

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 986**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/14** (2006.01)  
**A23K 10/00** (2006.01)  
**A23L 29/00** (2006.01)  
**A23L 29/269** (2006.01)  
**A23L 33/10** (2006.01)  
**A23L 33/115** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2006 E 11170447 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2447356**

54 Título: **Microorganismos eucariotas para la producción de 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:  
**12.07.2016**

73 Titular/es:

**DSM NUTRITIONAL PRODUCTS AG (100.0%)**  
**Wurmisweg 576**  
**4303 Kaiseraugst, CH**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**ES 2 576 986 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 la producción de lípidos y antioxidantes

5 **[0001]** La presente solicitud reivindica el beneficio y prioridad con respecto a la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 60/688.207, presentada el 7 de junio de 2005 y la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 60/751.401, presentada el 16 de diciembre de 2005, ambas incorporadas por referencia en el presente documento en su totalidad.

10 **1. Antecedentes**

**[0002]** 2. Hay claras pruebas científicas de que los ácidos grasos altamente insaturados (n-3), tales como el ácido docosahexaenoico (DHA), tienen un efecto positivo en enfermedades cardiocirculatorias, inflamaciones crónicas y trastornos cerebrales. Por otro lado, los ácidos grasos (n-6) se han observado como metabolitos intermedios dentro  
15 de los esteroides eicosanoides, tales como prostaglandinas, leucotrienos o similares.

**[0003]** 3. Actualmente, la fuente principal de estos ácidos grasos altamente insaturados es el pescado, habiéndose observado el DHA y el ácido eicosapentaenoico (EPA) en diversos pescados azules (tales como sardinas y atunes) en cantidades de aproximadamente 20 % y 10 %, respectivamente. Sin embargo, si se pretende utilizar aceite de  
20 pescado como la única fuente de estos lípidos, existen diversas desventajas, tales como problemas de contaminación con el 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 acumuladas. 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.

25

**II. Sumario**

**[0004]** 4. 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  
30 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 las figuras**

35 **[0005]** 5. Las figuras adjuntas que se incorporan en y constituyen una parte de la presente memoria descriptiva, ilustran diversas realizaciones y junto con la descripción ilustran las composiciones y métodos desvelados.

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

40 7. La Figura 2 representa gráficamente una comparación del 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.

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

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

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

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

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

55 13. 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), Lipid Technol. 16: 34-39).

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

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

60 16. 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.

17. 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 procedentes de GenBank utilizadas dentro de este árbol filogenético.

65 18. 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).

5 19. 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.

20. 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> al 90 %, 25 °C, pH 7-9).

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

#### IV. Descripción detallada

15 [0006] 22. Antes 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 menos que se especifique de otro modo, o a reactivos particulares a menos que se especifique de otro modo, ya que estos pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene como única finalidad describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante.

20 [0007] 23. Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar usando tan solo experimentación habitual, muchos equivalentes de las realizaciones específicas del método y composiciones descritos en el presente documento. Dichos equivalentes pretenden incluirse en las reivindicaciones posteriores.

#### A. Definiciones

30 [0008] 24. Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “uno”, “un”, “una”, “el” y “la” incluyen los referentes plurales, a no ser que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, una referencia a “un vehículo farmacéutico” incluye mezclas de dos o más de dichos vehículos y similares.

35 [0009] 25. Los intervalos pueden expresarse en el presente documento como de “aproximadamente” un valor particular y/o a “aproximadamente” otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, otra realización incluye desde un valor particular y/o al otro valor particular. Asimismo, cuando se expresan valores como aproximaciones, mediante el uso del antecedente “aproximadamente”, se entenderá que el valor particular forma otra realización. Adicionalmente 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 en el presente documento hay diversos valores desvelados, 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 entendiéndolo 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 a 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.

55 [0010] 26. 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.

60 [0011] 27. 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.

- [0012]** 28. 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.
- [0013]** 29. La expresión “terapéuticamente eficaz” significa que la cantidad de la composición que se usa es de suficiente cantidad para aliviar una o más causas o síntomas de una enfermedad o trastorno. Dicho alivio solo requiere una reducción o alteración, no necesariamente eliminación.
- [0014]** 30. El término “vehículo” significa un compuesto, composición, sustancia, o estructura que, cuando está en combinación con un compuesto o composición, ayuda o facilita la preparación, el almacenamiento, la administración, el suministro, la eficacia, la selectividad o cualquier otra característica del compuesto o composición para su uso o propósito pretendido. Por ejemplo, puede seleccionarse un vehículo para minimizar cualquier degradación del principio activo y minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto.
- [0015]** 31. A lo largo de la descripción y en reivindicaciones de esta memoria descriptiva, la palabra “comprender” y variaciones de la palabra, tal 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.
- [0016]** 32. El término “célula”, como se usa en el presente documento, también se refiere a células microbianas individuales o a cultivos procedentes de dichas células. Un “cultivo” se refiere a una composición que se comprende células aisladas del mismo tipo o uno diferente.
- [0017]** 33. El término “metabolito” se refiere a derivados activos producidos después de la introducción de un compuesto en un medio biológico, tal como un paciente.
- [0018]** 34. Cuando se usa con respecto a composiciones farmacéuticas y nutracéuticas, el término “estable” se entiende generalmente en la técnica que significa menos que una determinada cantidad, normalmente 10 %, de pérdida de principio activo en condiciones de almacenamiento específicas durante un periodo de tiempo indicado. El tiempo necesario para que una composición se considere estable es relativo al uso de cada producto y se determina en función de los aspectos prácticos comerciales de la producción de 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.
- [0019]** 35. 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.
- [0020]** 36. 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.
- [0021]** 37. “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.
- [0022]** 38. “Purificar” y cualquier 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 otra manera, 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 determinada 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 tal manera que la composición de lípidos final fuera mayor de DHA al 90 %. A menos que se indique de otra manera, la pureza se determinará con respecto a “pesos” relativos de los componentes dentro de la composición. Se entiende que, a menos que se especifique de otra manera, cualquiera de las composiciones desveladas puede purificarse como se desvela en el presente documento.

**[0023]** 39. “Opcional” u “opcionalmente” significa que el acontecimiento o circunstancia descrita posteriormente puede suceder o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho acontecimiento o circunstancia sucede y casos en los que no.

**[0024]** 40. 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 puede producirse la manipulación enzimática. Un cebador puede fabricarse a partir de cualquier combinación de nucleótidos o derivados o análogos de nucleótidos disponibles en la técnica que no interfiera con la manipulación enzimática.

**[0025]** 41. A lo largo de la presente solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones. Las divulgaciones de estas publicaciones se incorporan por referencia en su totalidad en esta solicitud para describir más completamente el estado de la técnica a la cual pertenecen. Las referencias desveladas también se incorporan individual y específicamente por referencia en el presente documento para el material contenido en las mismas que se analiza en la oración en la que está basada la referencia.

**[0026]** 42. Se desvelan los componentes que se usan para preparar las composiciones desveladas así como las propias composiciones a utilizar 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, aunque puede no desvelarse de forma explícita una referencia específica de 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

**[0027]** 43. Se desvelan microorganismos eucariotas del orden *Thraustochytriales*, preferentemente especies de *Thraustochytrium* o *Schizochytrium*, que pueden 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, tal como la serie (n-3) de ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), serie 8n-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, cantaxina y equinenona.

**[0028]** 44. También se desvelan condiciones para el aislamiento y cultivo de los microorganismos eucariotas. Por ejemplo, en el presente documento, se dan condiciones de crecimiento heterótrofas para la producción de los lípidos y antioxidantes desvelados, por ejemplo, tanto de manera individual como acumulativa. En consecuencia, mediante el uso de este eucariota único, es posible 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.

