidos grasos de DPA n-6, y de aproximadamente 0 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente 3 % en peso de fracción de ácidos grasos de EPA n-3.
- 35 También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 80 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1.
- 40 También se desvela una composición que comprende de aproximadamente 25 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente 40 % en peso de fracción de ácidos grasos de DHA n-3, de aproximadamente 6 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente 10 % en peso de fracción de ácidos grasos de DPA n-6, y de aproximadamente 0 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente 3 % en peso de fracción de ácidos grasos de EPA n-3.
- 45 También se desvela un método para preparar una composición lipídica, comprendiendo el método: cultivar el microorganismo eucariota descrito en el presente documento, en un medio heterotrófico, y aislar la composición lipídica. También se desvela una composición lipídica preparada de acuerdo con este método.
- 50 También se desvela un dispositivo de suministro que comprende cualquiera de las composiciones descritas anteriormente. Por ejemplo, se desvela un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1. El dispositivo de suministro puede comprender una microcápsula, una microesfera, una nanoesfera o nanopartícula, un liposoma, un niosoma, un nanoeritosoma, una nanopartícula de sólido-líquido, un leuprolide, un gel, una cápsula de gelatina, un comprimido, una loción, una crema, una pulverización, una emulsión o un polvo.
- 55 También se desvela una microcápsula, que comprende una aglomeración de microcápsulas primarias y una sustancia de carga, teniendo cada microcápsula primaria individual una cubierta primaria, en la que la sustancia de carga comprende cualquiera de las composiciones descritas anteriormente, y está encapsulada por la cubierta primaria, y en la que la aglomeración está encapsulada por una cubierta exterior. La cubierta primaria y/o cubierta exterior puede comprender un tensioactivo, gelatina, polifosfato, polisacárido o una mezcla de los mismos. La cubierta primaria y/o cubierta exterior también pueden comprender gelatina de tipo B, polifosfato, goma arábiga, alginato, quitosano, carragenina, pectina, almidón, almidón modificado, alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobúmina,
- 60
- 65

- 5 ovoalbúmina, polisorbitón, maltodextrina, ciclodextrina, celulosa, metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, proteína de la leche, proteína del suero, proteína de la soja, proteína de la colza, albúmina, gelatina kosher, gelatina no kosher, gelatina halal, gelatina no halal, o una mezcla de los mismos. La cubierta primaria y/o cubierta exterior puede comprender también un coacervado complejo, gelatina de tipo A, gelatina de pescado, una gelatina con un número de Bloom de aproximadamente 0 a aproximadamente 300, una gelatina con un número de Bloom de aproximadamente 0 a aproximadamente 50, una gelatina con un número de Bloom de aproximadamente 51 a aproximadamente 300, una gelatina con un número de Bloom de aproximadamente 0, aproximadamente 210, aproximadamente 220, o aproximadamente 240, un coacervado de gelatina y polifosfato.
- 10 La sustancia de carga de las microcápsulas desveladas puede comprender aceite de *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, o una mezcla de los mismos. La sustancia de carga puede ser de aproximadamente 20 % a aproximadamente 90 % o de 50 % a aproximadamente 70 % en peso de la microcápsula.
- 15 La cubierta exterior de las microcápsulas desveladas puede tener un diámetro medio de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2000  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 80  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  o de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ .
- 20 También se desvela un complemento nutricional que comprende cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro o microcápsulas descritas anteriormente. Los complementos nutricionales desvelados pueden estar en forma de un comprimido, cápsula de gelatina, cápsula, líquido o jarabe.
- 25 También se desvela un producto alimentario que comprende cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, o microcápsulas descritas anteriormente. El producto alimentario puede ser un producto horneado, una pasta, un producto de carne, un producto lácteo congelado, un producto lácteo, un producto de queso, un producto de huevo, un condimento, una mezcla de sopa, un tentempié, un producto de nueces, un producto de proteína vegetal, un caramelo duro, un caramelo blando, un producto de ave de corral, un zumo de frutas procesado, un azúcar granulado, una salsa, una salsa de carne, un jarabe, una barra nutricional, una bebida, un polvo de bebida seco, una mermelada o gelatina, una fórmula infantil o un alimento para bebés. El producto alimentario también puede ser un producto de pescado, un alimento para animales de compañía, un pienso para ganado o de acuicultura. El producto alimentario también puede ser pan, tortillas, cereal, salchicha, pollo, helado, yogur, leche, aliño para ensaladas, salvado de arroz, zumo de frutas, un polvo de bebida seca, rollos, galletas, galletas saldas, tartas de frutas o pasteles.
- 30 También se desvela un método para suministrar una composición a un sujeto, que comprende administrar al sujeto cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas o productos alimentarios descritos anteriormente. El sujeto puede ser un mamífero. El sujeto también puede ser un ser humano.
- 35 También se desvela un uso de cualquiera de las microcápsulas descritas anteriormente y para preparar un medicamento para suministrar una sustancia de carga a un sujeto.
- 40 También se desvela un método para reducir los niveles de colesterol, niveles de triglicéridos, o una combinación de los mismos en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, complementos nutricionales o productos alimentarios descritos anteriormente.
- 45 También se desvela un método para complementar con oligoelementos esenciales en un sujeto, comprendiendo el método la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, complementos nutricionales o productos alimentarios descritos anteriormente, en el que la composición, dispositivo de suministro, microcápsula, complemento y producto alimentario comprende un oligoelemento esencial.
- 50 También se desvela un método para mejorar la sensibilidad a insulina en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, complementos nutricionales o productos alimentarios descritos anteriormente.
- 55 También se desvela un método para reducir la hiperglucemia en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, complementos nutricionales o productos alimentarios descritos anteriormente.
- 60 También se desvela un método para reducir la hipercolesterolemia en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, complementos nutricionales o productos alimentarios descritos anteriormente.
- 65 También se desvela un método para reducir la grasa corporal en un sujeto, que comprende la etapa de administrar

al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, complementos nutricionales o productos alimentarios descritos anteriormente.

5 También se desvela un método para promover la pérdida de peso en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, complementos nutricionales o productos alimentarios descritos anteriormente.

10 También se desvela un método para tratar o prevenir la diabetes en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, complementos nutricionales o productos alimentarios descritos anteriormente.

También se desvela una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro o microcápsulas descritas anteriormente y un vehículo farmacéutico.

15 También se desvela un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1. El producto alimentario puede ser un producto horneado, una pasta, un producto de carne, un producto lácteo congelado, un producto lácteo, un producto de queso, un producto de huevo, un condimento, una mezcla de sopa, un tentempié, un producto de nueces, un producto de proteína vegetal, un caramelo duro, un caramelo blando, un producto de ave de corral, un zumo de fruta procesado, un azúcar granulado, una salsa, una salsa de carne, un jarabe, una barra nutricional, una bebida, un polvo de bebida seco, una mermelada o gelatina, una fórmula infantil o un alimento para bebés. El producto alimentario también puede ser un producto de pescado o alimento para animales de compañía, un pienso de ganado o de acuicultura. El producto alimentario también puede ser pan, tortillas, cereal, salchicha, pollo, helado, yogur, leche, aliño para ensaladas, salvado de arroz, zumo de frutas, un polvo de bebida seca, rollos, galletas, galletas saladas, tartas de frutas o pasteles.

30 También se desvela un método para reducir los niveles de colesterol, niveles de triglicéridos o una combinación de los mismos en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, o un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1.

40 También se desvela un método para complementar con oligoelementos esenciales en un sujeto, comprendiendo el método la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, o un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1.

50 También se desvela un método para mejorar la sensibilidad a la insulina en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, o un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1.

65 También se desvela un método para reducir la hiperglucemia en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta

en SEC ID N° 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, o un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1.

También se desvela un método para reducir la hipercolesterolemia en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, o un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1.

También se desvela un método para reducir la grasa corporal en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, o un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1.

También se desvela un método para promover la pérdida de peso en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, o un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1.

También se desvela un método para tratar o prevenir diabetes en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, o un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1.

También se desvela una formulación farmacéutica que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en el que la secuencia de 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1.

## VI. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la materia una divulgación y descripción completa de cómo los compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o métodos reivindicados en el presente documento se realizan y evalúan, y se pretende que sean puramente ejemplares y no se pretende que limiten la divulgación. Se ha intentado asegurar la precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deberían tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones. A no ser que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, la temperatura es en °C o es a temperatura ambiente, y la presión es a o cerca de la atmosférica.

### 1. Ejemplo 1 Aislamiento de la cepa de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

Se emplearon técnicas de purificación de cepas bacteriológicas clásicas para aislar ONC-T18 de hojas de mangle recogidas en Advocate Harbor, Nueva Escocia. ONC-T18 se cultivó en serie a 25 °C en un agar de medio nutriente que contenía glucosa 5 g l<sup>-1</sup>, peptona 2 g l<sup>-1</sup>, extracto de levadura 2 g l<sup>-1</sup> y agar 15,0 g l<sup>-1</sup> para 1 l de agua de mar filtrada en 0,2 µm hasta que se aseguró la pureza. Posteriormente, se preparó un medio líquido que contenía agua de mar artificial al 15 % (marina trófica), complementada con una fuente de nitrógeno y carbono, que era glucosa 60 g l<sup>-1</sup> y extracto de levadura 10 g l<sup>-1</sup>, respectivamente. Este medio (50 ml de medio en matraces de 250 ml) se inoculó con ONC-T18, después se incubó a 25 °C y se aireó mediante agitación a 120 rpm.

Se separó ONC-118 del medio mediante centrifugación, con la biomasa celular, después se lavó, se volvió a centrifugar y se liofilizó hasta su compleción. La biomasa celular se pesó después para determinar las eficiencias del cultivo con los valores de biomasa por litro de medio registrados. Se realizó extracción de la fracción lipídica de la biomasa y posterior separación de metil éster de ácidos grasos usando el método de Bligh y Dyer. Se realizó transesterificación transfiriendo material celular liofilizado a un tubo de ensayo de tapón enroscado de 10 ml y añadiendo HCl metanólico 10 % y diclorometano al tubo, permitiendo que la mezcla reaccionara durante 2 horas a 90 °C. Después se extrajeron metil ésteres de ácidos grasos mediante adición de hexano: cloroformo, y el componente de metil éster se midió mediante cromatografía de gases (FID) para determinar el perfil de ácidos grasos de cada microorganismo y la comunidad simbiótica (ONC-T18). Se determinaron las concentraciones de cada metil éster de ácidos grasos (C14:0 a C22:6) por comparación de las áreas máximas de GC de dos patrones internos (C19:0 y C23:0) añadidos en cantidades definidas tanto al comienzo (C23:0) como al final (C19:0) de los procedimientos de transesterificación. La cantidad total de ácidos grasos por gramo de biomasa celular seca y el porcentaje de contenido de cada ácido graso, calculados usando este método, se muestran en la Figura 2.

A partir del análisis de estos resultados, junto con los mostrados en la Figura 1, puede verse que ONC-T18 demostró la capacidad para producir cantidades aumentadas de DHA, así como cantidades notables de EPA y DPA. ONC-T18 produce aproximadamente 25 % de DHA, 8,0 % de DPA (n-6) y 1,0 % de EPA dentro de este medio de fermentación no optimizado. Posteriormente, ONC-T18 se eligió basándose en una combinación de características económicamente deseables: (1) capaz de crecimiento heterotrófico máximo (en comparación con cepas de control); (2) contiene un alto porcentaje de ácidos grasos altamente insaturados omega-3; (3) capaz de crecer en nutrientes económicos; (4) termotolerancia y son (5) eurihalinos.

Además, se compararon múltiples cepas diferentes de microbios productores de aceites con ONC-T18. Se cree que cada uno de estos microbios comprende un traustoquítrido y produce aceite en las cantidades mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3, [] = mg/g

	□ DHA	□ EPA	Lípidos Totales	Peso (g)
<b>MYA-1381</b>	127,96	5,52	216,37	1,80
<b>ATCC-20891</b>	37,97	7,14	67,34	1,30
<b>ONC-T01</b>	5,18	7,76	50,82	0,40
<b>ONC-T02</b>	31,84	4,20	52,88	0,50
<b>ONC-T03</b>	24,87	6,97	75,00	0,60
<b>ONC-T04</b>	14,39	4,49	41,74	0,90
<b>ONC-T05</b>	11,37	3,97	34,89	0,10
<b>ONC-T06</b>	27,80	6,71	83,87	0,10
<b>ONC-T07</b>	33,02	5,49	61,81	0,50
<b>ONC-T08</b>	24,48	4,83	53,35	0,80
<b>ONC-T09</b>	63,82	4,25	109,12	0,80
<b>ONC-T10</b>	22,22	4,93	40,99	0,10
<b>ONC-T11</b>	18,37	21,25	214,98	0,80
<b>ONC-T12</b>	57,96	9,03	96,25	0,60
<b>ONC-T13</b>	12,90	4,57	39,52	1,30
<b>ONC-T14</b>	15,99	5,16	36,46	0,50
<b>ONC-T15</b>	15,53	5,11	37,72	0,50
<b>ONC-T16</b>	18,02	5,55	42,12	0,50
<b>ONC-T17</b>	36,43	4,34	94,26	0,30
<b>ONC-T18</b>	83,63	2,76	321,14	2,30
<b>ONC-T19</b>	34,71	8,07	66,14	0,60
<b>ONC-T20</b>	19,28	6,94	66,74	0,10
<b>ONC-T21</b>				

ES 2 451 667 T3

	□ DHA	□ EPA	Lípidos Totales	Peso (g)
ONC-T22	22,72	3,26	47,58	0,60
ONC-T23				
ONC-T24	11,73	3,56	33,56	0,70
ONC-T25	26,99	6,11	45,67	0,60
ONC-T26	14,50	6,43	39,22	0,60
ONC-T27	26,83	7,75	61,87	0,70
ONC-T28	16,62	6,02	38,28	0,90
ONC-T29	14,67	4,91	34,48	0,80
ONC-T30	16,56	5,42	81,88	0,80
ONC-T31	13,36	5,74	44,86	0,30
ONC-T32	19,12	6,56	53,29	0,20
ONC-T33				
ONC-T34	11,92	5,98	53,36	0,60
ONC-T35				
ONC-T36				
ONC-T37	35,69	11,06	82,73	0,10
ONC-T38	22,73	10,94	51,56	0,10
ONC-T39				
ONC-T40	26,87	8,83	67,87	0,80
ONC-T41	22,85	6,65	52,63	0,50
ONC-T42	33,65	9,22	83,93	0,80
ONC-T43	12,49	3,25	37,93	0,80
ONG-T44	11,71	2,93	55,05	1,10
ONC-T45	26,08	7,95	70,45	0,70
ONC-T46	33,34	6,27	63,76	0,30
ONC-T47	10,01	4,77	68,02	0,70
ONC-T48	26,23	3,95	69,06	0,60
ONC-T49	16,64	4,89	39,76	0,30
ONC-T50	13,64	4,56	40,30	1,00
ONC-T51				
ONC-T52	26,57	4,55	41,36	0,60
ONC-T53	11,40	3,56	29,20	0,70
ONC-T54	10,34	3,18	29,31	0,70
ONC-T55				
ONC-T56				
ONC-T57				
ONC-T58	10,30	3,13	27,10	0,70
ONC-T59				
ONC-T60	27,71	7,01	66,84	0,30
ONC-T61	15,72	5,62	52,56	0,40
ONC-T62				
ONC-T63	20,17	8,25	62,58	0,60
ONC-T64	12,16	2,97	44,73	1,10
ONC-T65				
ONC-T66				
ONC-T67	23,71	5,63	43,24	0,50
ONC-T68	22,72	6,10	41,37	0,50

Se entiende que al igual que para ONC-T18, como se describe en el presente documento, se desvela un conjunto de microbios productores de aceites como se representan por las capacidades productoras de aceites desveladas en el presente documento, tal como por un porcentaje de producción de DHA y aceite total, o por la producción de DHA total, por ejemplo.