**[0029]** 45. Se desvelan composiciones que comprende 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.

5 **[0030]** 46. Se entiende que también se desvela el microorganismo eucariota y cualquier clon, organismo modificado o gen aislado de dicho organismo como se expone en ONC-T18. 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.

10 **[0031]** 47. También se desvelan procesos para la producción de biomasa que contiene dichos compuestos. Adicionalmente se desvelan procesos para la preparación de omega-3, omega-6 y compuestos carotenoides utilizando el microorganismo eucariota. También se desvelan procesos para la producción de aceites derivados de microbios (o de organismos unicelulares).

15 **[0032]** 48. Además, se desvelan 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.

20 **[0033]** 49. La patente de Estados Unidos N° 5.130.242 de Barclay desveló un proceso de recogida y exploración para aislar cepas de microorganismos con las siguientes características para la producción de ácidos grasos omega-3: 1) poder crecer en condiciones heterótrofas; 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) .

25 **[0034]** 50. La divulgación '242 también describe un proceso para la producción heterótrofa de productos microbianos extraídos o de células completas con una alta concentración de ácidos grasos omega-3, que después pueden usarse alimentarios animales o humanos. Este proceso usa microorganismos identificados por el proceso de recogida y exploración desvelado en el mismo. Estos microorganismos, que son del orden Thraustochytriales, 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.

30 **[0035]** 51. 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 produce tamaños de agregados celulares de menos de 150 μm. El 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).

45 **[0036]** 52. La Patente de Estados Unidos n.º 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-3 y una baja concentración de EPA. Además, se desvelan métodos de cultivo de dichos microorganismos y aislamiento de 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).

60 **[0037]** 53. 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 ion 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 de lípidos de DHA es del 15 al 20 % en peso de biomasa (aproximadamente 35 % en peso de metil éster de ácidos grasos total).

[0038] 54. 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. Antes del aislamiento de DHA, el aceite puede tratarse con una lipasa. El aceite puede usarse en alimentos o bebidas o el DHA puede hidrolizarse para producir ácido behénico.

## 10 1. Ácidos Grasos

[0039] 55. 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 enlaces de este tipo. 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 cardiocirculatorias, 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.

[0040] 56. 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.

[0041] 57. En la actualidad, la principal fuente de estos ácidos grasos altamente insaturados es el pescado, observándose DHA y 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 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 dichas 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.

[0042] 58. Además de aceites de pescado, diversos microorganismos (principalmente marinos) pueden 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 de alimento. Por ejemplo, se sabe que los siguientes microorganismos pueden producir DHA: la bacteria *Vibrio marinus* (ATCC 15381) procedente de mares profundos, *Vibrio sp.*T3615, *Photobacterium profundum* SS9, *Mortierella marina* MP-1 y *Psychromonas kaikoe* (ATCC BAA-363T); especies de microalgas, tales como, *Cryptocodinium cohmi*, *Cyclotella cryptica*, y *Mortierella alpina* (IS-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 productores de aceite representativos.

[0043] 59. 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 obtener 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), cardioprotector, 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 Psychiatr y 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

[0044] 60. 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, ONC-T18 se aisló de las hojas de hierbas de marisma en Advocate Harbor, Bahía de Fundy, Nueva Escocia, Canadá. A través de exámenes microscópicos y de 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 por CG (metil ésteres de ácidos grasos, FAME, por *fatty acid methyl esters*).

**[0045]** 61. La Figura 6 muestra un árbol filogenético propuesto de la relación entre ONC-T18, y otros organismos estrechamente relacionados.

**[0046]** 62. ONC-T18 se aisló originalmente como un único microbio usando técnicas clásicas de cebadura de polen de pino, 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.

**[0047]** 63. 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 las del microorganismo eucariota, como se desvela en el presente documento.

**[0048]** 64. 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 variantes y recombinantes diseñadas para producir estos ácidos grasos poliinsaturados a un mayor grado. Dichos microorganismos variantes 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.

**[0049]** 65. 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.

**[0050]** 66. Se desvelan composiciones que comprenden un eucariota, en las que la composición produce un lípido.

**[0051]** 67. También se desvelan composiciones en las que el lípido comprende un lípido como se desvela en el presente documento.

**[0052]** 68. También se desvelan composiciones, en las que el eucariota comprende un miembro del orden *Thraustochytriales*.

**[0053]** 69. 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 NO: 1.

**[0054]** 70. 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, por ejemplo, uno o más conjuntos de organismos o aceites o antioxidantes. 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**

[0055] 71. 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 procariontes. 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*.

[0056] 72. 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.

**c) Genética**

[0057] 73. 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.

[0058] 74. La similitud/identidad de secuencia e hibridación 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 traustocitrinos eucariotas, estrechamente relacionadas con *Thraustochytrium sp.* CHN-1 [AB126669] (94, 5 % de similitud) y *Thraustochytridae 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**

[0059] 75. 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 habitualmente 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.

[0060] 76. En general, se entiende que un modo de definir cualquier variante y derivado conocidos o los que puedan surgir, de los genes y proteínas del 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.

[0061] 77. 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 Pearson 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, 57=5 Science Dr.,

Madison, WI) o mediante inspección.

**[0062]** 78. Para los ácidos nucleicos pueden obtenerse los mismos tipos de homología, por ejemplo, mediante los algoritmos desvelados en Zuker, M. Science 244:48-52, 1989, en Jaeger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7706-7710, 1989 y en Jaeger et al. Methods Enzymol. 183:281-306, 1989 que se incorporan en el presente documento por referencia para al menos material relacionado con el alineamiento de ácidos nucleicos. 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.

**[0063]** 79. 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 calculada mediante uno cualquiera o más de los métodos de cálculo descritos anteriormente. Por ejemplo, una primera secuencia tiene un porcentaje de 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 calculada mediante 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 calculada mediante 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).

### 30 (2) Hibridación/hibridación selectiva

**[0064]** 80. 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.

**[0065]** 81. 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  $T_f$  (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  $T_f$ . 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 que se desea, 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 sabe en la técnica.

65 **[0066]** 82. Otro modo de definir la hibridación selectiva es estudiando 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, el cebador no limitante está, 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 por encima de su  $k_d$  o en las que una o ambas moléculas de ácido nucleico están por encima de su  $k_d$ .
- 10 **[0067]** 83. Otro modo de definir la hibridación selectiva es estudiando el porcentaje de cebador que se consigue manipular 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
- 15 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.
- 20 **[0068]** 84. 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
- 25 métodos. Por ejemplo, si se requiere una hibridación del 80 % y siempre que la hibridación se produzca dentro de los parámetros requeridos en uno cualquiera de estos métodos, se considera desvelado en el presente documento.
- [0069]** 85. 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 bien en su conjunto o individualmente, es una
- 30 composición o método que se desvela en el presente documento.

#### d) Composición de moléculas producidas

- [0070]** 86. Se entiende que los eucariotas desvelados en el presente documento tienen la capacidad de producir
- 35 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 mediante el perfil lipídico que produce el organismo. 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.
- 40 **(1) Lípidos**
- [0071]** 87. 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. Mas adelante hay algunos ejemplos de perfiles de lípidos insaturados y otros de los organismos.
- 45 **[0072]** 88. El microorganismo eucariota puede producir, por ejemplo, un lípido o fracción de ácidos grasos de al menos aproximadamente 4 % en peso a 6 % en peso (por ejemplo, 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
- 50 ejemplo, aproximadamente 18 % en peso) de ácido palmítico, de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 2 % en peso (por ejemplo, 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
- 55 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.
- [0073]** 89. El microorganismo eucariota también puede producir, por ejemplo, un lípido o fracción de ácidos grasos de al menos aproximadamente 1 % en peso a 3 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 1,25 % en peso), que
- 60 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
- 65 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.

5 **[0074]** 90. 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  
10 %, 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).

**[0075]** 91. 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, sin embargo la manipulación puede producir una mejor relación de DHA o DPA con respecto a EPA y otros PUFA deseados, lo que puede ser deseable desde un punto de vista de la purificación. En el presente documento se  
15 analizan diversas condiciones.

**[0076]** 92. La Figura 10 muestra una ruta metabólica posible para los diversos PUFA producidos por el microorganismo eucariota desvelado, coherente con el rastreo de metabolitos de metil éster de ácidos grasos. Las proteínas que pueden identificarse dentro de las rutas que se desvelan en el presente documento son la poli- $\beta$ -hidroxialdehído sintasa, usando, por ejemplo, un estudio con cebador degenerativo, (Metz et al. (2001) Science 293: 290-3 y Kaulmann y Hertweck (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41: 1866-9). También pueden identificarse elongasas y desaturasas, usando, por ejemplo, un estudio con sonda de hibridación. También pueden identificarse ácido graso sintasas, usando, por ejemplo, un estudio con sonda de hibridación y/o con cebador degenerativo.  
25

#### 30 4. Crecimiento y cultivo

**[0077]** 93. Se realizó un estudio fenotípico en microplacas que incluía carbono; nitrógeno (nitrógeno peptídico); fósforo y azufre; osmolitos y pH.

35 **[0078]** 94. 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, 20:247254).

**[0079]** 95. Si se aumenta la agitación o el  $dO_2$ , se aumenta la producción de biomasa y de TFA pero se reduce el DHA. Si se reduce la agitación o el  $dO_2$ , se reduce la biomasa celular (g) y se reduce el TFA pero aumenta el DHA pero también se reduce C16:0, C16:1 y C18:1.  
40

**[0080]** 96. Si se aumenta la temperatura, se aumenta la producción de biomasa y de TFA, pero se reduce el DHA. Si se reduce la temperatura, se reduce la biomasa celular (g) y se reduce el TFA, pero aumenta el DHA, pero se  
45 reduce C16:0, C16:1 y C18:1.

**[0081]** 97. Puede obtenerse biomasa celular procedente del microorganismo eucariota desvelado inoculando un medio de agua marina artificial o natural adecuado, 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, hidratos de carbono 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 (procedente de agua de macerado de maíz), ácido galacturónico (procedente de pectina), L-fucosa (procedente de galactosa), gentiobiosa, glucosamina,  $\alpha$ -D-glucosa-1-fosfato (procedente de glucosa), celobiosa (procedente de celulosa) dextrina  
50 (procedente de maíz), y  $\alpha$ -ciclodextrina (procedente 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, aunque sin limitarse a las mismas. Adicionalmente, si fuera  
55 necesario, como nutrientes traza podrían usarse fosfatos, tales como fosfato de potasio y fosfato de sodio, sales inorgánicas tales como, sulfato de amonio, bicarbonato de sodio, ortovanato de sodio, cromato de potasio, molibdato de sodio, ácido selenioso, sulfato de níquel, sulfato de cobre, sulfato de cinc, cloruro de cobalto, cloruro de hierro, cloruro de manganeso y cloruro de calcio, junto con el compuesto quelante, ácido etilendiaminatetraacético, solo o junto con vitaminas tales como clorhidrato de pirodoxina, clorhidrato de tiamina, pantotenato de calcio, ácido p-aminobenzoico, riboflavina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico y vitamina B12. Después de preparar el medio, el  
60

pH se ajusta a entre 3,0 y 10,0 usando ácido o base para ajustar cuando sea apropiado, por ejemplo, entre pH 4,0 y 6,5, y el medio se esteriliza, por ejemplo, con 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 a 30 °C, preferentemente 18 a 28 °C, por cultivo de agitación con oxigenación, cultivo con agitación, cultivo estacionario, cultivo discontinuo (en lotes), cultivo continuo, cultivo discontinuo rotatorio o cultivo en oleadas, o similares.

**[0082]** 98. 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 un artículo de consumo. 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 lípidos, proporciones o la cantidad de DHA, DPA y EPA acumulada, como se desvela en el presente documento

**[0083]** 99. Para una 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 60g 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 heterótrofa. 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.

**[0084]** 100. Realizando fermentación heterótrofa, 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 80 %. El cultivo en las condiciones anteriores puede realizarse usando un fermentador de agitación convencional. También es posible usar un fermentador de columna de burbujas (cultivos discontinuos o continuos), o un fermentador en oleadas.

**[0085]** 101. La recogida de la 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 de sodio, cloruro de calcio o poliacridamida).

## 5. Aislamiento de lípidos

**[0086]** 102. 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.

**[0087]** 103. La grasa que contiene la serie (n-3) de DHA y la serie (n-6) de DPA puede obtenerse degradando o alterando la biomasa celular recogida, por ejemplo, mediante molienda, ultrasonido y después realizando la extracción con un disolvente tal como cloroformo, hexano, metanol, etanol o mediante medios de extracción con 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 de mayor 0,6 g.

**[0088]** 104. Los microorganismos eucariotas desvelados tales como ONC-T18; pueden producir lípidos obtenidos

de este modo, cualquiera de sus variantes y cualquier asociación entre miembros de la misma especie de microorganismos eucariotas por lo cual 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 CG mostrados en la Figura 1).

**[0089]** 105. Los microorganismos eucariotas desvelados tal como ONC-T18, pueden producir lípidos obtenidos de este modo, cualquiera de sus variantes y cualquiera asociación entre miembros de la misma especie de microorganismos eucariota por lo cual 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 15 % 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 y ácido fosfatídico tanto unido como no unido a lípidos neutros.

**[0090]** 106. 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

**[0091]** 107. 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 g l<sup>-1</sup> de medio. El microorganismo eucariota puede producir una composición de lípidos que comprende DHA n-3, EPA y DPA n-6 a más que o igual a aproximadamente 20,0 g l<sup>-1</sup> 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 g l<sup>-1</sup> de medio. El microorganismo eucariota puede producir de aproximadamente 1,5 g l<sup>-1</sup> a aproximadamente 5,0 g l<sup>-1</sup> (por ejemplo, de aproximadamente 4,6 g l<sup>-1</sup>) del DHA n-3, de aproximadamente 0,5 g l<sup>-1</sup> a aproximadamente 1,5 g l<sup>-1</sup> (por ejemplo, aproximadamente 0,22 g l<sup>-1</sup>) 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. Adicionalmente, el microorganismo eucariota puede producir una fracción de lípidos que comprende ácidos mirístico, miristoleico, pentadecanoico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, eicosadienoico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexanoico y decosapentaenoico 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, mg l<sup>-1</sup>), de 0,5 a 0,65 de 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>), de 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 decosapentaenoico (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 a 790 mg g (igual a de 7.700 a 20.209 mg l<sup>-1</sup>).

### (2) Otras moléculas

**[0092]** 108. Adicionalmente, el microorganismo eucariota puede producir carotenoides y xantófilos. Los ejemplos de dichos carotenoides y xantófilos incluyen beta-caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, fenicoxantina, zeaxantina, equinonona, beta-criptoxantina, capsantina, lutina, achiote, beta-apo-8-carotenal y beta-apo-8-carotenal-éster.

**[0093]** 109. Los xantófilos producidos por los microorganismos eucariotas desvelados pueden conjugarse con los diversos PUFA también producidos por los microorganismos eucariotas desvelados.