**2. Ejemplo 2 Identificación de especies de *Thraustochytrium* eucariotas de ONC-T18 usando técnicas genéticas**

Usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cebadores que se dirigen al gen del ARN ribosómico 18S, que es universal para todas las especies eucariotas, fue posible generar productos de PCR de los genes estructurales del microorganismo eucariota aislado de ONC-T18 (según el Ejemplo 1). Después se secuenciaron los productos de PCR y se designaron SEC ID N° 1 para la especie eucariota (véase Figura 2).

Comparación de SEC ID N° 1 con secuencias de ácido nucleico halladas en la base de datos genómica, GenBank (Centro Nacional para la Información Biotecnológica, National Institute of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos) usando el algoritmo de BLAST (herramienta de búsqueda de alineamiento local básica) identificó SEC ID N° 1 como más relacionado con *Thraustochytrium striatum* [AF265338] (97,5 % de similitud).

Se muestran a continuación los resultados de BLAST para ONC-T18 *Thraustochytrium* sp.

Secuencias que produjeron alineamientos significativos:	Puntuación (bits)	Valor de E
gi 14279326 gb AF265338.1  <i>Thraustochytrium striatum</i> small subun...	2126	0,0
gi 50508012 dbj AB183657.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11072 gen...	2121	0,0
gi 54778780 gb AY773276.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. PJN-10 18S rib...	1857	0,0
gi 50508019 dbj AB183664.1 <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11093 gen...	1828	0,0
gi 38524571 dbj AB126669.1  <i>Thraustochytrium</i> sp. CHN-1 gene for...	1748	0,0
gi 24817740 dbj AB073308.2  <i>Thraustochytriidae</i> sp. N1-27 gene fo...	1628	0,0
gi 50508018 dbj AB183663.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11092 gen...	1257	0,0
gi 50508017 dbj AB183652.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11091 gen...	1257	0,0
gi 50506015 dbj AB183690.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11084 gen...	1255	0,0
gi 50508011 dbj AB183655.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11070 gen...	1255	0,0
gi 50508016 dbj AB183661.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11086 gen...	1249	0,0
gi 15823623 dbj AB05255E.1  <i>Schizochytrium</i> sp. KH105 gene for 18...	1245	0,0
gi 50508013 dbj AB183658.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11075 gen...	1227	0,0
gi 50508010 dbj AB183655.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11067 gen...	1213	0,0
gi 54303872 gb AY758364.1  <i>Schizochytrium</i> sp. FJU-512 18S riboso...	1158	0,0
gi 14279326 gb AP265338.1  AF265338 <i>Thraustochytrium striatum</i> sma...	1106	0,0
gi 6492308 gb AF155209.1 AF155209 <i>Labyrinthulid quahog</i> parasite...	765	0,0
gi 16209570 gb AY052644.1  <i>Labyrinthulid quahog</i> parasite QPX sma...	757	0,0
gi 9755031 gb AF261664.1 AF261664 <i>Labyrinthulid quahog</i> parasite...	757	0,0
gi 58176547 gb AY870336.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. Fngl 18S ribos...	735	0,0
gi 67624914 dbj AB191425.1  Uncultured eukaryote gene for small...	724	0,0
gi 5509891 dbj AB022112.1  <i>Thraustochytrium striatum</i> gene for 18...	724	0,0
gi 561884 gb L34054.1 ULKRRE <i>Ulkenia profunda</i> 18S ribosomal RNA...	702	0,0
gi 50508014 dbj AB183659.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11077 gen...	686	0,0
gi 50508008 dbj AB183653.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11060 gen...	686	0,0
gi 50508009 dbj AB183654.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11063 gen...	658	0,0
gi 41391986 emb AJ535188.1  <i>Pleurosira</i> cf. <i>laevis</i> 18S rRNA gene,...	634	e-178
gi 28316562 gb AF525670.1 <i>Pleurosira laevis</i> small subunit ribos...	634	e-178
gi 5509889 dbj AB022110.1 <i>Thraustochytrium aureum</i> gene for 18S...	634	e-178
gi 561883 gb L34668.1 TUKRRE <i>Thraustochytrium kinnei</i> 18S ribosom...	628	e-176
gi 5509894 dbj AB022115.1  <i>Ulkenia radiata</i> gene for 18S rRNA	624	e-175
gi 5509893 dbj AB022144.1  <i>Ulkenia profunda</i> gene for 18S rRNA	624	e-175
gi 5509895 dbj AB022116.1  <i>Ulkenia Misurgensis</i> gene for 18S rRNA	603	e-169
gi 9027563 gb AF257315.2  <i>Thraustochytriidae</i> sp. BS2 18S ribosom...	589	e-164
gi 5509886 dbj AB022107.1  <i>Schizochytrium limacinum</i> gene for 18S...	581	e-162
gi 48727879 gb AY620254.1  <i>Metromonas simplex</i> clone TC-S small s...	571	e-159
gi 33309650 gb AF411282.1  Unidentified cercozoan 18S ribosomal...	569	e-158
gi 28076844 gb AF530543.1  Uncultured eukaryote clone AT4-68 18S...	531	e-147
gi 30144485 gb AY256273.1  Uncultured eukaryote isolate E170 sma...	517	e-143

## ES 2 451 667 T3

Secuencias que produjeron alineamientos significativos:	Puntuación (bits)	Valor de E
gi  30144529 gb AY256317.1  Uncultured eukaryote isolate D107 sma...	507	e-140
gi  14579477 gb AF363207.1  Eukaryote marine clone ME1-24 18S rib...	505	e-139
gi  39578677 gb AY426906.1  Uncultured marine eukaryote clone BL0...	504	e-139
gi  39981869 gb AY381216.1  Uncultured eukaryote clone BL010625.3...	504	e-139
gi  73533408 gb DQ103811.1  Uncultured marine eukaryote clone M4_...	504	e-139
gi  73533402 gb DQ103805.1  Uncultured marine eukaryote clone M3_...	504	e-139
gi  73533389 gb DQ103792.1  Uncultured marine eukaryote clone M2_...	504	e-139
gi  73533382 gb DQ103785.1  Uncultured marine eukaryote clone M1_...	504	e-139
gi  30144534 gb AY256322.1  Uncultured eukaryote isolate D179 sma...	504	e-139
gi  24817738 dbj AB073305.2  Thraustochytriidae sp. H1-14 gene fo...	504	e-139
gi  30268157 emb AJ519935.1  AST519935 Aplanochytrium stocchinoi p...	504	e-139
gi  58531881 gb AY882527.1  Uncultured marine eukaryote clone T41...	504	e-139
gi  463127 gb L27634.1  LADDLRRNA Labyrinthuloides minuta 16S-like...	504	e-139
gi  39981839 gb AY381186.1  Uncultured eukaryote clone OR000415.1...	502	e-138
gi  39981824 gb AY381171.1  Uncultured eukaryote clone HE001005.1...	502	e-138
gi  18026024 gb AY046848.1  Uncultured eukaryote isolate C3_E019...	502	e-138
gi  18026022 gb AY046846.1  Uncultured eukaryote isolate C3_E017...	502	e-138
gi  18026014  gb  AY046838.1  Uncultured eukaryote isolate C3_E008...	502	e-138
gi  18026008 gb AY046832.1  Uncultured eukaryote isolate C3_E002...	502	e-138
gi  18025980 gb AY046804.1  Uncultured eukaryote isolate C2_E014...	502	e-138
gi  18025969 gb AY046793.1  Uncultured eukaryote isolate C2_E002...	502	e-138
gi  18025801 gb AY046625.1  Uncultured eukaryote isolate C1_E024...	502	e-138
gi  67624915 dbj AB191426.1  Uncultured eukaryote for small gene...	502	e-138
gi  67624913 dbj AB191424.1  Uncultured eukaryote gene for small...	502	e-138
gi  67624912 dbj AB191423.1  Uncultured eukaryote gene for small...	502	e-138
gi  39981861 gb AY381208.1  Uncultured eukaryote clone BL010320.1...	500	e-138
gi  14349249 dbj AB052556.1  Thraustochytrium sp. KK17-3 gene for...	500	e-138
gi  20218962  dbj  AB073307.1  Thraustochytriidae sp. M4-103 gene f...	498	e-137
gi  59709960  gb  AY916582.1  Uncultured eukaryote clone Zeuk76 18S...	496	e-136
gi 18025960 gb AY046784.1  Uncultured eukaryote isolate A3_E043...	496	e-136
gi  18025789 gb AY046613.1  Uncultured eukaryote isolate C1_E009...	496	e-136
gi  30144548 gb AY256336.1  Uncultured eukaryote isolate D278 sma...	496	e-136
gi 2138106 gb U59933.1  U59933 Scybalium jamaicense 18S ribosomal...	496	e-136
gi  53828186 gb AY744948.1  Phytophthora palmivora isolate 88108...	494	e-136
gi  60687349 gb AY821976.1  Uncultured oomycete clone CV1_B2_5 sm...	494	e-136
gi  60687347 gb AY821974.1  Uncultured Phytophthora-like oomycete...	494	e-136
gi  60687342  gb AY821969.1  Uncultured comycete clone CV1_B1_49 s...	494	e-136
gi  39981870 gb AY381217.1  Uncultured eukaryote clone BL010625.3...	494	e-136
gi  39981864 gb AY381211.1  Uncultured eukaryote clone BL010320.2...	494	e-136
gi  39981860 gb AY381207.1  Uncultured eukaryote clone BL010320.6...	494	e-136
gi  3998144 gb AY381191.1  Uncultured eukaryote clone BL000921.1...	494	e-136
gi  18026046 gb AY046870.1  Uncultured eukaryotes isolate C3_E044...	494	e-136
gi  18026039 gb AY046863.1  Uncultured eukaryote isolate C3_E035...	494	e-136
gi  18026031 gb AY045855.1  Uncultured eukaryote isolate C3_E026...	494	e-136
gi  42412527 gb AY486144.1  Pythium insidiosum 18S ribosomal RNA...	494	e-136
gi  73533425 gb DQ103828.1  Uncultured marine eukaryote clone M2_...	494	e-136
gi 34576227 gb AY129064.1  Uncultured marine eukaryote UEPAC45p4...	494	e-136
gi  30144522  gb AY256310.1  Uncultured eukaryote isolate D85 Smal...	494	e-136
gi  30144521 gb AY256309.1  Uncultured eukaryote isolate D84 smal...	494	e-136
gi  30144518  gb AY256306.1  Uncultured eukaryote isolate D79 smal...	494	e-136
gi  30144475  gb AY256263.1  Uncultured eukaryote isolate E106 sma...	494	e-136
gi  30144473 gb AY256261.1  Uncultured eukaryote isolate E94 smal...	494	e-136
gi  21954246  gb  AY116220.1  Uncultured eukaryote clone ANT12-26 1...	494	e-136
gi  41393027  emb AJ535176.1  LMI535176 Leptocylindrus minimum 18S...	494	e-136
gi  53693111  gb AY742743.1  Phytophthora tropicalis isolate_129F-...	494	e-136
gi 53693108 gb AY742759.1  Pythium vexans isolate Pyv6-2 18S rib...	494	e-136

Secuencias que produjeron alineamientos significativos:	Puntuación (bits)	Valor de E
gi  53693105 gb AY742756.1  Pythium splendens isolate 117 18S rib...	494	e-136
gi  53693104 gb AY742755.1  Pythium aphanidermatum 18S ribosomal...	494	e-136
gi  53693097 gb  AY742748.1  Phytophthora capsici isolate 98110 18...	494	e-136
gi  53693096 gb  AY742747.1  Phytophthora tropicalis isolate 23047...	494	e-136
gi  53693094  gb AY742745.1  Phytophthora palmivora isolate 8829 1...	494	e-136
gi  58531862  gb AY882508.1  Uncultured marine eukaryote clone T53...	494	e-136

### 3. Ejemplo 3: producción optimizada de biomasa usando la cepa ONC-T18

La producción de aceites derivados de microbios (o unicelulares) depende de diversas variables de proceso, tales como el nivel de inóculo inicial, tipo de sustrato, la composición de los medios, temperatura y pH. Específicamente, la producción basada en microbios de ácidos grasos altamente insaturados usando cepas de traustoquitridos, muestra una correlación directa entre la biomasa y la producción de ácidos grasos. En consecuencia, un entendimiento de las necesidades básicas u optimización de parámetros es un factor importante para conseguir el máximo resultado. Por lo tanto, para determinar el mejor medio para la producción de cantidades de ácidos grasos aumentadas, se realizaron experimentos de optimización de la biomasa inicial. Específicamente, el método de Taguchi recientemente desarrollado (Joseph J y Piganatiells JR, IIE Trans 20:247-254, 1998), basado en matrices ortogonales, se usó para determinar la configuración de medio óptima para aumentar la densidad óptica (relacionada directamente con la producción de biomasa). En este caso, el método de Taguchi se usó para mejorar el entendimiento de los efectos acumulados de las variables que presentan un impacto en la producción de biomasa. Los efectos que tuvieron en la producción de biomasa las variaciones de la concentración de nitrógeno (extracto de levadura, peptona, L-glutamato), carbono (glucosa) y sal (sal marina artificial). Por lo tanto, se preparó diversos medios líquidos con diversas cantidades de extracto de levadura, peptona y L-glutamato (0, 4, 10, 20, 50 g l<sup>-1</sup>) en relación con diversas cantidades de glucosa y solución de sal marina (5, 40, 100, 160, 200 g l<sup>-1</sup> y 0, 6, 20, 30, 40 g l<sup>-1</sup>, respectivamente). Las concentraciones se calcularon de acuerdo con una matriz ortogonal L<sup>25</sup> de tal manera que se determinó el medio de nitrógeno elegido mediante el uso de análisis de la relación de señal y ruido (SNL) a las 48 y 120 horas, usando la siguiente fórmula:

$$SNL = -10 \log \left[ \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right]$$

en la que n = número de niveles y y = rendimiento (DO<sub>600</sub> media de experimentos por triplicado).

Los resultados de estos experimentos (que se dirigen específicamente a consideraciones de biomasa), como se muestran dentro de la Figura 2 posteriormente, demostraron que la tasa de utilización del nitrógeno por ONC-T18 en relación con la densidad óptica (DO<sub>600</sub>) fue peptona, después extracto de levadura seguido de L-glutamato. Sin embargo, basándose en el crecimiento máximo las mejores fuentes de nitrógeno para aumentar la producción de biomasa fueron extracto de levadura, después peptona, seguido de L-glutamato. Además, mediante el uso de experimentos similares con variaciones en glucosa y salinidad (concentración de sal marina), la composición de medio óptima y más barata para la producción de biomasa de ONC-T18 estaba dentro de un medio que comprendía extracto de levadura 2 g l<sup>-1</sup>, MSG 8 g l<sup>-1</sup>, glucosa 60 g l<sup>-1</sup> y sal marina 6 g l<sup>-1</sup>.

### 4. Ejemplo 4: Producción optimizada de ácido docosaheptaenoico (DHA) por la cepa ONC-T18

Se prepararon medios consistentes en una fuente de nitrógeno (peptona, extracto de levadura, L-glutamato (MSG) o combinaciones de los mismos) y una fuente de carbono (glucosa), en una solución salina (agua marina artificial), para determinar la mejor composición de medios para producción de biomasa y DHA óptimas de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 3 (mostrada en la Tabla 4). Después de cultivar a 25 °C y 130 rpm durante 3 días, se determinó la biomasa, ácidos grasos totales por litro de medio, porcentaje de contenido de ácidos grasos en peso, porcentaje de contenido de DHA en ácidos grasos totales y la cantidad de DHA por litro de medio mediante cromatografía de gases según el método descrito en el Ejemplo 1, y en el presente documento, y mostrado en la Tabla 4 posterior.

En este caso, se confirmó el DHA por comparación con patrones conocidos de DHA usando espectrometría de masas de cromatografía de gases y métodos de fijación de máximos. Los hallazgos del paquete experimental ①, en el que se investigaron variaciones en las formas tanto naturales como orgánicas de nitrógeno, mostraron que la composición de medios óptima debería contener entre 4,0 y 6,0 g l<sup>-1</sup> tanto de extracto de levadura como de L-glutamato para producción de biomasa y DHA óptimas. El paquete experimental ②, por otro lado, que investiga cambios en la composición de sodio añadido al medio mostró producción de DHA y producción de biomasa óptimas cuando se usó sal marina artificial. Además, el paquete experimental ③, en el que se varió la concentración de sodio dentro del medio, representó máximos para producción de DHA y biomasa entre 5 y 15 % de agua marina artificial L<sup>-1</sup> dH<sub>2</sub>O. Los resultados del paquete experimental ④, en el que se evaluaron variaciones en los niveles de glucosa,

demonstraron que el intervalo de 40 a menos de 160 g l<sup>-1</sup> de glucosa se traducía en producción de biomasa y DHA óptimas. Finalmente, los resultados del paquete experimental ⑤ indican que ONC-T18 producía valores equivalentes tanto para biomasa celular como para concentración de DHA, cuando se usó glucosa o glicerol como fuentes de carbono.