#### (a) Antioxidantes

**[0094]** 110. Generalmente, los antioxidantes son compuestos que reaccionan con, y normalmente se consumen por oxígeno. Dado 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" by Richard A. Passwater, Ph. D., 1985, Keats Publishing Inc., que se incorpora en el presente documento por referencia al menos para material relacionado con antioxidantes.) 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 alfatocoferol, etc., succinato de vitamina E y trolox (un análogo de Vitamina E soluble) Vitamina C (ácido ascórbico) y Niacina (Vitamina B3, ácido nicotínico y nicotinamida), Vitamina A, ácido 13-cis retinoico, N-acetil-L-cisteína (NAC), ascorbato de sodio, pirrolidin-editio-carbamato y coenzima Q10; enzima que cataliza la destrucción de radicales libres incluyendo peroxidasas tales como glutatión peroxidasa (GSHPX) que actúa sobre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tales como peróxidos orgánicos, incluyendo catalasa (CAT) que actúan sobre 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 (G6PD), 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.º de Serie 5.171.680 que se incorpora en el presente documento por referencia para material al menos relacionado con antioxidantes y enzimas antioxidantes); glutatión; ceruloplasmina; cisteína, y cisteamina (beta-mercaptoetilamina) y flavonoides y moléculas de tipo flavonoide como ácido fólico y folato. Una revisión de enzimas antioxidantes y miméticos de las mismas y nutrientes antioxidantes puede encontrarse en Kumar et al., Pharmac. Ther. 39: 301, 1988 y Machlin L. J. y Bendich, FASEB Journal 1: 441-445, 1987 que se incorpora en el presente documento por referencia para material relacionado con antioxidantes.

15 **[0095]** 111. Los flavonoides, también conocidos como “fenilcromonas”, son compuestos de origen natural, solubles en agua, que tienen características antioxidantes. Los flavonoides están muy distribuidos en las 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), kemferol (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).

25 **[0096]** 112. 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, achiote, beta-apo-8carotenal 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 impide que se dañen otras moléculas o tejidos.

35 **[0097]** 113. Las funciones metabólicas necesitan oxígeno, pero este 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 este estrés oxidativo 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.

45 **[0098]** 114. 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 la 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

55 **[0099]** 115. 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 heterótrofo 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 heterótrofo puede ser como se describe más adelante.

#### 6. Lípidos y otras moléculas producidas por el microorganismo eucariota

65 **[0100]** 116. Se describen composiciones lipídicas que comprenden de aproximadamente 25 % en peso a

aproximadamente 40 % en peso de DHA n-3, de aproximadamente el 6 % en peso a aproximadamente el 10 % en peso de DPA n-6 y de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 3 % en peso de EPA n-3.

5 [0101] 117. La composición lipídica puede comprender adicionalmente de aproximadamente 11 % en peso a aproximadamente 15 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 13 % en peso) de ácido mirístico, de ácido 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 10 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.

15 [0102] 118. La composición lipídica puede comprender DHA n-3 en concentraciones que superan aproximadamente 400 mg de biomasa, DPA n-6 en concentración que supera 100 mg de biomasa.

20 [0103] 119. La composición lipídica puede comprender adicionalmente carotenoides. Los ejemplos de dichos carotenoides incluyen beta-caroteno, licopeno, astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenona, fenicoxantina, capsantina, luteína, achiote, beta-apo-8-carotenal y beta-apo-8-carotenal-éster.

[0104] 120. En un aspecto, la composición puede comprender al menos aproximadamente 24 % en peso de DHA n-3, aproximadamente 1 % en peso de DPA, aproximadamente 6 % de DPA n-6 y aproximadamente 1 % en peso de EPA n-3.

## 25 7. Composiciones que contienen las moléculas producidas por el microorganismo eucariota

[0105] 121. Un alimento, complemento, composición farmacéutica tanto para seres humanos como para animales (incluyendo marinos) puede comprender la composición (lípidos, lípidos con antioxidante y solo antioxidante).

30 [0106] 122. También se desvela una fórmula infantil que comprende la composición (lípidos, lípidos con antioxidante y solo antioxidante).

### C. Métodos

#### 35 1. Métodos para preparar lípidos

[0107] 123. 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.

40 [0108] 124. Pueden emplearse diversos procedimientos en la recuperación de la biomasa celular resultante de la fermentación en diversos medios de cultivo, tales como mediante filtración o centrifugación. Las células pueden después lavarse, congelarse, liofilizarse o secarse por pulverización y conservarse en una atmósfera no oxidante para eliminar la presencia de oxígeno, antes de la incorporación en un alimento o producto alimentario procesado.

45 [0109] 125. 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 a presión negativa para producir una muestra de material lipídico concentrado. Los PUFA omega-3 y omega-6 pueden 50 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 55 refinamiento químico o físico). Estos procedimientos de refinamiento retiran impurezas de aceites extraídos antes de usarse o comercializarse 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 indica posteriormente y después usarse en las aplicaciones anteriores y también en aplicaciones farmacéuticas.

60 [0110] 126. En otro proceso para la producción de aceites omega-3 u omega-6 enriquecidos (concentrados), la biomasa celular recogida (fresca o seca) pueden alterarse o permeabilizarse mediante técnicas bien conocidas tales como ultrasonido, métodos de alteración 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 65 usando 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 en ácidos grasos libres o ésteres de ácidos grasos que incluyen 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 por adición de un ácido, y el ácido graso libre se extrae 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 la cristalización de los compuestos no 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.

**[0111]** 127. Además, se desvela una composición lipídica preparada mediante el método descrito anteriormente.

**[0112]** 128. Los microorganismos de la familia *Thraustochytriaceae* pueden ser cualquiera de los microorganismos desvelados anteriormente.

#### a) Medio

**[0113]** 129. El medio heterótrofo 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 para una fermentación más rentable) se encuentra dentro del intervalo de 5 g l<sup>-1</sup> a 0 g l<sup>-1</sup> y de 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 se encuentra en el 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 desarrolla 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 y ácidos nucleicos importantes. El resultado es que esos 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.

**[0114]** 130. La fuente de nitrógeno puede ser una o más de peptona, extracto de levadura, extracto de malta, glutamato sódico. La fuente de nitrógeno también puede ser agua de macerado de maíz o extracto de semilla de algodón. La fuente de 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>.

**[0115]** 131. 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-O-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>.

**[0116]** 132. 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.

**[0117]** 133. 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 selenioso, 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 B12). El medio puede estar a un pH de aproximadamente 4, 0 a aproximadamente 6,

**[0118]** 134. La incubación puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 9 días (por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 días). La incubación puede ser de aproximadamente 18 a aproximadamente 30 °C (por ejemplo, de aproximadamente 18 a 25 °C). La incubación puede comprender además agitación u oxigenación aireación.

5

**[0119]** 135. 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, etanol o CO<sub>2</sub> supercrítico.

10 **[0120]** 136. El método puede producir cualquiera de las composiciones como se han desvelado anteriormente.

**[0121]** 137. 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.

15

## 2. Métodos de exploración e identificación

20 **[0122]** 138. 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 exploración. Pueden colocarse (y se colocaron) muestras vegetativas en viales de 20 ml que contienen 10 ml de agua marina natural  
25 estéril, filtrada en 0,2 µm, que contenía penicilina y estreptomycinina a 300 y 500 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente. Los viales se cebaron después con granos de polen estériles y se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 18 a 25 °C. Los granos de polen se transfirieron después a placas de agar que contenían antibióticos (como  
30 anteriormente) y se incubaron en las mismas condiciones. Se seleccionaron colonias hialinas, irregulares, individuales, compuestas de células esféricas y limaciformes y atípicas de colonias de levadura o bacterianas y se subcultivaron en el mismo medio y en las mismas condiciones que anteriormente. Estos aislados se exploraron  
35 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 de 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.