5

Tabla 4. Resultados de experimentos de optimización de la producción de DHA con respecto a variaciones en composiciones de medio

Nº de Exp	Fuentes de carbono		Tipos de sal		Fuentes de Nitrógeno		Ácidos grasos totales (g l <sup>-1</sup> )	Porcentaje de ácidos grasos (% en peso)	Porcentaje de contenido de DHA (% en peso)	Cantidad de DHA (g l <sup>-1</sup> )	
	Fuente de carbono usada	Cantidad añadida (g l <sup>-1</sup> )	Mezcla de sal usada	Cantidad añadida (% de salinidad)	Extracto de levadura (g l <sup>-1</sup> )	MSG (g l <sup>-1</sup> )					
①	401	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	7,7	34,53	20,20	1,5579
	402	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	8,0	2,0	10,0	44,01	17,09	1,7156
	403	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	6,0	4,0	11,5	50,69	16,23	1,8624
	404	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	4,0	6,0	16,9	69,07	24,19	4,0877
	405	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	2,0	8,0	21,3	81,73	20,99	4,4752
	406	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	0,0	10,0	0,15	197	28,81	0,0426
②	407	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	13,2	58,92	31,44	4,1362
	408	Glucosa	60,0	NaCl	15,0	10,0	0,0	9,6	63,75	33,45	3,7009
	409	Glucosa	60,0	N <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15,0	10,0	0,0	0,05	1,41	20,14	0,0109
③	410	Glucosa	60,0	Sal marina	5,0	10,0	0,0	14,6	59,23	31,44	4,6004
	411	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	10,8	51,01	26,17	2,8144
	412	Glucosa	60,0	Sal marina	37,5	10,0	0,0	15,9	69,32	25,32	4,0194
	413	Glucosa	60,0	Sal marina	75,0	10,0	0,0	10,8	6102	25,25	2,7356
	414	Glucosa	60,0	Sal marina	100,0	10,0	0,0	11,8	68,21	24,02	2,8290
	415	Glucosa	60,0	Sal marina	125,0	10,0	0,0	11,2	5963	22,56	2,5256
④	416	Glucosa	5,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	0,63	5,21	29,18	0,1844
	417	Glucosa	20,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	4,06	29,59	24,01	0,9752
	418	Glucosa	40,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	9,91	59,9	23,08	2,3665
	419	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	1076	51,01	26,17	2,8144
	420	Glucosa	100,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	12,79	69,50	31,55	4,0344
	421	Glucosa	160,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	1,0	9,40	30,01	0,3013
⑤	422	Glucosa	5,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	0,62	12,74	29,86	0,1866
	423	Glicerol	5,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	0,52	18,84	35,07	0,1836

### 5. Ejemplo 5: Para recoger ONC-T18 para máxima producción de DHA

10

Se cultivó ONC-T18 en la misma composición de medios y mismas condiciones que se han mostrado dentro del

Ejemplo 1. Resulta de interés en este caso particular el momento en el que debería recogerse ONC-T18 para obtener las máximas cantidades de DHA, DPA y EPA así como tener en cuenta el tiempo necesario para conseguir dichas cantidades (véase Figura 3).

- 5 Los resultados experimentales de ciclo temporal mostraron que el momento óptimo para recoger ONC-T18 para la producción de DHA óptima dentro del matraz y biorreactor varió entre 3 y 5 días, respectivamente.

#### 6. Ejemplo 6: Análisis de lípidos derivados de ONC-T18

10 Se extrajo la fracción de lípidos total de ONC-T18 usando un método de Bligh y Dyer modificado. Específicamente, se rehidrataron 2,0 g de biomasa celular seca durante una noche a 4 °C en 8 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Se añadieron 30 ml de metanol: cloroformo (2:1 v/v) a la mezcla y se agitó suavemente a 120 rpm durante 20 minutos, decantándose el sobrenadante resultante. El sedimento se resuspendió después en metanol: cloroformo: H<sub>2</sub>O (2:1:0,8 v/v/v) y el procedimiento se repitió con sobrenadantes, que se agruparon y se movieron a un embudo de separación. Después se añadieron 5 ml de cloroformo y 5 ml de H<sub>2</sub>O al embudo dando como resultado la formación de un sistema líquido de dos fases. Después de mezcla vigorosa dentro del embudo de separación, se retiró la capa de cloroformo, se concentró en gas N<sub>2</sub>, se resuspendió en cloroformo y se almacenó a -20 °C hasta que se analizó. Se aplicó aproximadamente 1 µl de la fracción de lípidos total puntualmente en múltiples chromarod, se separó y se analizó usando un instrumento latroscan MK6 TLC / FID.

20 El análisis de los resultados muestra que el componente de ácidos grasos que produce ONC-T18 en fermentación heterotrófica es casi completamente de naturaleza triglicérida (al menos 95 %). Además de la fracción de ácidos grasos neutra mencionada anteriormente, ONC-T18 también produce una fracción de carotenoides y fosfolípidos distinguible. Tras el aislamiento posterior de la fracción de fosfolípidos, primero mediante un quemado del 50 % y después del 75 % seguido de separación basada en disolvente, se determinó que estaba presente una fracción de fosfolípidos grande y compleja. Los resultados mostraron la presencia de componentes de fosfatidilcolina, fosfatidilserina y ácido fosfatídico dentro de la muestra.

#### 7. Ejemplo 7: Producción de antioxidante usando la cepa, ONC-T18

30 El eucariota, ONC-T18 se cultivó usando condiciones y medio como se ha mencionado previamente. La biomasa celular resultante después de fermentación heterotrófica se recoge mediante centrifugación, filtración o sedimentación. Las células se recogieron por centrifugación a 3800 x g y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato. La biomasa celular (nueva o liofilizada) se suspendió en un volumen 10 x de acetona, se agitó durante 5 minutos a 200 rpm, se centrifugó a 3800 x g durante 5 minutos y se concentró hasta sequedad por evaporación de N<sub>2</sub>. Los pigmentos se resuspendieron inmediatamente después en una cantidad mínima de acetona al 10 % en hexano y se almacenaron a 20 °C hasta su análisis por HPLC. Después se llevó a cabo identificación de extractos de carotenoides en Agilent 1100 HPLC (Agilent, Palo Alto, CA, Estados Unidos) equipado con un detector de longitud de onda variable ajustado a 470 nm. Las muestras se inyectaron a través de una columna de guardia Symmetry C18 (Waters, Milford, MA, Estados Unidos) a una columna de fase inversa Bondclone C18 (Phenomenex, Torrance, CA, Estados Unidos; partículas de 10 µm; 3,9 x 300 mm i.d.). El volumen de inyección fue de 10 µl y se usó un caudal de 1,00 ml/minuto de acetona al 10 % en hexano durante un periodo de 25 minutos. Los datos cuantitativos de carotenoides se basaron en la comparación del área máxima con patrones conocidos (en este caso astaxantina, cantaxantina, β-criptoxantina, zeaxantina, equinenona y β-caroteno; ChromaDex, Santa Ana, CA, Estados Unidos). En ausencia de un patrón conocido tal como en el caso del carotenoide, fenicoxantina, el área máxima de astaxantina se usó para calcular sus concentraciones. La identidad del carotenoide se confirmó adicionalmente mediante HPLC-MS usando un HPLC Waters equipado con una matriz de fotodiodos (Waters modelo 996) que conducía a un espectrómetro de masas ESI-Q-TOF Micromass (Waters, Milford, MA, Estados Unidos). El análisis por HPLC de ONC-T18 reveló posteriormente la presencia de varios compuestos antioxidantes (entre 50 y 1.250 mg kg<sup>-1</sup>) dentro de la biomasa celular. Estos compuestos incluyeron los carotenoides antioxidantes astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenona y betacaroteno en el intervalo de 1 a 20 mg kg<sup>-1</sup>, 0,25 a 10 mg kg<sup>-1</sup>, 1 a 20 mg kg<sup>-1</sup> a 20 mg kg<sup>-1</sup> y 1 a 200 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, así como varios compuestos polifenólicos de flavonoides no identificados.

#### 8. Ejemplo 8: Comparación con microorganismos conocidos

55 Se comparó la capacidad de ONC-T18 para producir DHA, EPA y DPA con la de microorganismos conocidos. La cantidad de biomasa celular por litro de medio, el porcentaje del contenido de grasas o ácidos grasos por biomasa celular seca, el porcentaje de contenido de DHA, EPA y DPA en ácidos grasos totales, y la cantidad de DHA, EPA y DPA obtenida cuando se producen DHA, EPA y DPA por cultivo de *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304, *Thraustochytrium* sp. ATCC 20891, *Thraustochytrium* sp. ATCC 20892, *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210, *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185, *Schizochytrium* sp. ATCC 20888, *Schizochytrium aggregatum* ATCC 28209 y *Schizochytrium limacinum* MYA-1381, así como cuando DHA, EPA y DPA se producen por cultivo de ONC-T18 de acuerdo con la presente invención.

65

Tabla 5. Comparación de la producción de lípidos y características de biomasa de varias cepas representativas de traustoquítridos

Microorganismo	Cantidad de biomasa (g l <sup>-1</sup> )	Porcentaje de contenido de lípidos (% g <sup>-1</sup> )	Porcentaje del contenido de DHA (% g <sup>-1</sup> )	Porcentaje del contenido de EPA (% g <sup>-1</sup> )	Porcentaje del contenido de DPA (% g <sup>-1</sup> )	DHA total (g l <sup>-1</sup> )	EPA total (mg l <sup>-1</sup> )	DPA total (mg l <sup>-1</sup> )
<i>Thraustochytrium</i> sp ATCC 20891	1,8	sin datos	12	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos
<i>Thraustochytrium</i> sp ATCC 20892	3	7	35	sin datos	sin datos	0,07	sin datos	sin datos
<i>Thraustochytrium</i> sp ATCC26185	2,3	sin datos	419	3,1	10	sin datos	sin datos	sin datos
<i>T. aureum</i> ATCC 34304	4-5	8-20	24-51	3,6-9,3	sin datos	0,1-0,5 5	0,0001	sin datos
<i>T. roseum</i> ATCC 28210	8-17	18-25	50	sin datos	sin datos	0,6-2,1	sin datos	sin datos
<i>Schizochytrium</i> sp.ATCC 20888	10,5	50	25-37	sin datos	sin datos	195	sin datos	sin datos
<i>S. aggregatum</i> ATCC 28209	1,4	1,7	6,0	6,1	sin datos	1	1	sin datos
<i>S. limacinum</i> SR21 MYA-1331	23-40	40-53,5	29,7-34	0,2-0,4	sin datos	3,0-7,2	0,08	sin datos
ONC-T18	25-55	45-80	24-34,2	0,1-2	6-10	4,6-13	0,2-0,8	0,9-3,8

5 Como se ha mostrado en la Tabla 5, resulta evidente que, cuando se lleva a cabo cultivo usando ONC-T18 de acuerdo con la presente invención, los valores de biomasa celular por litro de medio fueron extremadamente altos en comparación con las otras cepas ensayadas. Además, de acuerdo con la presente invención, ONC-T18 tiene un porcentaje de contenido de lípidos muy alto en comparación con las otras cepas mencionadas anteriormente. Además, de acuerdo con la presente invención, el porcentaje de contenido de DHA y DPA dentro de ONC-T18 es extremadamente alto, con niveles de EPA que se ha mostrado que son comparables a todas las cepas exploradas. Por lo tanto, parece que ONC-T18 tiene la capacidad de producir grandes cantidades de DHA, EPA y DPA en condiciones de fermentación como se ha mencionado dentro del Ejemplo 1.

### 9. Ejemplo 9: Información sobre fuentes de carbono alternativas

15 Se ha mostrado que ONC-T18 crece preferentemente en medios en los que las principales fuentes de nitrógeno son extracto de levadura, glutamato sódico y/o peptona y la principal fuente de carbono es D-glucosa. Como resultado de la realización del perfil metabólico detallado de ONC-T18 se ha observado que el glicerol (fuente de carbono) también era una alternativa viable. Además, también se ensayaron corrientes de residuos del procesamiento de aceite de pescado que contenían glicerol con respecto a su aplicabilidad como alternativas de nutriente de bajo coste. Se realizaron experimentos usando 200 ml de medio en matraces de 500 ml, cultivados a 25 °C durante 3 días, 120 rpm en el caso del glicerol. El contenido de glicerol de dos productos de residuos de procesamiento de aceite de pescado, GWW (lavado de agua de glicerol) y GAW (lavado de ácido de glicerol), constituyó el 40 % v:v de 200 ml de medio (ajustado a pH 6,5), mientras que se añadió el glicerol al 6 % a 200 ml de medio (p v) como control.

Tabla 6. Contenido de ácidos grasos, biomasa y glicerol para un estudio de fuente de carbono alternativa.

	Porcentaje (%) del contenido de ácidos grasos y lípidos totales en peso					TFA (mg g <sup>-1</sup> )	Glicerol (g l <sup>-1</sup> )	Biomasa (g l <sup>-1</sup> )
	AA	EPA	DHA	DPA n-3	DPA n-6			
Glicerol 6 % (p:v)	0,29	0,52	26,31	0,24	9,49	426,12	76,00	9,13
GAW 40 % (v:v)	0,37	1,32	19,69	0,42	6,36	294,55	68,59	5,94
GWW 40 % (v:v)	0,46	5,55	12,46	1,01	3,82	274,33	2,70	3,08

30 El análisis de estos resultados ha determinado que el uso de componentes de corriente de residuos de aceite de pescado, tales como productos secundarios de glicerol, como fuentes de carbono en la fermentación a gran escala de ONC-T18 aunque da como resultado una cantidad de ácidos grasos totales reducida, representa un contenido de DHA mantenido dentro de las células microbianas (Figura 10).

**10. Ejemplo 10: Multiplicador de peso seco de las células**

Puede cultivarse *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 para la producción de aceites omega-3 en diversas configuraciones de reactor hasta 100.000 ml. Todas las fermentaciones comienzan con la preparación de un inóculo de volumen final de 10-20 %, que se usa para establecer el cultivo de fermentación. Las configuraciones del medio inicial comprenden hasta 6 g/l de sal marina, 10 g/l de fuente de nitrógeno y 60 g/l de fuente de carbono, con la adición semicontinua de otra fuente de carbono 75 g/l después de 24 a 36 horas de fermentación inicial durante 72 a 96 horas adicionales y se realiza dentro del intervalo de temperaturas de 18-25 °C. Por ejemplo, usando el medio de sal marina 6 g/l, extracto de levadura 2 g/l, L-glutamato 8 g/l y D-glucosa 60 g/l (con una adición de 75 g/l añadido después de 36 horas), cultivado a 25 °C durante 96 horas, ONC-T18 fue capaz de producir 40 g/l de peso seco de células (DCW), 80 % (DCW) de ácidos grasos totales (TFA)/fracción lipídica (entre C14:0 y C24:0) y 30 % de DHA (TFA). De forma similar es posible aumentar el peso seco de las células multiplicando los componentes de medio tanto de nitrógeno como de carbono para obtener un efecto de multiplicación similar en la biomasa sin afectar a los contenidos de TFA o DHA. Por ejemplo, usando el medio sal marina 24 g/l, extracto de levadura 8 g/l, L-glutamato 32 g/l y D-glucosa 300 g/l, cultivado a 25 °C durante 312 horas, ONC-T18 fue capaz de producir 80 g/l de peso seco de células (DCW), 60 % (DCW) de ácidos grasos totales (TFA)/fracción lipídica (entre C14:0 y C24:0) y 38 % de DHA (TFA).

**11. Ejemplo 11: Cultivo de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 en diversas fuentes de carbono (C) y nitrógeno (N) alternativas y el efecto en el peso seco de las células y lípidos**

Se investigó el crecimiento de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 en diversas fuentes de nitrógeno y carbono de bajo coste. Específicamente, se cultivaron 50 ml de ONC-T18 en matraces de 250 ml que contenía sales marinas artificiales 6 g/l, durante 72 horas a 25 °C. Las concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno se muestran posteriormente con 2 g/l de cada fuente de nitrógeno enumerada, usadas junto con 8 g/l de L-glutamato (con la excepción de harina de pescado en la que se usaron 4 g). Las fuentes de carbono se intercambiaron como se indica. Todos los experimentos se realizaron por triplicado; todas las extracciones para análisis de metil éster de ácido graso se realizaron por triplicado junto con inyecciones de GC por triplicado.

Los resultados indican que *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 produce biomasa seca de células óptima (es decir, mayor que los dos medios de control) cuando se cultiva en las fuentes de nitrógeno EMD extracto de levadura y harina de pescado. Por el contrario, se descubrió que los lípidos eran menores que en el control, mientras que DHA era óptimo usando agua de macerado de maíz y peptona EMD. Finalmente, se descubrió que la fuente de carbono dextrosa aumentaba el contenido de lípidos, mientras que la fructosa y dextrosa producían contenido de DHA mayor que los controles.

Tabla 7: Cultivo de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18.

Medio (sal 6 g/l, cultivo de 72 horas, cultivos de 50 ml)		C (g/l)	N (g/l)	dcw/l medio (g)	Lípido (mg/g)	Lípido (g/l)	DHA (mg/g)	DHA (g/l)	DHA (% de lípidos)
Fuentes de nitrógeno	Agua de macerado de maíz-MSG	60	10	11,36	371,97	4,33	111,64	U44	29.72
	Semilla de algodón-MSG	60	10	9,99	297,08	2,70	45,20	0,500	16.94
	YE EMD™-MSG	60	10	15,49	343,90	5,02	70,68	0,786	20.70
	YE EMD™	60	10	35,79	189,01	6,76	37,14	0,448	19.65
	Peptona EMD™-MSG	60	10	11,70	379,48	4,19	83,50	0,926	23.33
	YE Sigma™ -MSG	60	10	9,77	257,86	3,28	54,60	0,618	19.69
	YE Sigma™	60	10	10,39	341,98	3,53	58,30	0,629	17.01
	YE Fermtech™ -MSG	60	10	13,99	269,53	3,82	56,97	0,664	21.10
	YE Fermtech™	60	10	17,07	24323	4,15	48,01	0,530	19.74
Harina de pescado (62 % de proteína)	60	12	19,53	290,72	5,68	73,59	0,828	2531	
Fuentes de carbono	Fructosa	60	10	14,57	498,54	8,09	96,97	1,070	21.55
	Dextrosa	60	10	14,98	623,91	9,87	113,69	1,232	18.94
	Dextrina de maíz	60	10	4,65	89,69	0,39	25,69	0,278	26.75
	Gelatina	60	10	7,09	31,87	0,13	11,86	0,127	27.70
	Almidón (maíz)	5	10	4,85	94,04	0,46	19,49	0,206	20.72
		30	10	3,13	90,07	0,23	23,78	0,256	26.40
	Almidón (trigo)	5	10	8,03	86,96	0,47	17,62	0,185	17.76
30		10	18,16	18,59	0,34	3,83	0,042	20.58	
Medio de control (1)		60	10	16,92	487,59	8,25	70,87	0,768	13,25
Medio de control (2)		60	10	10,88	483,06	6,06	74,64	0,818	16,19

Abreviaturas:

MSG= L-glutamato (sódico)

YE= Extracto de levadura

**5 12. Ejemplo 12: Técnicas de extracción para aislamiento de lípidos totales y fracciones**

Se ensayó diversos métodos para el aislamiento de aceites omega-3 seleccionados para determinar la eficacia de aislamiento óptima. Estos métodos incluyeron: el método de Bligh y Dyer convencional (Bligh y Dyer, Can J. Biochem. Physiol., 37:912-917, 1959); el método de extracción y transesterificación combinado usado específicamente con especies de traustocóquidos que permiten el procesamiento de muestras para análisis de GC FAME rápido (Lewis *et al.*, J. Microbiol. Methods, 43:107-116, 2000), extracción por saponificación simultánea (Cartens *et al.*, J. Am. Oil Chem. Soc. 73:1025-1031, 1996), y extracción de fase sólida usando columnas de gel de sílice que pueden aislar selectivamente triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos (Pinkart *et al.*, J. Microbiol. Methods, 34:9-15, 1998, Bateman y Jenkins, J Agric. Food Chem., 45:132-135, 1997).

15 Específicamente, se dividieron 40 gramos de peso seco de células de biomasa de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 producida en un único ciclo de fermentación (véase Ejemplo 1) en lotes de 0,44 g y se usaron para cada técnica. Todas las técnicas se realizaron por triplicado con eficacias analizadas usando determinación de metil éster de ácidos grasos mediante FID-GC, de nuevo por triplicado con ciclos por triplicado por muestra. Los resultados demuestran que el contenido de ácidos grasos total podría variar entre métodos individuales con fluctuaciones más probablemente debido a la saturación de disolvente: compuesto, consideraciones de alteración de la biomasa y otras consideraciones de condiciones físicas (por ejemplo, temperatura y tiempo).

20

Tabla 8: Técnicas de extracción para aislamiento de lípidos totales y fracciones.

Bligh y Dyer		DHA	EPA	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1	C16:0	C16:1	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA
1	104,39	4,25	36,23	5,82	113,94	77,27	4,92	44,01	1,13	1,67	28,86	430,99			
2	136,75	5,45	46,51	7,40	142,96	98,38	6,07	56,19	1,10	2,19	37,92	552,98			
3	13,59	4,78	42,51	6,91	128,54	37,01	5,20	51,10	1,30	2,10	35,98	532,91			
<b>Media</b>	<b>125,24</b>	<b>4,83</b>	<b>41,77</b>	<b>6,71</b>	<b>123,48</b>	<b>87,55</b>	<b>5,40</b>	<b>50,53</b>	<b>1,28</b>	<b>1,99</b>	<b>34,25</b>	<b>505,63</b>			
<b>Transesterificación directa</b>															
DHA	EPA	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C13:0	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA				
1	104,39	4,24	36,39	5,42	112,94	75,27	5,42	44,01	1,13	1,67	28,86	420,99			
2	39,83	4,54	34,81	5,60	103,04	73,43	5,56	42,35	0,98	1,87	25,35	392,88			
3	101,64	4,25	37,16	5,98	106,94	75,98	5,35	43,95	1,11	1,78	26,46	410,65			
<b>Media</b>	<b>98,65</b>	<b>4,34</b>	<b>36,12</b>	<b>5,67</b>	<b>107,64</b>	<b>74,89</b>	<b>5,44</b>	<b>43,60</b>	<b>1,07</b>	<b>1,77</b>	<b>25,89</b>	<b>408,17</b>			
<b>Saponificación simultánea</b>															
DHA	EPA	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA				
1	204,85	6,75	46,55	8,56	182,26	134,81	8,73	105,04	2,16	66,68	785,25				
2	188,51	6,17	47,64	9,32	208,29	121,25	10,35	95,80	2,53	2,89	770,14				
3	198,25	6,12	47,21	9,65	207,71	136,51	9,58	98,50	2,41	3,10	782,54				
<b>Media</b>	<b>197,20</b>	<b>6,35</b>	<b>47,13</b>	<b>9,18</b>	<b>199,42</b>	<b>130,86</b>	<b>9,55</b>	<b>99,78</b>	<b>2,37</b>	<b>3,06</b>	<b>779,31</b>				
<b>Extracción de fase sólida</b>															
DHA	EPA	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA				
1	169,17	0,42	68,41	10,33	204,43	140,14	8,09	76,97	1,75	3,00	47,05	748,33			
2	172,26	0,44	69,59	11,01	207,01	143,74	8,11	78,72	1,74	3,27	47,86	819,04			
3	173,65	0,43	69,21	11,31	208,97	146,64	8,16	77,64	1,73	3,64	46,98	785,64			
<b>Media</b>	<b>171,69</b>	<b>0,43</b>	<b>69,07</b>	<b>11,05</b>	<b>206,80</b>	<b>143,51</b>	<b>8,12</b>	<b>77,78</b>	<b>1,74</b>	<b>3,30</b>	<b>47,30</b>	<b>784,34</b>			

N.B: Cada valor enumerado antes es la media de ciclos por triplicado usando FID-GC para análisis de FAME

**13. Ejemplo 13:****a) Materiales y Métodos****5 (1) Aislamiento y mantenimiento de traustóquidos**

Se recogieron setenta muestras marinas incluyendo: *Spartina alterniflora*, *Zostera marina* y sedimento en sitios de la costa oriental canadiense de Nueva Escocia, Isla del Príncipe Eduardo, Nuevo Brunswick, Terranova y Labrador entre julio y agosto de 2002. Las muestras se colocaron en frascos de 20 ml que contenían 10 ml de agua marina natural filtrada en 0,2  $\mu\text{m}$  estéril y 300  $\text{mg l}^{-1}$  de penicilina y 500  $\text{mg l}^{-1}$  de estreptomina. Las suspensiones se cebaron con polen estéril (*Acer* sp.) y se incubaron durante 48 horas a 18 °C, de acuerdo con (Bremer, Marine Mycology – A Practical Approach, Fungal Diversidad Press, Hong Kong, pp 49-61 (2000)). Se transfirieron después granos de polen por asa y se extendieron en placas de agar B1 (extracto de levadura 1  $\text{g l}^{-1}$ , peptona 1  $\text{g l}^{-1}$ , agar 10  $\text{g l}^{-1}$  para 1 l de agua marina natural) que contenían antibióticos y se incubaron. Se seleccionaron colonias hialinas, irregulares, individuales compuestas de células esféricas o limaciformes y atípicas de colonias de levadura o bacterianas y se subcultivaron al menos tres veces en placas B1 para pureza.

**(2) Producción de biomasa para cribado de ácidos grasos**

Para cribar aislados con respecto a cultivo y producción de ácidos grasos, se preparó medio líquido usando agua marina natural filtrada en 0,2  $\mu\text{m}$  que contenía peptona 2  $\text{g l}^{-1}$  (BD, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) y extracto de levadura 2  $\text{g l}^{-1}$  (BD, Franklin Lanes, NJ, Estados Unidos), que se esterilizó por autoclave, seguido de la adición de glucosa esterilizada filtrada 0,2  $\mu\text{m}$  5  $\text{g l}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos) (Bowles *et al.*, J Biotechnol 70:193-202 (1999)). Se inoculó un cultivo de 30 ml de volumen por asa de una placa de agar y se cultivó durante 4 días a 18 °C en un agitador a 100 RPM. Se usaron después 5 ml de este cultivo para inocular un cultivo de 95 ml incubado durante 4 días adicionales (fase estacionaria). Las células se recogieron por centrifugación a 4.500 RPM, se aclararon con 5 ml de agua destilada y se volvieron a centrifugar. Los sedimentos celulares se liofilizaron, se pesaron y se almacenaron a -80 °C antes de su derivatización para análisis de ácidos grasos.

**30 (3) Preparación de metil ésteres de ácidos grasos (FAME)**

La extracción de metil éster de ácidos grasos (FAME) fue mediante el método de transesterificación directa, modificado de Lewis *et al.* (J Microbiol. Meth 43:107-116 (2000)). Específicamente, se añadieron 20 mg de material liofilizado y 3 ml de mezcla de reacción de transesterificación (metanol: ácido clorhídrico:cloroformo (10:1:1 v/v)). Las células se agitaron vorticialmente durante 10 segundos para asegurar una dispersión uniforme de la biomasa y se colocaron a 90 °C durante 120 minutos. Una vez que se hubo completado la transesterificación, se retiraron muestras y se permitió que se enfriaran a temperatura ambiente. Después se añadió agua (1 ml) y se agitó vorticialmente durante 10 segundos. Después se extrajeron los FAME mediante la adición de 3 alícuotas de 2 ml de hexano: cloroformo (4:1), se agitó vorticialmente durante 10 segundos y se dejó reposar hasta que se consiguieron separaciones líquidas transparentes.

**(4) Análisis cromatográfico de gases (GC) de FAME**

Se llevó a cabo análisis GC de FAME usando dos patrones internos (200  $\mu\text{l}$  cada uno). Se añadió un ácido hexacosanoico (C23:0) antes de la transesterificación y el otro ácido nonadecanoico (C19:0) se añadió directamente antes del análisis. Se realizaron análisis usando un Agilent 6890 GC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Estados Unidos) equipado con una columna capilar de sílice fusionada OMEGAWAX 320 de 30 metros x 0,32 metros de diámetro interno (grosor de la película de 0,25  $\mu\text{m}$ ) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos) y detector de ionización de llama (1  $\mu\text{l}$  de volumen de inyección, gas transportador  $\text{H}_2$  con un caudal constante de 5,0  $\text{ml min}^{-1}$  y se ajustó a 250 °C, relación de separación 50:1 para detector FID a 275 °C). Se realizó la confirmación de la identidad de FAME usando un espectrómetro de masas Trace GC-DSQ (Thermo Electron, Boston, MA, Estados Unidos) y comparación de los tiempos de retención para patrones de laboratorio.

**(5) Identificación genética**

El ADN genómico se extrajo usando el kit de aislamiento de ADN microbiano MoBio UltraClean (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores oligonucleotídicos usados en la amplificación del gen de ARNr 18S, se modificaron de Honda *et al.* (J Eukaryot. Microbiol 46:637-647 (1999)) concretamente T18S1F 5'-CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3' y T18S5R 5'-TCACTACGGAAACCTTGTTACGAC-3'. Una mezcla de reacción de PCR de 20  $\mu\text{l}$  contenía 2U de ADN polimerasa Biolase™ (Bioline, Boston, MA, Estados Unidos), tampón de reacción  $\text{NH}_4$  1x,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, betaína 1 M (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos), 200  $\mu\text{M}$  de la mezcla de nucleótidos de PCR (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), 1  $\mu\text{M}$  de cada cebador directo e inverso (MWG Biotech, High Point, NC, Estados Unidos) y 100 ng de molde de ADN genómico. Después de una etapa de desnaturalización inicial durante 3 minutos a 94 °C, se realizó amplificación por PCR usando un termociclador de gradiente de ciclo Eppendorf Master (Eppendorf,

Westbury, NY, Estados Unidos), usando un programa de 45 segundos a 94 °C, 30 segundos a 64 °C y 2 minutos a 72 °C durante 30 ciclos, seguido de una extensión final de 10 minutos a 72 °C. El producto de PCR se purificó usando el kit de limpieza de PCR MoBio UltraClean (MoBio Laboratories Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para secuenciación directa (MWG Biotech., High Point, NC, Estados Unidos) usando los cebadores FA2, FA3, RA1, R (Mo *et al.*, Mar Biol. 140:883-889 2002), T18S1F y T18S5R. Las secuencias resultantes se alinearon y se compararon con la secuencia de nucleótidos de microorganismos similares almacenados en GenBank (Benson *et al.*, Nucleic Acids Res. 33: D34-38 (2005)) usando DS Gene (Accelrys, San Diego, CA, Estados Unidos). Se generó posteriormente un árbol filogenético usando el método de unión de vecinos (Saito y Nei, Mol Biol Evol 4:406-425 (1987)), con la significación estadística evaluada usando 1000 nuevos muestreos de bootstrap (Felsenstein, Evolution 39:783-791 (1985)).