**[0123]** 139. 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 heterótrofo e incubar; e identificar aislados que producen ácidos grasos.

40

**[0124]** 140. También se desvelan composiciones lipídicas producidas por los microorganismos eucariotas anteriormente identificados.

**[0125]** 141. También se desvelan composiciones lipídicas producidas por los métodos usando los microorganismos eucariotas desvelados y los métodos desvelados en el presente documento.

45

**[0126]** 142. También se desvelan microorganismos eucariotas (ONC-T18) que tienen el número de referencia de la colección americana de cultivos tipo PTA-6245.

50 **[0127]** 143. También se desvelan microorganismos eucariotas que pertenecen al orden *Thraustochytriales* (ONC-T18) que tienen ARNr 18S, tal como SEQ ID 1, e identificados como *Thraustochytrium* sp.

**[0128]** 144. También se desvela un microorganismo eucariota, *Thraustochytrium* sp. que puede producir DHA y DPA en concentraciones de más de 400 mg l<sup>-1</sup> y 100 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente.

55

**[0129]** 145. También se desvela un microorganismo eucariota, *Thraustochytrium* sp. que puede producir carotenoides mediante fermentación heterótrofa como se ha mencionado anteriormente en el intervalo de 50 a 1250 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>, de 0,25 a 10 mg kg<sup>-1</sup>, de 1 a 20 mg kg<sup>-1</sup> y de 1 a 200 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

60

**[0130]** 146. 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 l<sup>-1</sup> respectivamente; y carbono en  
65 forma de glucosa hasta 130 g l<sup>-1</sup>.

[0131] 147. 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.

[0132] 148. 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 del 1 al 2 % y al menos el 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

10

[0133] 149. En el presente documento hay diversas moléculas desveladas 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, por nucleótidos, análogos de nucleótidos o sustitutos de nucleótidos. En el presente documento se analizan ejemplos no limitantes de estas y otras moléculas. Se entiende que, por ejemplo, cuando se expresa un vector en una célula, el ARNm expresado normalmente estará compuesto por A, C, G, y U/T. Asimismo, se entiende que, si por ejemplo una molécula antisentido se introduce en una célula o entorno 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 entorno celular.

20

#### a) Nucleótidos y moléculas relacionadas

[0134] 150. 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 internucleosídico. 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 timidin-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'-adenosín monofosfato) o 5'-GMP (5'-guanósín monofosfato).

[0135] 151. 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-metil-citosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina y 2-aminoadenina así como modificaciones en los restos de azúcares o fosfato.

[0136] 152. Los sustitutos de nucleótidos son moléculas que tienen propiedades funcionales similares a las de los nucleótidos, pero que no contienen un resto de fosfato, tales como ácido péptidonucleico (PNA, *peptide nucleic acid*). 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 pueden conformarse en una estructura de tipo doble hélice cuando interactúan con el ácido nucleico diana apropiado.

[0137] 153. 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 a 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).

[0138] 154. 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 nucleótido o sustituto de nucleótido incluye las posiciones C2, N1 y C6 de un nucleótido, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido basado en purina y las posiciones C2, N3, C4 de un nucleótido, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido basado en pirimidina.

[0139] 155. 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 del 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

[0140] 156. Hay diversas secuencias relacionadas, por ejemplo, con SEQ ID NO: 1, así como cualquier otro ácido nucleico y proteína desvelados en el presente documento, que pueden encontrarse 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.

[0141] 157. En el presente documento se proporcionan diversas secuencias y estas y otras pueden encontrarse en Genbank, en [www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov). Los expertos en la materia saben 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.

#### 5 c) Cebadores y sondas

[0142] 158. Se desvelan composiciones que incluyen cebadores y sondas, que pueden interactuar con los genes desvelados en el presente documento. En ciertas realizaciones, los cebadores se usan para dar soporte a las reacciones de amplificación de ADN. Normalmente los cebadores podrán 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 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 que fuesen específicos del microorganismo eucariota, realizando posteriormente reacciones de PCR. La presencia de especies diana se determinaría después mediante la formación de producto por PCR con éxito. 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 reaccionarán químicamente con 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

[0143] 159. 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 entendería bien un experto habitual en la materia. El vector puede ser una preparación disponible en el comercio, 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 comercio 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 en Genetronics, Inc. (San Diego, CA) así como por medio de un aparato de sonoporación (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, AZ).

[0144] 160. 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. U.S.A. 85: 4486, 1988; Miller *et al.*, Mol. Cell. Biol. 6: 2895, 1986). El retrovirus recombinante puede usarse después para infectar y de este modo suministrar a las células infectadas ácido nucleico que codifica un anticuerpo (o fragmento activo del mismo) ampliamente neutralizador. El método exacto para introducir el ácido nucleico alterado en células de mamífero, no está, por supuesto, 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 adenoasociados (AAV) (Goodman *et al.*, Blood 84: 1492-1500, 1994), vectores lentivirales (Naidini *et al.*, Science 272: 263-267, 1996), vectores retrovirales pseudotipificados (Agrawal *et al.*, Exper. Hematol. 24: 738-747, 1996). También pueden usarse técnicas de transducción física, tales como suministro con liposomas y mecanismos mediados por receptores y otros por endocitosis (véase, por ejemplo, Schwartzenberger *et al.*, Blood 87: 472-478, 1996). Las composiciones y métodos desvelados pueden usarse junto con cualquiera de estos u otros métodos de transferencia de genes.

#### 4. Sistemas de expresión

[0145] 161. Los ácidos nucleicos que se suministran a las células normalmente contienen sistemas de control de 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.

**[0146]** 162. 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 más adelante. 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 exclusivas.

#### a) Promotores y potenciadores virales

**[0147]** 163. 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 la 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 (Tiers *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 de especies relacionadas también son útiles en el presente documento.

**[0148]** 164. Un 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 en posición 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 propia secuencia codificante (Osborne, T.F., *et al.*, Mol. Cell Bio. 4: 1293, 1984). Habitualmente tienen una longitud de entre 10 y 300 pb, y actúan en *cis*. Los potenciadores actúan para aumentar la transcripción de promotores cercanos. Los potenciadores también contienen con frecuencia elementos de respuesta que actúan como mediadores en la regulación de la transcripción. Los promotores también pueden contener elementos de respuesta que actúan como mediadores en la regulación de la transcripción. Los potenciadores determinan, con frecuencia, la regulación de expresión de un gen. Aunque actualmente se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, alfafetoproteína e insulina), normalmente se usará un potenciador de un virus de célula eucariota para la 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 del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

**[0149]** 165. 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 por exposición a irradiación, tal como irradiación gamma, o fármacos alquilantes desde un punto de vista quimioterapéutico.

**[0150]** 166. En determinadas realizaciones, el promotor y/o la región potenciadora, pueden actuar como un promotor y/o potenciador constitutivo para maximizar la expresión de la región de la unidad de transcripción que se va a transcribir. En determinadas construcciones el promotor y/o la región potenciadora pueden estar activos en todos los tipos de células eucariotas, incluso si solamente se expresan en un tipo de célula particular 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 el vector retroviral LTF.

**[0151]** 167. Se ha mostrado que todos los elementos reguladores específicos pueden clonarse y usarse para construir vectores de expresión que se expresan de manera selectiva en tipos de células específicas tales como células de melanoma. El promotor de proteínas acéticas fibrilares gliales (GFAP) se ha usado para expresar de manera selectiva genes en células de origen glial.

**[0152]** 168. Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células con núcleo) también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la 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 también contenga una región de poliadenilación. Un beneficio de esta región es que aumenta la probabilidad de que la unidad transcrita se procese y se transporte como ARNm. La identificación y uso de señales de poliadenilación en construcciones de expresión está bien establecido. Se prefieren usar señales de poliadenilación homóloga en las construcciones de transgenes. En determinadas 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 unidades transcritas contengan otras secuencias convencionales solas o en combinación con las secuencias anteriores que mejoran la expresión, o la estabilidad, de la construcción.