### (6) Identificación de carotenoides

Se recogieron células por centrifugación a 3800 x g y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato. Después se resuspendieron en un volumen 10 x de acetona (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos), se agitaron durante 5 minutos a 200 RPM, se centrifugaron a 3800 x g durante 5 minutos y se concentraron hasta su sequedad por evaporación de N<sub>2</sub>. Seguido de resuspensión en una cantidad mínima de acetona 10 % en hexano antes de análisis de HPLC. Las identificaciones se llevaron a cabo en un HPLC Agilent 1100 (Agilent, Palo Alto, CA, Estados Unidos) equipado con un detector de longitud de onda variable ajustado a 470 nm. Las muestras se inyectaron a través de una columna de guardia C<sub>18</sub> Symmetry (Waters, Milford, MA, Estados Unidos) a una columna de fase inversa Bondclone C<sub>18</sub> (Phenomenex, Torrance, CA, Estados Unidos; partículas de 10 µm; 3,9 x 300 mm i.d.). El volumen de inyección fue de 10 µl y se usó un caudal de 1 ml min<sup>-1</sup> de acetona al 10 % en hexano durante un periodo de 25 minutos. La identidad de los carotenoides se confirmó adicionalmente con análisis de espectrometría de masas (ESI-QT de MS Micromass, Waters, Milford, MA, Estados Unidos). Los datos cuantitativos para cada carotenoide se basaron en el desarrollo de una curva de calibración usando patrones (hasta astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenona y β-caroteno) y comparando áreas máximas con concentraciones definidas.

### (7) Optimización de fermentación

El efecto del carbono, nitrógeno y sal marina en la producción de ácidos grasos y DHA se examinó usando cultivos discontinuos en matraces de Erlenmeyer de 250 ml agitados a 130 rpm durante 3 días a 25 °C. Se llevaron a cabo estudios de cultivo adicionales usando un biorreactor de 5 l Bplus Twin Biostat® (Sartorius BBI Systems Inc., Bethlehem, PA, Estados Unidos). Se usó un inóculo de 100 ml para inocular 4,9 l de medio en el biorreactor. Se midió la concentración de glucosa usando el kit de ensayo de glucosa (HK) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los constituyentes del medio y las condiciones empleadas en el biorreactor se detallan con los resultados relevantes.

### b) Resultados

Se desarrolló un procedimiento de recogida y cribado por el que se aislaron miembros de la familia de protistas Labyrinthulida, especialmente el género, *Schizochytrium* y *Thraustochytrium*, usando cebadura de polen y medios bacteriológicos selectivos. Este estudio, que abarca 20 sitios de recogida únicos dispersados por toda la costa Atlántica de Canadá, produjo 68 cepas puras, identificadas de forma microscópica. La selección de cepas oleaginosas, que tenían más del 20 % de su peso seco de células de ácidos grasos, se basó en los resultados de la realización de perfiles de PUFA por GC, productividad de biomasa, TFA máximo, concentraciones de DHA y en un menor grado EPA (Figura 11), de acuerdo con el método de (Lewis *et al.* J. Microbiol. Meth. 43: 107-116 (2000)). Los valores para las productividades de biomasa, TFA y posterior DHA y EPA variaron de 100 a 2300 mg l<sup>-1</sup>, 27,1 a 321,14, 5,18 a 83,63 y 2,97 a 21,25 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 11).

Todos los aislados que se cultivaron en medio líquido (54 de 68) produjeron cantidades importantes de ácidos grasos poliinsaturados omega-3, particularmente DHA que comprendía entre 22 y 80 % del contenido de C20 a C22 total de estas células (Figura 11). Esto confirma hallazgos previos, por los que los traustoquitridos aislados de ambientes templados fríos tienen perfiles de ácidos grasos en los que DHA es hasta el 53 % de los ácidos grasos totales presentes (Bowles *et al.*, J Biotechnol 70:193-202 (1999) y Huang *et al.*, Mar Biotechnol 5:450-457 (2003)). Es de particular interés ONC-T18 que produce hasta el 90 % de su contenido de C20 a C22 como DHA que es aproximadamente el 35 % de los ácidos grasos intracelulares totales. Se mostró que este contenido de DHA es equivalente al de varias cepas de producción comerciales, tales como *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 (32 %) y *S. limacinum* MYA-1381/SR21 (34 %) (Barclay *et al.*, J Appl Phycol 6:123-129 (1994) y Yokochi *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol 49:72-76, (2003)). Además, todos los aislados sintetizaron ácido eicosapentaenoico (EPA), que variaba entre 2 y 20 % p/p de los PUFA totales identificados (Figura 11). Además de los aceites omega-3 producidos, aproximadamente el 80 % de todos los aislados sintetizaron los PUFA omega-6, ácido araquidónico (AA) o ácidos docosapentaenoicos (DPA), a concentraciones que variaban entre 1 y 18 % y 3 y 7 % p/p, respectivamente (Figura 11).

Huang *et al.* (Mar Biotechnology 5:450-457 (2003)) sugirieron que para traustoquitridos aislados de las aguas costeras tropicales de Japón y Fiyi, podían describirse cinco perfiles de ácidos grasos poliinsaturados,

concretamente, DHA/DPA (n-6), DHA/DPA/EPA, DHA/EPA, DHA/DPA/EPA/AA y DHA/DPA/EPA/AA/ácido docosahexaenoico (Huang *et al.*, Mar Biotechnol 5:450-457 (2003)). En el caso de esta colección de traustochytridos, aislados de las aguas templadas de la costa Atlántica de Canadá, pudieron determinarse cuatro perfiles de PUFA, tres de los cuales son idénticos a los mencionados anteriormente, concretamente DHA/DPA/EPA en el 7,4 % de la recogida, DHA/EPA en el 13 % de la recogida y DHA/DPA/EPA/AA, 74 %, con una cuarta que comprendía una mezcla de DHA/EPA/AA al 5,6 %.

Mediante secuenciación directa del gen de ADNr 18S, ONC-T18 se identificó positivamente como un miembro de la familia de los traustochytridos (número de referencia de GenBank: DQ374149). El análisis filogenético indicó que ONC-T18 formaba un grupo único (97,5 % de identidad) con *Thraustochytrium striatum* T91-6 (Fig. 12) (Leander y Porter, Mycologia 93:459-464 (2001)). Al mismo tiempo se mostró que *Thraustochytridae* sp. MBIC 11093, N1-27 y *Thraustochytrium* sp. CHN-1, recogidos de las aguas tropicales costeras de Japón, y que se descubrió que eran productores significativos de DHA (Carmona *et al.*, Biosci Biotechnol Biochem 67:884-888 (2003) y Huang *et al* Mar. Biotechnol. 5; 450 -457 (2003)), eran 96, 95,5 y 94,5 % similares, respectivamente. La diversidad genética es bastante baja entre todos los miembros de los *Thraustochytridae* mostrados en la Figura 12, que varían del 97,5 al 91,0 % de similitud en total. No obstante, estas especies están distribuidas globalmente, con dos tercios aislados de las aguas costeras tropicales de Japón, China e Israel y el restante de las aguas templadas de América, Europa y Canadá.

El perfil de ácidos grasos de ONC-T18 indujo altos contenidos de PUFA C22, niveles muy bajos de FA C18 y C20, y la aparición de ácidos grasos saturados de cadena impar (15:0 y 17:0), de forma similar a *Schizochytrium* sp. KH105 o *S. limacinum* SR21. Además, el análisis de los perfiles de utilización de carbono y nitrógeno para las cepas ONC-T18, SR21 y KH105 mostró un patrón similar de asimilación. El contenido de DPA n-6 en la cepa ONC-T18 varió del 6 al 10 %, lo que parece ser extremadamente alto cuando se considera la aparición limitada de DPA n-6 en la biosfera. Se indicaron niveles similares de DPA n-6, sin embargo, por Nakahara *et al.* (J. Am. Oil Chem. Soc. 73:1421-1426 (1996)) en *Schizochytrium* sp. SR21 (6-10 %) y Ellenbogen *et al.* (Comp Biochem Physiol 29:805-81 (1969)) en *T. aureum* (9,5 %) y *T. roseum* (6-6 %).

El análisis del perfil de ácidos grasos de ONC-T18 en tres configuraciones de cultivo diferentes: (1) placa de agar; (2) matraz cónico y (3) biorreactor y cultivado en el mismo medio (Fig. 13), muestra una reducción de la diversidad de PUFA presentes y un aumento global de TFA de la placa de agar al biorreactor. Específicamente, las placas de agar mostraron una serie de PUFA, mientras que los cultivos realizados en matraz y biorreactor estuvieron dominados por uno o dos intermedios (Fig. 13). En comparación con *Thraustochytrium aureum*, que creció mejor en cultivo de matraz que en fermentador de tanque agitado (Ilda *et al.*, J Ferment Bioeng 8 1:76-78 (1996)), ONC-T18 creció mejor en un biorreactor. Este resultado está de acuerdo con el de (Nakahara *et al.*, J. Am. Oil Chem. Soc. 73:1421-1426 (1996)), que descubrió que *Schizochytrium* sp. SR21 mostraba alta resistencia a la agitación mecánica, y por lo tanto se desarrollaba en condiciones de biorreactor.

Además, se descubrió que se producían pigmentos carotenoides en fermentaciones en placa, matraz y biorreactor de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18, dando como resultado una descoloración naranja pálido La producción de estos antioxidantes es máxima dentro de fermentaciones de biorreactor simultáneamente con la producción de ácidos grasos. Además, mediante el uso de espectrometría de masas de HPLC, se determinó que estos compuestos antioxidantes se identificaban como astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenona y  $\beta$ -caroteno (Fig. 14), que se conjugaban con diversos PUFA. Se indicaron resultados similares entre miembros del grupo de protistas traustochytridos. Específicamente, se mostró que *Schizochytrium aggregatum* producía equinenona y cantaxantina (Valadon, Trans Br Mycol Soc 67:1-1.5 (1976)), mientras que Carmona *et al.* (Biosci Biotechnol Biochem 67:884-888 (2003) y Huang *et al.* (Mar Biotechnology 5:450-457 (2003)) demostraron la producción de astaxantina, equinenona, cantaxantina, fenicoxantina (no zeaxantina como en ONC-T18) y  $\beta$ -caroteno por *Thraustochytrium* sp CHN-1, un pariente cercano de ONC-T18 (Fig. 12). En este estudio, se descubrió que las concentraciones de estos carotenoides eran de un orden de magnitud menor que las de CHN-1 siendo el compuesto principal  $\beta$ -caroteno, en lugar de astaxantina, Por lo tanto, dentro de *Thraustochytrium* spp., puede ligarse la producción de PUFA y carotenoides de modo que las grasas de almacenamiento que se producen puedan protegerse de la oxidación.

Previamente se ha determinado que las cantidades relativas de los componentes de ácidos grasos principales (ácidos mirístico, palmítico y oleico) pueden alterarse en cierto grado cambiando las condiciones de crecimiento del cultivo (Ilda *et al.*, J Ferment Bioeng 81:76-78 (1996)). De este modo, se puede manipular la composición de ácidos grasos final y de este modo las propiedades físicas del PUFA deseado de una manera controlada durante la fermentación (Sijtsma *et al.*, Recent Res. Devel Microbiol 2:219-232 (1998)). En un intento de limitar los factores que inhiben la producción tanto de biomasa como de PUFA omega-3 en ONC-T18, se manipularon los componentes de carbono, nitrógeno y sal marina en medios nutrientes (Tabla 9), junto con la duración del cultivo (Fig. 15).

Tabla 9: Producción de biomasa media (DT ≤ 15 %), contenido de ácidos grasos totales (TFA) y DHA de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

Glucosa (g l <sup>-1</sup> )	Biomasa (g l <sup>-1</sup> )	TFA (% de biomasa)	DHA (% de TFA)	DHA (g l <sup>-1</sup> )
5	12,13	5,21	29,18	0,18
20	13,73	29,59	24,01	0,98
40	16,69	59,39	23,88	2,37
60	21,08	51,01	26,17	2,81
100	18,40	69,49	31,55	4,03
160	10,68	9,40	30,01	0,30

YE (g l <sup>-1</sup> )	MSG (g l <sup>-1</sup> )	Biomasa (g l <sup>-1</sup> )	TFA (% de biomasa)	DHA (% de TFA)	DHA (g l <sup>-1</sup> )
10	0	22,33	34,53	20,20	1,56
8	2	22,81	44,00	17,52	1,72
6	4	22,64	50,69	16,23	1,86
4	6	24,46	69,07	24,19	4,09
2	8	26,09	81,73	20,99	4,47
0	10	7,50	1,97	28,81	0,04

Sal marina (g l <sup>-1</sup> )	Biomasa (g l <sup>-1</sup> )	TFA (% de biomasa)	DHA (% de TFA)	DHA (g l <sup>-1</sup> )
2	24,70	59,23	31,44	4,60
6	21,08	51,01	26,17	2,81
15	22,90	69,32	25,32	4,02
30	17,76	61,02	25,25	2,74
40	17,27	68,21	24,02	2,83
50	18,77	59,63	22,56	2,53

5 Dentro de este estudio, a medida que se redujeron las concentraciones de nitrógeno, aumentó el contenido de ácidos grasos totales, obteniéndose el contenido de ácidos grasos totales más alto (aproximadamente 80 %) a una concentración de 1 % del extracto de levadura y/o glutamato monosódico (p/v). Los cultivos con una concentración de nitrógeno baja, sin embargo, también limitaron el crecimiento celular y de este modo la producción de ácidos grasos totales. Se obtuvo producción óptima en este experimento usando glutamato monosódico 8 g l<sup>-1</sup> y extracto de levadura 2 g l<sup>-1</sup>, produciendo biomasa 26,1 g l<sup>-1</sup> y DHA 4,5 g l<sup>-1</sup> (Tabla 9). Además, los aumentos del carbono hasta 100 g l<sup>-1</sup> aumentaron eficazmente el rendimiento de DHA, lo que coincide con resultados obtenidos para *Schizochytrium* sp. SR21 (Yokochi *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol 49:72-76, (2003)) y es contrario al mostrado en *T. aureum* en el que eran inhibitorias concentraciones de glucosa por encima de 10 g l<sup>-1</sup> (Ilda *et al.*, JFerment Bioeng 81:76-78 (1996)). Se obtuvieron rendimientos de DHA máximos de más de 4,0 g l<sup>-1</sup> en medio de glucosa, con rendimientos más de 5 veces los de *T. aureum* (Bajpai *et al.*, J. Am. Oil Chem. Soc. 68:509-514 (1991)) y *T. roseum* (Li y Ward, J Ind Microbiol 13:238-241 (1994)) y comparables a los de *Schizochytrium* sp. SR21 y KH105 (Aki *et al.*, J. Am. Oil Chem. Soc. 80:789-794 (2003)). Finalmente, ONC-T18 mostró capacidades eurihalinas clásicas, siendo capaz de soportar salinidades que variaban de 2,0 a 50,0 g l<sup>-1</sup>, dando como resultado una productividad de biomasa de 25-30 % de variabilidad (Tabla 9). En el mismo experimento se descubrió que los valores de DHA g l<sup>-1</sup> variaban hasta el 45 % entre el óptimo a 4,6 g l<sup>-1</sup> y el mínimo a 2,5 g l<sup>-1</sup> (Tabla 9).

20 La biomasa, TFA y DHA producidos por ONC-T18 durante un período de 168 horas en un biorreactor de 5 l se presenta en la Figura 15. La curva de crecimiento representada es típica de varias conseguidas en condiciones idénticas. Se alcanzó producción máxima de biomasa después de 120 horas, cerca del punto de agotamiento de la fuente de carbono (es decir, glucosa). Este también fue el punto en el que el contenido total de ácidos grasos de la biomasa alcanzó un máximo a aproximadamente 70 % de biomasa. Resulta interesante que después de solamente 24 horas de cultivo, el contenido de DHA subió al 30 % de ácidos grasos totales, permaneciendo en lo sucesivo constante a 20-25 %. Estos resultados son coherentes con los de otras cepas de traustochytridos productores de ácidos grasos, aunque hay disparidad con respecto a la velocidad a la que suceden estas reacciones.

### 30 c) Análisis

35 Previamente la mayoría de los estudios de Labyrinthomycota identificaron cepas que eran incapaces de almacenar ácidos grasos totales en cantidades mayores del 20 % de la biomasa. Por ejemplo, antes del aislamiento de *Schizochytrium* sp. SR 21 que era capaz de acumular hasta el 50 % de la biomasa como grasa, *T. aureum* era el mejor acumulador al 20 % (Bajpai *et al.*, J. Am. Oil Chem. Soc. 68:509-514 (1991)). ONC-T18, por otro lado, es capaz de acumular hasta el 80 % de su biomasa como lípidos.

Para que microorganismos oleaginosos tales como ONC-T18 acumulen aceite, normalmente deberían cultivarse en un medio de cultivo con una cantidad limitada de nitrógeno (habitualmente agotada después de 24 a 36 horas) y

cantidades abundantes de una fuente de carbono. Una vez que se ha agotado el nitrógeno, los microbios oleaginosos continúan asimilando la fuente de carbono pero ya no son capaces de experimentar división celular debido a una falta de nitrógeno (evitando de este modo la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos), siendo el resultado la conversión de estas fuentes de carbono (es decir, azúcares tales como glucosa) en aceites de almacenamiento. A este respecto, se considera que ONC-T18 crece más lentamente que otras cepas de traustoquítridos, tales como G13 (Bowles *et al.*, J Biotechnol 70:193-202 (1999) y Huang *et al.*, Mar Biotechnol 5:450-457 (2003), pero produce DHA a velocidades más rápidas y demuestra una capacidad única para incorporar cantidades elevadas de ácidos grasos totales. Finalmente, la capacidad de ONC-T18 para crecer a concentraciones salinas muy bajas con productividad tanto de biomasa como de ácidos grasos totales alta es notable, prestándose bien a aumento de escala anulando la naturaleza corrosiva del agua salada en el equipamiento de fermentación industrial.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> OCEAN NUTRITION LTD. CANADA  
Adam Burja  
Helia Radianingtyas  
Colin Barrow

20 <120> MICROORGANISMOS EUCARIOTAS PARA PRODUCIR LÍPIDOS Y ANTIOXIDANTES

<130> 15113/0012P1

25 <150> 60/688.207  
<151> 07-06-2005

<150> 60/751.401  
<151> 06-12-2005

30 <160> 3  
<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1  
<211> 1724  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial; nota = construcción sintética

40 <400> 1

ES 2 451 667 T3

```

dgtagtcata cgctcgtctc aaagattaag ccatgcatgt gtaagtataa gcgattatac      60
tgtgagactg cgaacggctc attatatcag ttatgatttc ttcgggtattt tctttatatg      120
gatacctgca gtaattctgg aattaataca tgctgagagg gcccgactgt tcgggagggc      180
cgcacttatt agagttgaag ccaagtaaga tggtagtca tgataattga gcagatcgt      240
tgtttggagc gatgaatcgt ttgagtttct gcccacacag ttgtcgacgg tagtgtattg      300
gactacggtg actataacgg gtgacgggga gttagggctc gactccggag agggagcctg      360
agagacggct accacatcca aggaaggcag caggcgcgta aattacccaa tgtggactcc      420
acgaggtagt gacgagaaat atcaatgcgg ggcgcttcgc gtcttgctat tggaatgaga      480
gcaatgtaaa accctcatcg aggatcaact ggagggcaag tctggtgcca gcagccggg      540
taattccagc tccagaagcg tatgctaaag ttggtgcagt taaaaagctc gtagttgaat      600
ttctggggcg ggagccccgg tctttgcgcg actgcgctct gtttgccgag cggctcctct      660
gccatcctcg cctctttttt tagtggcgctc gttcactgta attaaagcag agtggtccaa      720
gcaggtcgta tgacctggat gtttattatg ggatgatcag atagggctcg ggtgctattt      780
tgttggtttg cacatctgag taatgatgaa taggaacagt tgggggtatt cgtatttagg      840
agctagaggt gaaattcttg gatttccgaa agacgaacta cagcgaaggc atttaccag      900
catgttttca ttaatcaaga acgaaagtct ggggatcgaa gatgattaga taccatcgta      960
gtctagaccg taaacgatgc cgaacttgca ttgccccgtg tttgtattgg accctcgcag      1020
cagcacatga gaaatcaaag tctttggggt cgggggggag tatggctcga aggctgaaac      1080
ttaaaggaat tgacggaagg gcaccaccag gagtggagcc tgcggcttaa tttgactcaa      1140
cacgggaaaa cttaccaggt ccagacatag gtaggattga cagattgaga gctctttctt      1200
gattctatgg gtggtggtgc atggccgttc ttagtgggtg gagtgatttg tctggttaat      1260
tccgttaacg aacgagacct cggcctacta aatagcggtg ggtatggcga catacttgcg      1320
tacgcttctt agagggacat gttcgggata cgagcaggaa gttcagggca ataacaggtc      1380
tgtgatgccc ttagatgttc tgggcccgcac gcgcgctaca ctgatgggtt caacgggtgg      1440
tcategttgt tcgcagcgag gtgctttgcc ggaaggcatg gcaaatcctt tcaacgcca      1500
tcgtgctggg gctagatttt tgcaattatt aatctccaac gaggaattcc tagtaaacgc      1560
aagtcacatc cttgcattga atacgtcctt gccctttgta cacaccgccc gtcgcaccta      1620

```

```

ccgattgaac ggtccgatga aaccatggga tgaccttttg agcgtttggt cgcgaggggg      1680
gtcagaactc ggggtgaatct tattgttttag aggaaggtga agtc                          1724

```

5 <210> 2  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial; nota = construcción sintética

<400> 2  
 dcaacctggt tgatctgcc agta 24

15 <210> 3  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial; nota = construcción sintética

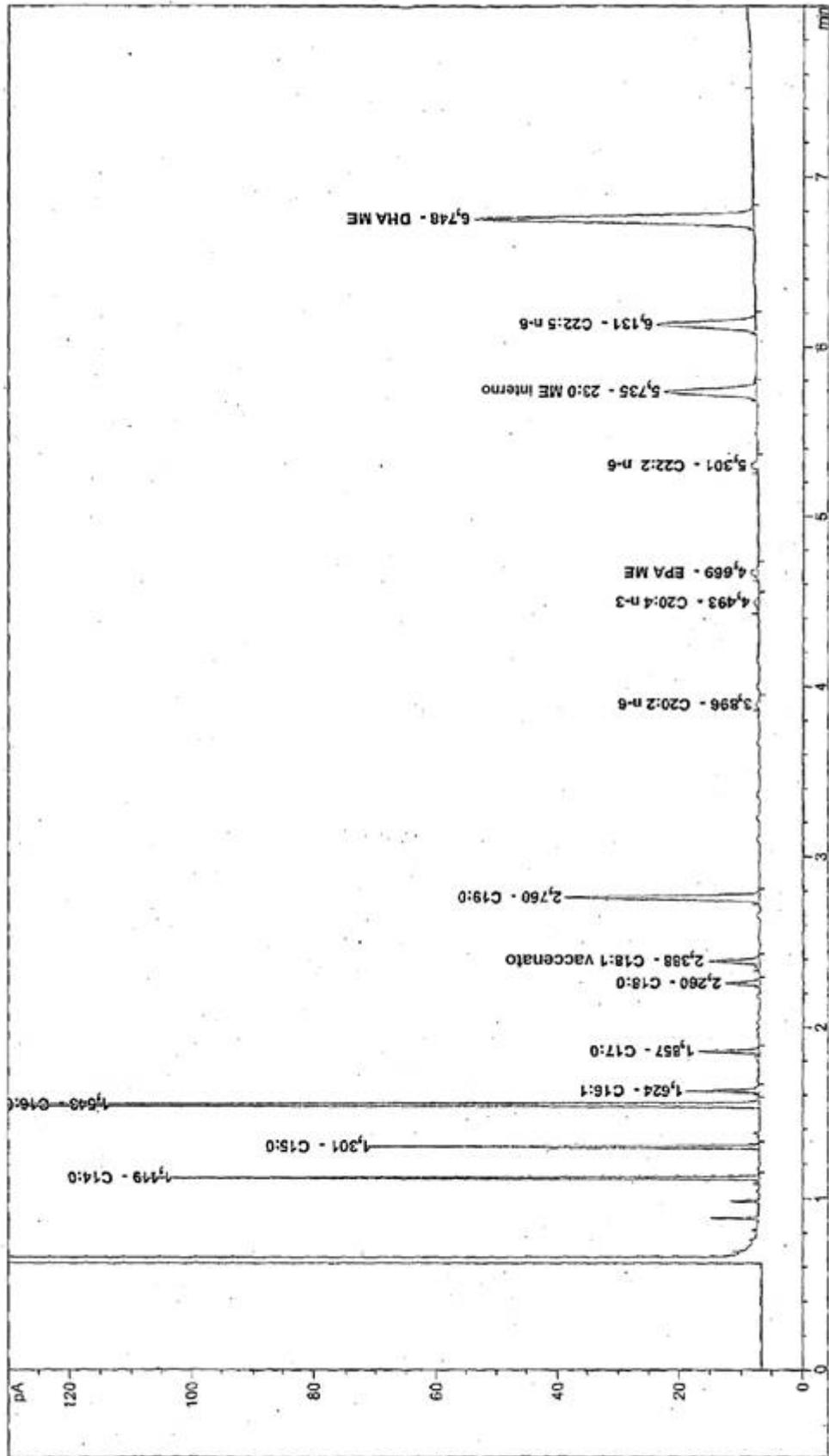
<400> 3  
 dtcactacgg aaacctgtt acgac 25

25

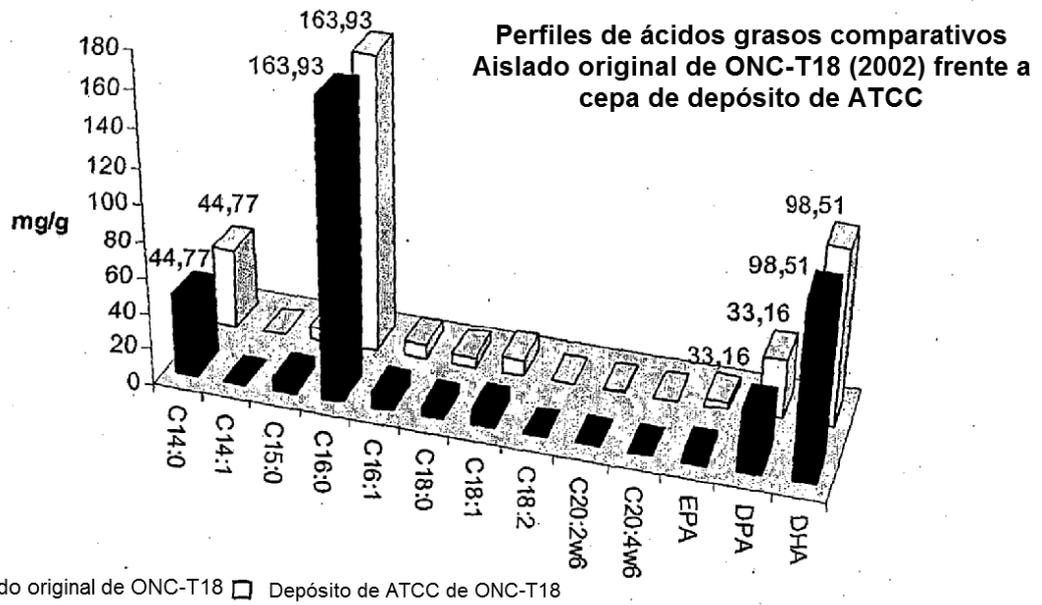
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en donde la secuencia de 18S tiene al menos un 97 % de identidad con la secuencia expuesta en SEC ID N° 1, en donde el microorganismo es capaz de producir una composición lipídica, en donde la composición lipídica comprende el 15 % en peso de fracción de ácidos grasos de DHA n-3, el 4 % en peso de fracción de ácidos grasos de DPA n-6 y el 1 % en peso de fracción de ácidos grasos de EPA n-2.
- 10 2. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo es del filo Labyrinthulomycota.
3. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo es de la clase Labyrinthulomycetes.
4. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo es de la subclase Thraustochytridae.
- 15 5. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo es del orden Thraustochytriales.
6. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo es de la familia Thraustochytriaceae.
- 20 7. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo es del género *Thraustochytrium*.
8. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo es *Thraustochytrium* sp.
- 25 9. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium roseum* y *Thraustochytrium striatum*.
10. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo es del género *Schizochytrium*.
11. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo es *Schizochytrium* sp.
- 30 12. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo comprende un ácido graso omega 3 u omega 6.
13. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo comprende DHA, EPA o DPA.
- 35 14. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo produce una composición lipídica por biomasa celular seca de al menos aproximadamente el 30 % en peso.
15. El microorganismo de la reivindicación 14, en el que el lípido comprende DHA.
- 40 16. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo es de la familia Thraustochytriaceae y tiene el número de referencia de ATCC PTA-6245.
- 45 17. Una composición que comprende un microorganismo eucariota como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
18. Un método para preparar una composición lipídica, comprendiendo el método: cultivar el microorganismo eucariota de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 en un medio heterotrófico y aislar la composición lipídica.
- 50 19. Un dispositivo de suministro que comprende una composición de la reivindicación 17.
20. Un complemento nutricional que comprende la composición de la reivindicación 17 o el dispositivo de suministro de la reivindicación 19.
- 55 21. Un producto alimentario que comprende la composición de la reivindicación 17, el dispositivo de suministro de la reivindicación 19 o el complemento nutricional de la reivindicación 20.

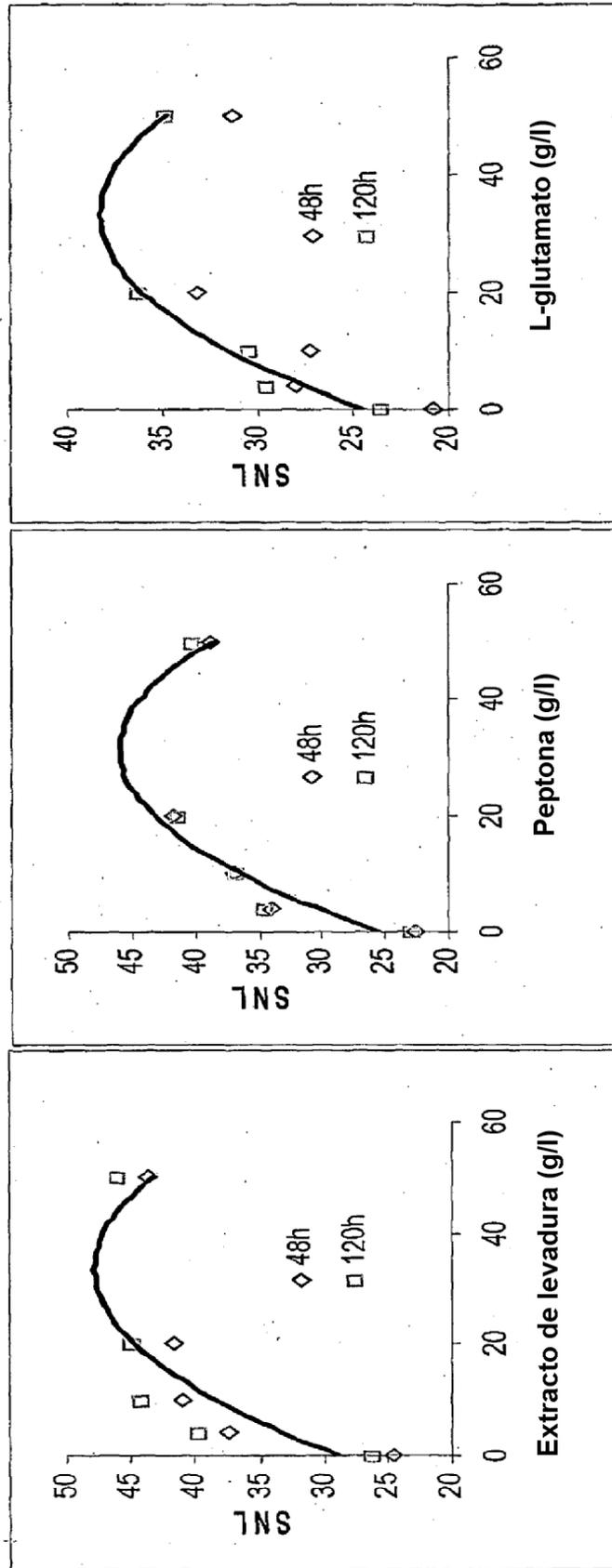
FIGURA 1



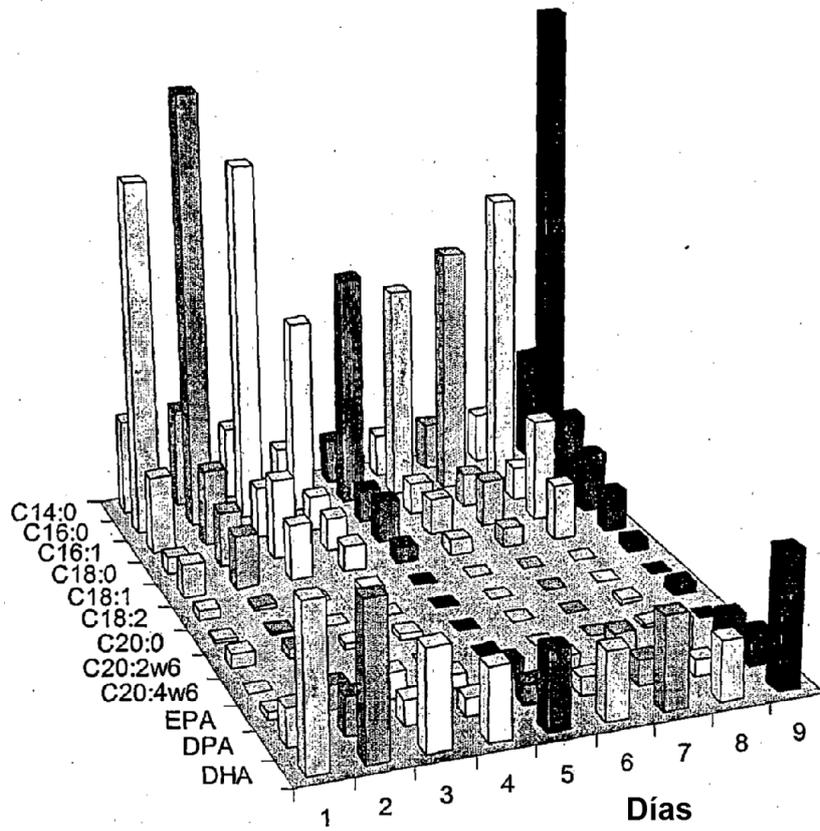
**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**