**b) Marcadores**

**[0153]** 169. 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 si una vez suministrado este marcador se expresa. Son genes marcadores preferidos el gen *lacZ* de *E. coli*, que codifica la  $\beta$ -galactosidasa y la proteína verde fluorescente.

**[0154]** 170. En algunas realizaciones, el marcador puede ser un marcador de selección. Son ejemplos de marcadores de selección adecuados para células de mamífero, la dihidrofolato reductasa (DHFR), la timidina quinasa, la neomicina, el análogo de neomicina G418, la higromicina y la puromicina. Cuando dichos marcadores de selección se transfieren satisfactoriamente a una célula hospedadora de mamífero, dicha célula transformada puede sobrevivir si se coloca bajo presión selectiva. Hay dos categorías distintas muy usadas de regímenes selectivos. La primera categoría se basa en el metabolismo de una célula y en el uso de una línea celular mutante que carece de la capacidad de crecer independiente de un medio complementado. Son dos ejemplos: células CHO DHFR y células LTK de ratón. Estas células carecen de la capacidad de 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 la complementación de los medios es introducir un gel 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 fueron capaces de sobrevivir en medios no complementados.

**[0155]** 171. La segunda categoría es la selección dominante lo que se refiere a un esquema de selección usado en cualquier tipo de célula 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. and 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. Cell. 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.

**5. Péptidos****35 a) Variantes proteicas**

**[0156]** 172. Como se analiza en el presente documento hay numerosas variantes de las proteínas de los organismos desvelados que se conocen y se contemplan en el presente documento. Además, para la cepa de *Thraustochytriales* funcional conocida hay derivados de las proteínas de *Thraustochytriales* que también funcionan en los métodos y composiciones desvelados. Los expertos en la materia conocen bien las variantes y derivados de proteínas que pueden implicar modificaciones de las secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones de las secuencias de aminoácidos normalmente se encuentran 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 aminoácidos individuales o múltiples. Las inserciones serán habitualmente inserciones más pequeñas que las de las fusiones amino o carboxilo terminales, por ejemplo, en el orden de uno a cuatro restos. Los derivados de proteínas de fusión inmunogénica, tales como los descritos en los ejemplos, se preparan fusionando un polipéptido, suficientemente grande para conferir inmunogenicidad, con la secuencia diana por reticulación *in vitro* o por cultivo de células recombinantes transformadas 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 nunca 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 un ADN que tenga una secuencia conocida, por ejemplo, mutagénesis con 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 1 a 30 restos. Se realizan preferentemente delecciones o inserciones en pares adyacentes, es decir, una delección de 2 restos o inserción de dos restos. Las sustituciones, delecciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas puede 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 en su lugar se ha insertado un resto diferente. Dichas sustituciones generalmente se realizan de acuerdo con las siguientes Tablas 1 y 2 y se denominan sustituciones conservativas.

65

**[0157]** 173. 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 una 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 los 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 sustituye por) un resto electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina sustituya a (o se sustituye por) uno que no tenga una cadena lateral, por ejemplo, en este caso, glicina, (e) aumentando el número de sitios para la 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	G
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

15

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
*En la técnica se conocen otros	

**[0158]** 174. Por ejemplo, el reemplazo de un resto de aminoácido con otro que es biológicamente y/o químicamente similar es conocido 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 **[0159]** 175. Para insertar sitios para la N-glicosilación (Asn-X-Thr/Ser) u O-glicosilación (Ser o Thr) puede emplearse mutagénesis de sustitución o delección. También pueden ser deseables delecciones de cisteína u otros restos lábiles. Se consiguen delecciones o sustituciones de posibles sitios de proteólisis, por ejemplo, Arg, suprimiendo, por ejemplo, uno de los restos básicos o sustituyendo uno por restos de glutaminilo o histidilo.

10 **[0160]** 176. Ciertas derivatizaciones postraduccionales son el resultado de la acción de células hospedadoras recombinantes en el polipéptido expresado. Los restos de glutaminilo y asparaginilo frecuentemente se desamidán postraduccionalmente a los restos de glutamilo y asparilo correspondientes. Como alternativa, estos restos se desamidán en condiciones suavemente ácidas. Otras modificaciones postraduccionales 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 **[0161]** 177. 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 en términos de homología/identidad con secuencias conocidas específicas. En el presente documento se desvelan específicamente variantes de proteínas que tienen una homología de al menos 0 %, 70 % o 75 % o 80 % o 85 % o 90 % o 95 % 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 **[0162]** 178. Otro modo de calcular la homología puede realizarse por algoritmos publicados. El alineamiento óptimo de secuencias para su 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 informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección.

35 **[0163]** 179. Para los ácidos nucleicos pueden obtenerse los mismos tipos de homología, 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 que se incorporan en el presente documento por referencia por al menos material relacionado con el alineamiento de ácidos nucleicos.

40 **[0164]** 180. Se entiende que la descripción de mutaciones conservativas y homología pueden combinarse entre sí en cualquier combinación, tal como realizaciones que tiene una homología de al menos 70 % con una secuencia particular en las que las variantes son mutaciones conservativas.

45 **[0165]** 181. Como la presente memoria descriptiva analiza diversas proteínas y secuencias proteicas se entiende que también se desvelan los ácidos nucleicos que pueden codificar estas secuencias proteicas. 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 derivadas de las secuencias proteicas. Por lo tanto, aunque cada secuencia de ácido nucleico particular puede no estar descrita 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 en el presente documento se desvelan variantes particulares de una proteína desvelada, la secuencia de ácido nucleico, que se sabe que codifica esa proteína en la cepa particular de la que surge esa proteína, también se conoce, se desvela y se describe en el presente documento.

60 **[0166]** 182. Se entiende que hay numerosos análogos de aminoácidos y péptidos que pueden incorporarse en las composiciones desveladas. Por ejemplo, hay numerosos D aminoácidos o aminoácidos que tienen un sustituyente funcional diferente al de los aminoácidos mostrados en las Tablas 1 y Tabla 2. Se desvelan los esteroisómeros de péptidos de origen natural, así como los esteroisómeros de análogos peptídicos. Estos aminoácidos pueden incorporarse fácilmente en cadenas polipeptídicas cargando moléculas de ARNt con el aminoácido de elección y modificando con ingeniería genética construcciones 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) todas ellas



incorporadas en el presente documento por referencia al menos para material relacionado con análogos de aminoácidos).

**[0167]** 183. 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),  $\text{--COCH}_2\text{--CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{--}$ , y  $\text{--CHH}_2\text{SO--}$  (Estos 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 pág. 267, 1983; Spatola, A.F., Vega Data (marzo de 1983), Vol. 1, tema 3, Peptide Backbone Modifications (revisión general); Morley, *Trends Pharm. Sci.* 463-468, 1980; Hudson, D. et al., *Int. J. Pept. Prot. Res.* 14: 177-185, 1979 ( $\text{--CH}_2\text{NH--}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{--}$ ); Spatola et al. *Life Sci.* 38: 1243-1249, 1986 ( $\text{--CH}_2\text{--S}$ ); Hann J. *Chem. Soc. Perkin Trans.* 1307-314, 1982 ( $\text{--CH--CH--}$ , cis y trans); Almquist et al. *J. Med. Chem.* 23: 1392-1398, 1980 ( $\text{--COCH}_2\text{--}$ ); Jennings-White et al. *Tetrahedron Lett.*, 23: 2533, 1982 ( $\text{--COCH}_2\text{--}$ ); Szelke et al. *European Appln.*, EP 45665 CA: 97: 39405, 1982 ( $\text{--CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{--}$ ); Holladay et al. *Tetrahedron Lett.* 24: 4401-4404, 1983 ( $\text{--C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{--}$ ); y Hruby *Life Sci.* 31: 189-199, 1982 ( $\text{--CH}_2\text{--S--}$ ); cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia. 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 de enlace, tales como  $\beta$ -alanina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico y similares.