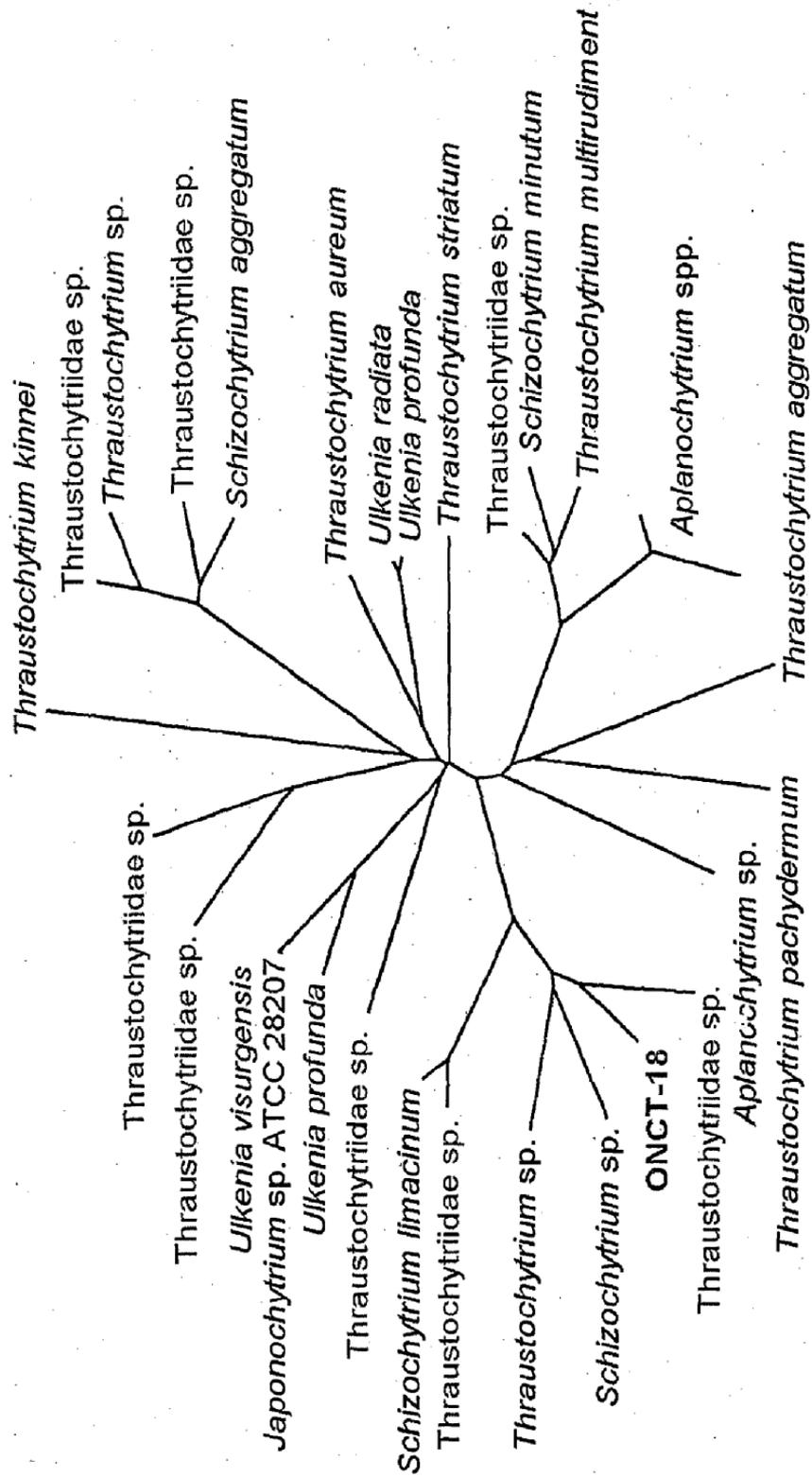


## FIGURA 5

## Fuentes microbianas de PUFA

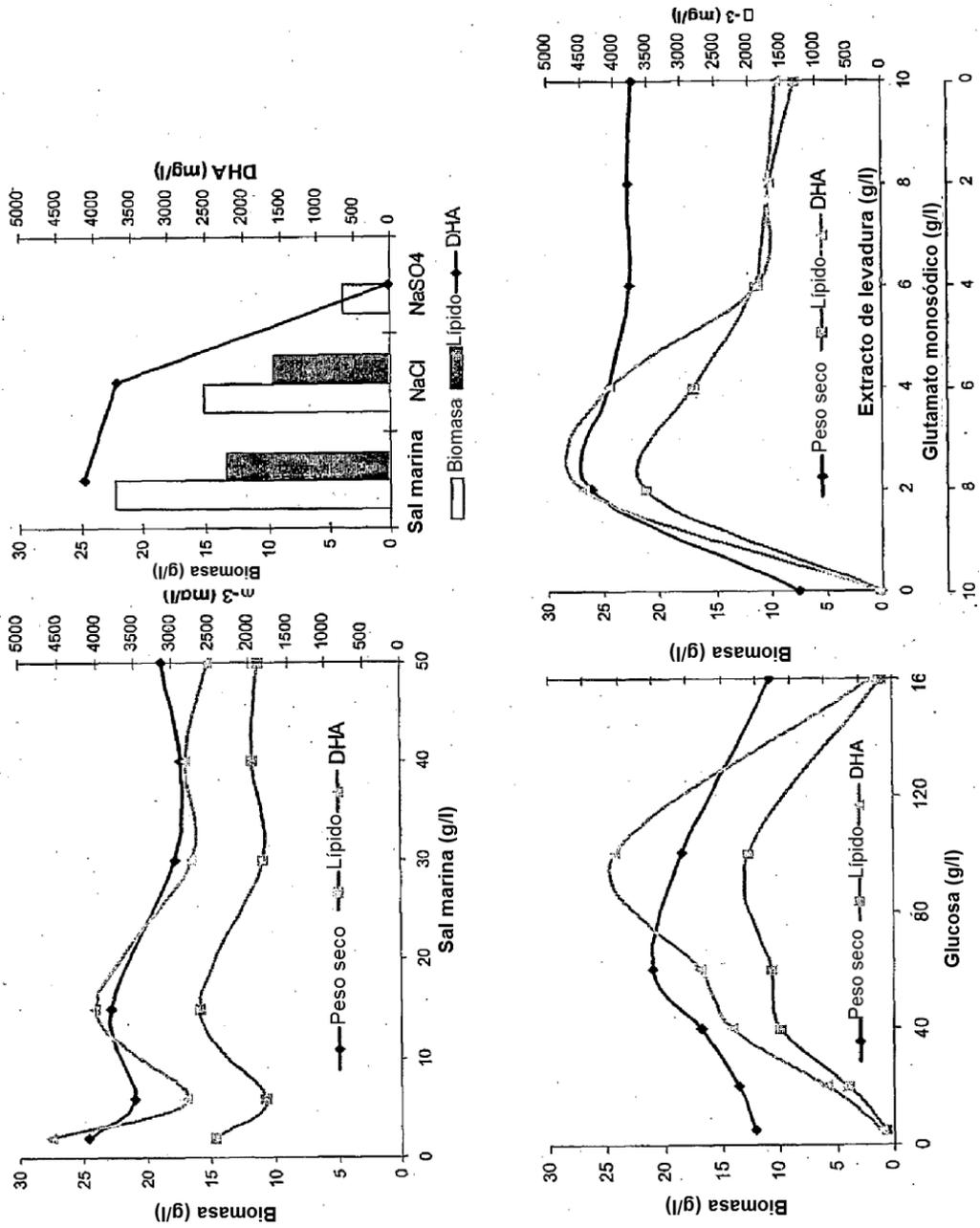
Micro-organismo	Contenido celular de PUFA (mg g <sup>-1</sup> )	Productividad de PUFA (mg l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (diatomea)	18,7 (EPA)	47,8
<i>Monodus</i> sp. (microalga)	34,4 (EPA)	25,7
<i>Mortierella alpina</i> 1S-4 (hongo)	67,0 (ARA)	118,0
<i>Shewanella</i> sp. SCRC-2738 (bacteria)	10,4 (EPA)	64,5
Thraustochytrids (protistas)	100 <sup>+</sup> (DHA)	1000

FIGURA 6

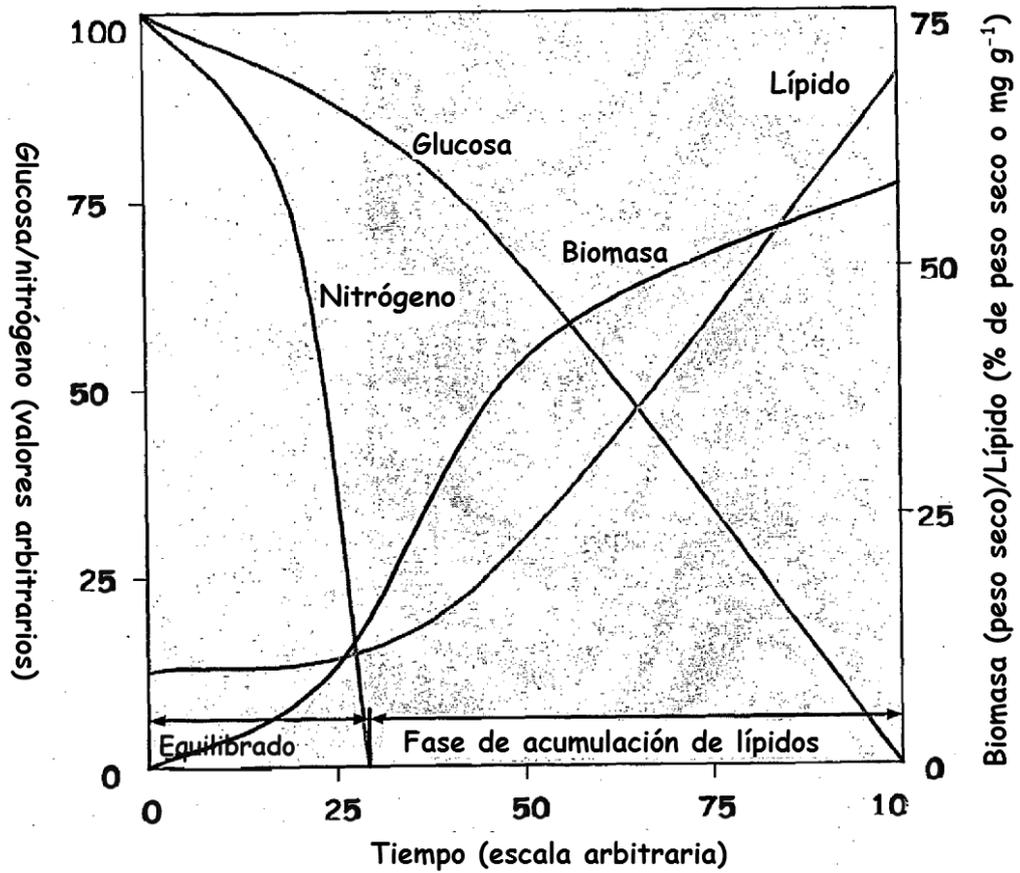


0,1

FIGURA 7



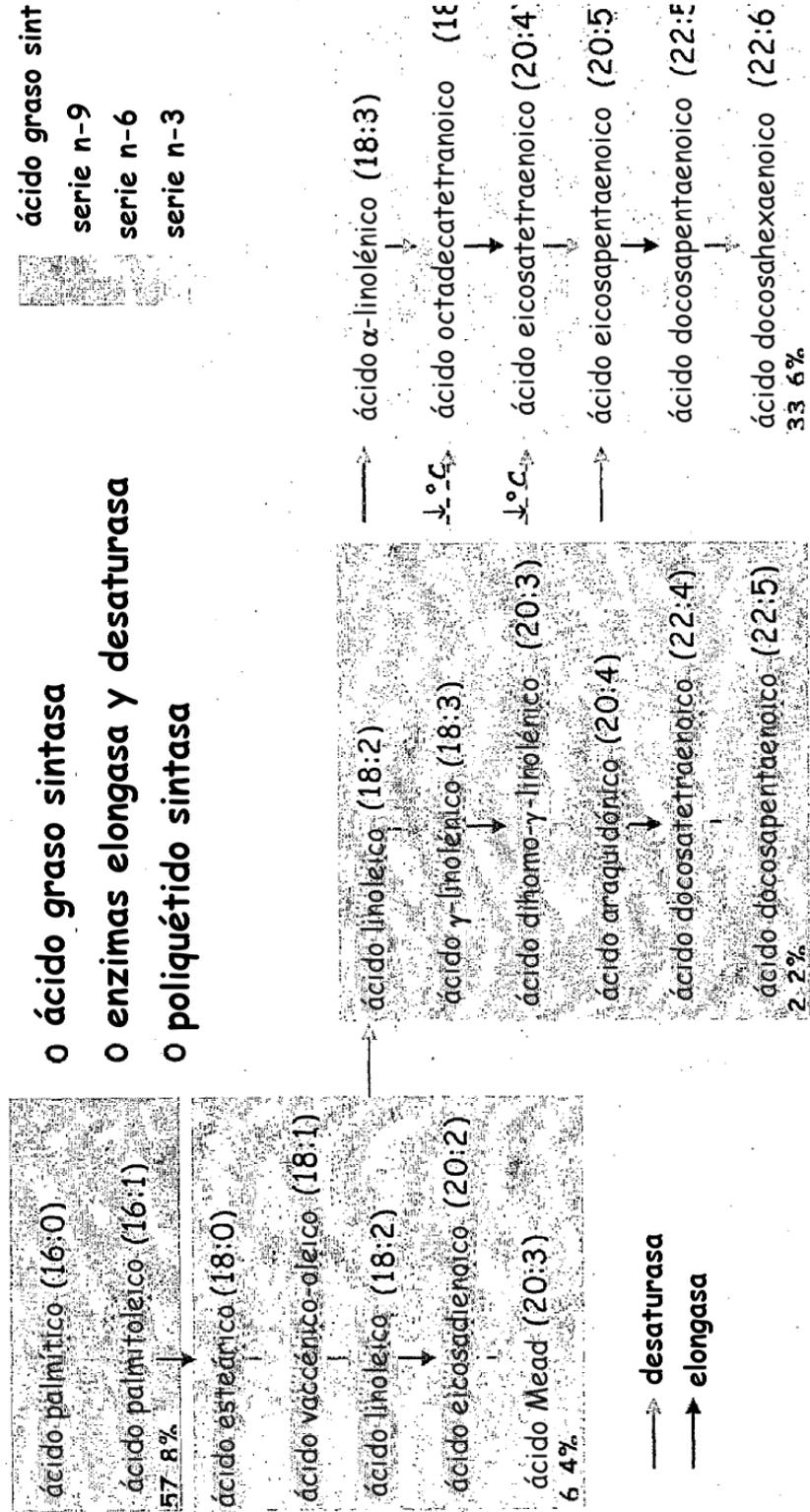
**FIGURA 8**



Modificado de Ratledge, C. (2004), *Lipid Technol.* 16:34-39.

# FIGURA 9

## Rutas metabólicas de PUFA



**FIGURA 10**

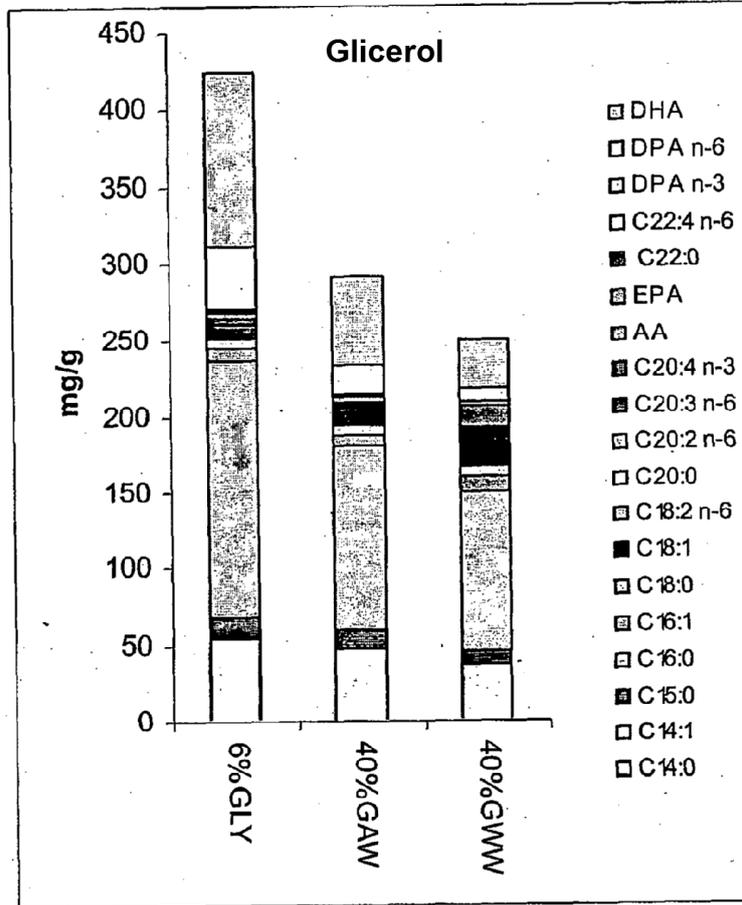
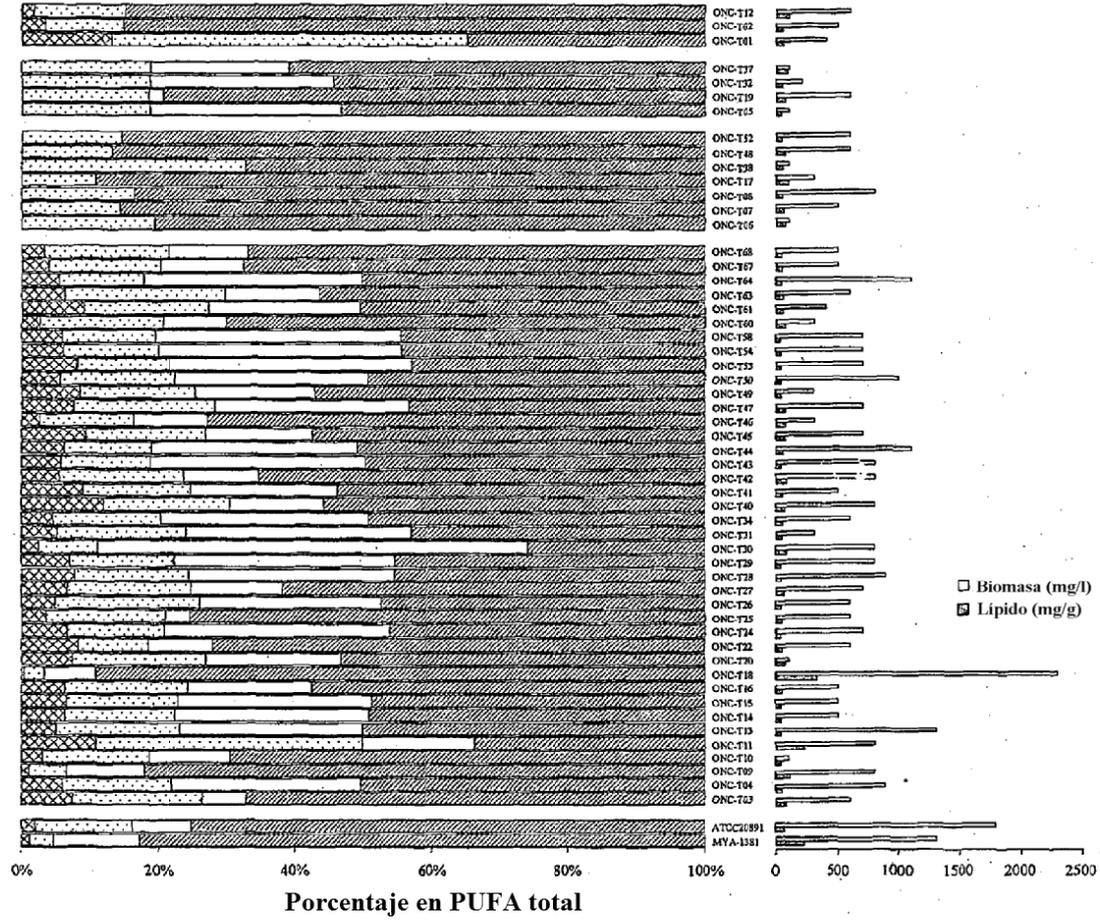


FIGURA 11

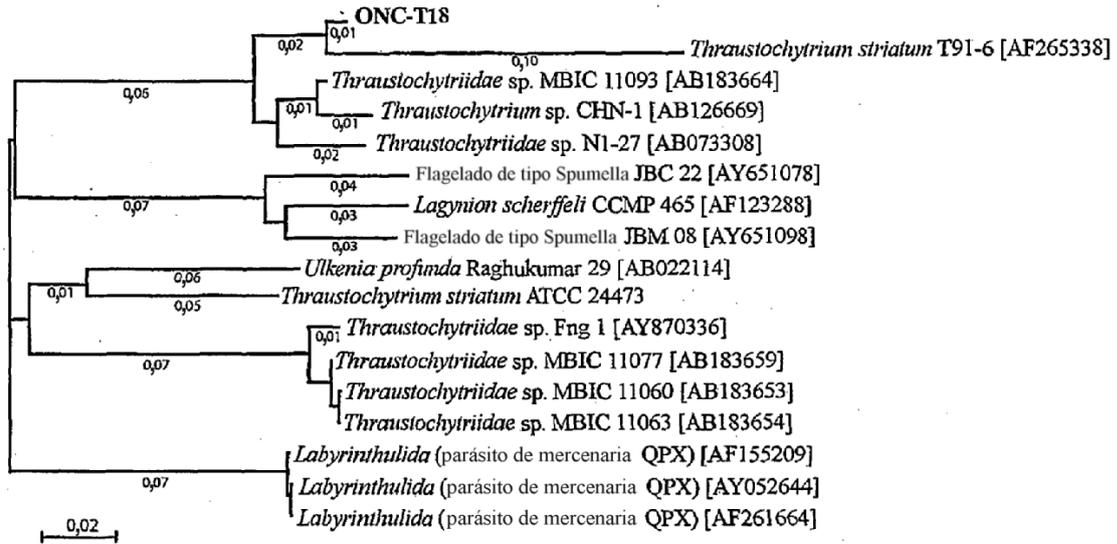


Agrupamiento de aislados recogidos basado en sus perfiles de PUFA C20 y C22. Clave:

⊗ ácido araquidónico; ⊠ ácido eicosapentaenoico; □ ácido docosapentaenoico, n-6; y

▨ ácido docosahexaenoico. Los resultados se compararon con dos cepas de referencia: ATCC 20891 y MYA-1381.

FIGURA 12



**FIGURA 13**

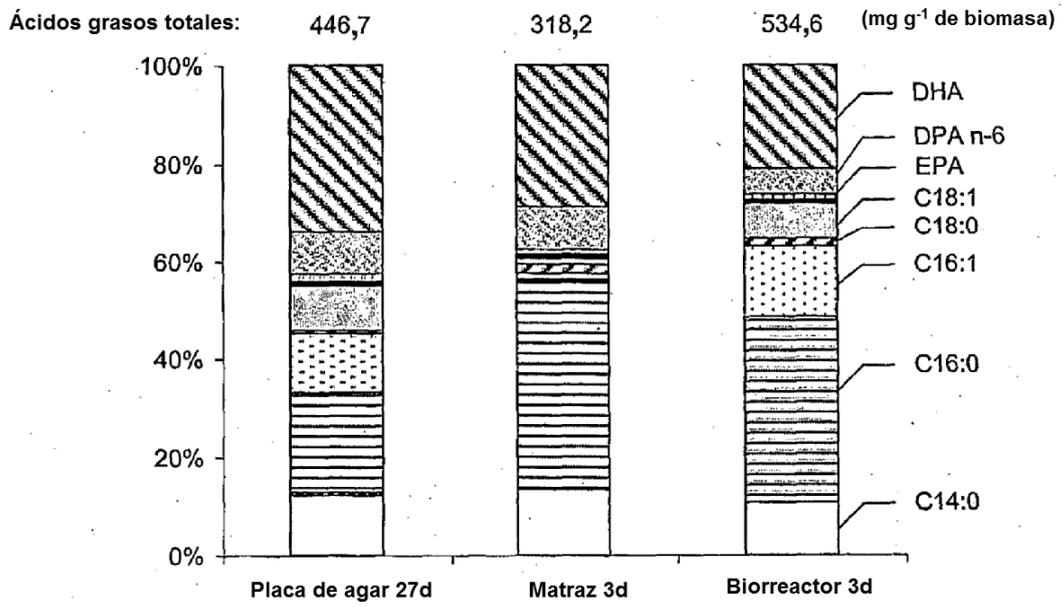
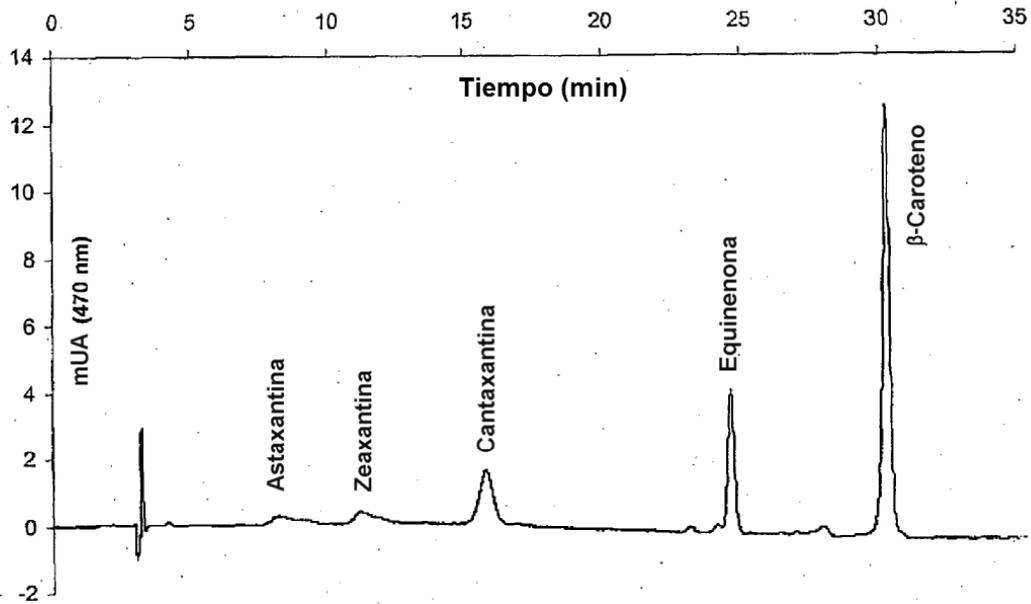
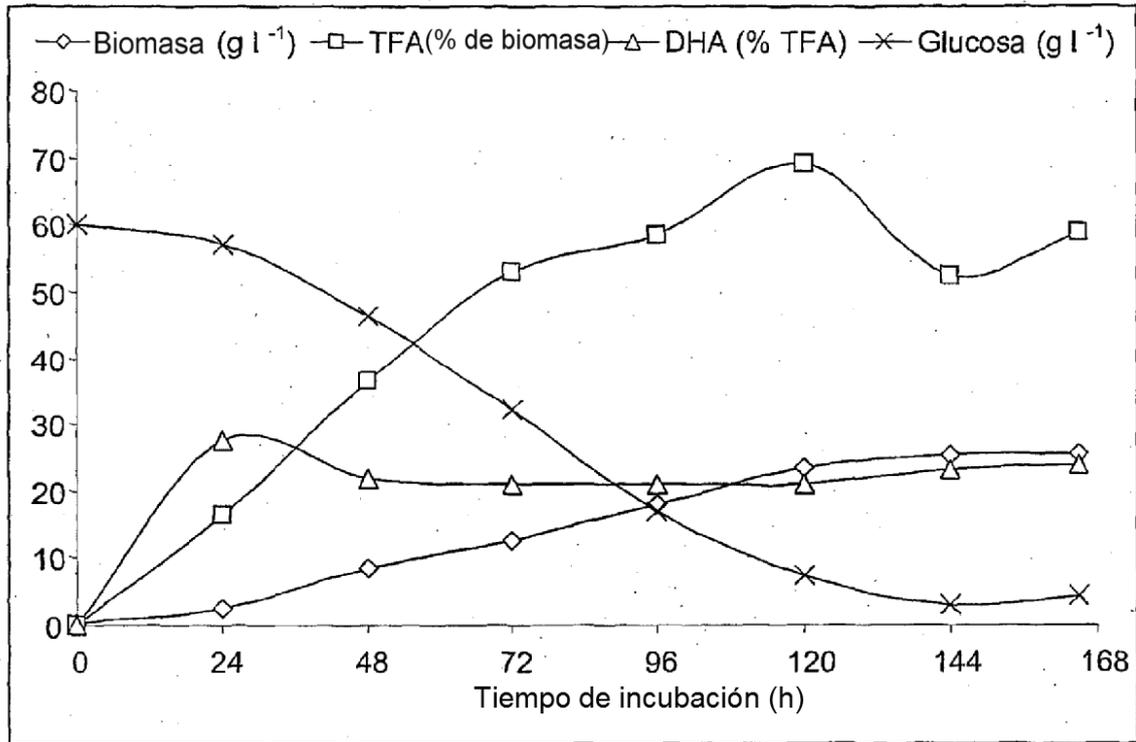


FIGURA 14



Nombre	Tiempo de retención (min)	Cantidad (µg/ml)	Carotenoide (µg/g)
Astaxantina	8,2	0,38	1,53
Zeaxantina	11,2	0,11	0,42
Cantaxantina	15,2	1,03	4,11
Equinenona	24,6	0,37	1,46
β-Caroteno	30,3	5,07	20,23

**FIGURA 15**



**FIGURA 16**