**[0168]** 184. 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.

**[0169]** 185. Para generar péptidos más estables pueden usarse D aminoácidos, debido a que las peptidasas y similares no reconocen a los D aminoácidos. Para generar péptidos más estables puede usarse sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina). Para ciclar o unir dos o más péptidos entre sí, pueden usarse restos de cisteína. Esto puede ser beneficioso para restringir los péptidos a conformaciones particulares. (Rizo y Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61: 387, 1992, incorporada en el presente documento por referencia).

30

## 6. Complementos

**[0170]** 186. En el presente documento también se desvelan complementos nutricionales. Un complemento nutricional es cualquier compuesto o composición que pueda administrarse o que pueda tomar un sujeto para proporcionar, aportar, o aumentar uno o más nutrientes (por ejemplo, vitamina, mineral, oligoelemento esencial, aminoácido, péptido, ácido nucleico, oligonucleótido, lípido, colesterol, esteroide, hidrato de carbono y similares). En un aspecto, en el presente documento se desvelan 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).

**[0171]** 187. El complemento nutricional puede comprender cualquier cantidad de los compuestos desvelados en el presente documento, pero normalmente contendrán una cantidad determinada para aportar al sujeto una dosis deseada de un derivado de benzenodiol (por ejemplo, Cab)) y/o ácidos grasos. La cantidad exacta de compuesto requerida en el componente nutricional variará entre sujetos, dependiendo de la especie, edad, peso y condición general del sujeto, gravedad de la deficiencia dietética que se trate, el modo particular de administración y similares. Por tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada componente nutricional. Sin embargo, un experto en la materia puede determinar una cantidad apropiada usando tan solo 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 puede formar un extremo superior o inferior cuando sea apropiado. En otro aspecto, cuando sea el complemento nutricional, el complemento puede estar compuesto de hasta 100 % del complemento.

**[0172]** 188. 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.

**[0173]** 189. Los componentes 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 forma de comprimido, de cápsula de gelatina, de cápsula, de líquido, de sobrecito o de jarabe.

## 7. Dispositivos de suministro

5

**[0174]** 190. Cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento puede incorporarse en un dispositivo de suministro. Los ejemplos de dispositivos de suministro incluyen, pero sin limitación, microcápsulas, microsferas, 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 pulmonospheres. Más adelante se describen ejemplos de dispositivos de suministro particulares útiles en el presente documento.

**[0175]** 191. Los compuestos desvelados pueden incorporarse en liposomas. Como se sabe en la técnica, los liposomas generalmente proceden de fosfolípidos o de otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados mono o multilaminares, que se dispersan en un medio acuoso. Puede usarse cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable que pueda formar liposomas. Las composiciones desveladas en forma de liposoma pueden contener, además de un compuesto desvelado en el presente documento, estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Son ejemplos de lípidos adecuados los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. En la técnica se conocen métodos para formar liposomas. Véase, por ejemplo, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, volumen XIV, Academic Press, Nueva York, pág. 33 y siguientes; 1976, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad por sus enseñanzas sobre liposomas y su preparación.

**[0176]** 192. En otros ejemplos, los liposomas pueden ser liposomas catiónicos (por ejemplo, DOTMA, DOPE, colesterol DC) o liposomas aniónicos. Si se desea, los liposomas pueden comprender además proteínas para facilitar el direccionamiento a una célula particular. 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; Feigner, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7413-7, 1987; y la Patente de Estados Unidos n.º 4.897.355, que se incorporan en el presente documento por referencia por sus enseñanzas sobre liposomas. Como un ejemplo, el suministro puede ser mediante un liposoma usando preparaciones liposómicas disponibles en el comercio, 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 el suministro del compuesto desde el liposoma se diseñan para una velocidad o dosificación específica.

**[0177]** 193. 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 multilaminares o unilaminares 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 contra el cáncer, incluyendo metotrexato, doxorubicina, e inmunoadyuvantes. Se entienden, en general, que son diferentes de los transferosomas, vesículas preparadas a partir de hidrato de carbono anfifílico y polímeros que contienen grupo amino, por ejemplo, quitosano.

45

**[0178]** 194. Como se describe en el presente documento, los nanoeritosomas son dispositivos de suministro pueden usarse para suministrar las composiciones desveladas en el presente documento. Los nanoeritosomas son nanovesículas compuestas 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.

**[0179]** 195. Los glóbulos rojos artificiales, como se describe 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 métodos de emulsión de polimerización interfacial. Generalmente, la pared "celular" está compuesta de polímero de polilítaloil L-lisina/poliestireno y el núcleo está compuesto de una solución de hemoglobina de hemolizado de oveja. Las microsferas cargadas con hemoglobina normalmente tienen tamaños de partícula de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 10 µm. Su tamaño, flexibilidad y capacidad de transportar oxígeno es similar al de los glóbulos rojos.

60

**[0180]** 196. Las nanopartículas de lípido-sólido, como se describe 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 compuestas por 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

65

inmunomoduladores (ISCOM) 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, los ISCOM se usan para prolongar los niveles en plasma sanguíneo de ciclosporina inyectada por vía subcutánea.

5

**[0181]** 197. Las microesferas y microcápsulas, como se describe 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 o membrana polimérica sólida. 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 satisfactorias de péptidos de acción corta, tales como agonistas de LHRH como leuprorelina y triptorelina. En la actualidad en el tratamiento de cáncer de próstata avanzado, endometriosis y otras afecciones sensibles a hormonas, se usan microesferas de poli(lactida co-glicolida (PLGA)) como formas de dosificación mensuales y trimestrales. En diversas matrices de PLGA se incorporó leuprolide, un súperagonista de LHRH, 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.

**[0182]** 198. Las pulmospheres son otros ejemplos más de dispositivos de suministro que pueden usarse en el presente documento. Las pulmospheres son partículas porosas huecas con una baja densidad (menos de aproximadamente  $0,1 \text{ m ml}^{-1}$ ). Normalmente las pulmospheres tienen excelente capacidad de redispersión y habitualmente se preparan con tecnología de condensación de fluido supercrítico. El secado por pulverización conjunto con determinadas matrices, tales como hidratos de carbono, albúmina de suero humano, etc., puede mejorar la estabilidad de las proteínas y de los péptidos (por ejemplo, insulina) y de otras biomoléculas para el suministro pulmonar. Este tipo de suministro también puede realizarse con microemulsiones y emulsiones lipídicas, que son emulsiones de aceite en agua (o/w) ultra finas, delgadas, transparentes, formadas espontáneamente sin entrada 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 (emulsión de aceite en agua). Debido a su fase interna muy pequeña, son extremadamente estables y se usan para la liberación prolongada de esteroides y vacunas. Las emulsiones lipídicas comprenden un núcleo lipídico neutro (es decir, triglicéridos) estabilizado por una monocapa de lípido anfifílico (es decir, fosfolípidos) usando tensioactivos como triglicéridos de lecitina de huevo y migliol. Son adecuadas para el direccionamiento pasivo y activo.

**[0183]** 199. Hay otros sistemas de suministro oral que se están investigando que se basan en la modulación de la presión osmótica, modulación del pH, modulación de hinchamiento, densidad alterada y sistemas de flotación, mucoadhesión, etc. Estas formulaciones y las 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 el suministro de las composiciones desveladas en el presente documento.

**[0184]** 200. En un aspecto particular desvelado en el presente documento, los compuestos desvelados, incluyendo complementos nutricionales y formulaciones farmacéuticas de los mismos, pueden incorporarse en microcápsulas como se describe en el presente documento.

**[0185]** 201. 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. En el presente documento estas microcápsulas se denominan "microcápsulas multinúcleo".

**[0186]** 202. En otro aspecto, en el presente documento se describen 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 la cubierta primaria. En el presente documento estas microcápsulas se denominan "microcápsulas de núcleo individual".

**[0187]** 203. Opcionalmente, con el compuesto de cromo pueden encapsularse otras sustancias de carga. 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, una 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 oleaginosa 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).

**[0188]** 204. 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. En la técnica se conocen bien muchos tipos de derivados de ácidos grasos omega-3. Como ejemplos de derivados adecuados se 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>. Las fuentes de aceites pueden proceder 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).

**[0189]** 205. 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).

**[0190]** 206. Para producir las capas de cubierta de las microcápsulas de núcleo individual y multinúcleo pueden usarse diversos polímeros diferentes. 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 adicionalmente gelatina de tipo A, gelatina de tipo B, polifosfato, goma arábiga, alginato, quitosano, carragenina, pectina, almidón, almidón modificado, alfa lactalbumina, betalactoglobulina, ovoalbumina, polisorbitón, maltodextrinas, ciclodextrinas, celulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, proteína láctea, proteína sérica, proteína de soja, proteína de colza, albúmina, quitina, polilactidas, poli-lactida-co-glucólidos, quitina derivatizada, quitosano, poli-lisina, diversos compuestos inorgánicos-orgánicos, o cualquier mezcla de los mismos. También se contempla que también puedan usarse derivados de estos polímeros. En otro aspecto, el polímero puede ser gelatina kosher, gelatina no kosher, gelatina Halal o gelatina no Halal.

**[0191]** 207. En un aspecto, en las microcápsulas de núcleo individual y multinúcleo, una o más de las capas de cubierta comprenden gelatina que tiene un valor de Bloom menor de 50. En el presente documento esta gelatina se denomina "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 puede usarse dos valores cualquiera 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 y Ross Ltd., R.R. n.º 3 Shelburne, NS Canadá. En otro aspecto, la gelatina que tiene un número de Bloom de cero está tanto en la cubierta primaria como la cubierta exterior de la microcápsula multinúcleo.

**[0192]** 208. En un aspecto, el material usado para fabricar las cubiertas de las microcápsulas de núcleo individual o multinúcleo es un sistema de dos componentes compuesto por una mezcla de dos tipos de polímeros diferentes. En un aspecto, el material es un coacervado complejo entre los componentes poliméricos. La coacervación compleja está causada por la interacción entre dos polímeros cargados de forma opuesta. En un aspecto, el material de cubierta 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 sérica, proteína de soja, proteína de colza, albúmina, 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 usa gelatina de Bloom bajo y alginato la relación molar es 3:1 a 8:1.

**[0193]** 209. En el material de cubierta (por ejemplo, cubiertas primarias o exteriores) pueden incluirse adyuvantes de procesamiento. 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 propiedades de barrera de las microcápsulas. En un aspecto, al material de cubierta pueden añadirse uno o más antioxidantes. 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 prolongar el periodo de validez, etc.). Preferentemente puede usarse un número pequeño de adyuvantes de procesamiento que realizan una gran cantidad 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 aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 12.000 ppm o de aproximadamente 1000 ppm a aproximadamente 5000 ppm. También pueden usarse otros adyuvantes de procesamiento tales como, por ejemplo, quelantes metálicos. Por ejemplo, puede usarse ácido etilendiaminetetraacético para unir iones metálicos, que pueden reducir la oxidación catalítica de la sustancia de carga.

**[0194]** 210. 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  $\mu\text{m}$ , 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 microcápsulas de núcleo individual tienen un diámetro externo de 1  $\mu\text{m}$  a 2000  $\mu\text{m}$ .

**[0195]** 211. 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 %, de 50 % a 70 % en peso o de 60 % en peso de las microcápsulas de núcleo individual o multinúcleo.

**[0196]** 212. En un aspecto, los métodos desvelados en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 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 pueda colocarse una o más capas de cubierta adicionales en la cubierta exterior de las microcápsulas de núcleo individual o multinúcleo. En un aspecto, las técnicas descritas en la Publicación Internacional n.º WO 2004/041251 A1, que se incorpora por referencia en su totalidad, pueden usarse para añadir capas de cubierta adicionales a las microcápsulas de núcleo individual y multinúcleo.

#### a) Composiciones farmacéuticas y nutracéuticas

**[0197]** 213. Estos lípidos y antioxidantes están destinados para su uso en piensos para animales, productos farmacéuticos, nutracéuticos (especialmente fórmula infantil), así como en la industria. También deben incluir formas nutracéuticas de suministro tales como cápsulas de gelatina y similares, microencapsulaciones comunes, etc.

**[0198]** 214. 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 interaccionar de una manera perjudicial con ninguno de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que se incluye. El vehículo se selecciona naturalmente para minimizar cualquier degradación del principio activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como conoce bien un experto en la materia.

**[0199]** 215. Las composiciones pueden administrarse por vía oral, por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa), por inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, por vía sistémica, por vía extracorpórea, por vía tópica o similar, incluyendo administración intranasal tópica o administración por inhalante. Como se usa en el presente documento, "administración intranasal tópica" significa suministro de las composiciones en la nariz y fosas nasales a través de una o ambas de las narinas y puede comprender el suministro mediante un mecanismo de pulverización o un mecanismo por goteo, o por 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 goteo. El suministro también puede ser directamente a cualquier área del sistema respiratorio (por ejemplo, pulmones) mediante intubación. La cantidad exacta, necesaria, de las composiciones, variará entre sujetos, dependiendo de la especie, la edad, el peso y estado general del sujeto, de la gravedad del trastorno alérgico que se trate, del ácido nucleico o vector particular usado, de su modo de administración y similares. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada composición. Sin embargo, un experto habitual en la materia

puede determinar una cantidad apropiada usando tan solo experimentación acostumbrada, dadas las enseñanzas del presente documento.

5 **[0200]** 216. La administración parenteral de la composición, si se usa, se caracteriza generalmente por inyección. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, bien como soluciones o como suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Un enfoque más reciente revisado para la administración parenteral implica el uso de un sistema de liberación lenta o prolongada de modo que se mantenga una dosificación constante. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 3.610.795 que se incorpora por referencia en el presente documento.

10 **[0201]** 217. Los materiales pueden estar en solución, suspensión (por ejemplo, incorporados en micropartículas, liposomas o células). Estos pueden dirigirse a un tipo de célula 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: 15 275-281,1989; 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: 421-425, 1992; Pietersz y McKenzie, *Immunolog. Reviews*, 129:57-80,1992; y Roffler, et al., *Biochem. Pharmacol.*, 42: 2062-2065,1991). Los vehículos, tales como liposomas "sigilosos" y otros liposomas conjugados con anticuerpo (incluyendo el direccionamiento de fármacos mediado por lípidos a carcinoma colónico), direccionamiento mediado por receptor de ADN a través de ligandos específicos de 20 células, direccionamiento tumoral dirigido por linfocitos y direccionamiento retroviral terapéutico altamente específico 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, en las rutas de endocitosis, bien constitutivas o inducidas por ligando, intervienen receptores. Estos receptores se agrupan en fosas recubiertas de clatrina, entran 25 en la célula mediante vesículas recubiertas con clatrina, pasan a través de un endosoma acidificado en el que se seleccionan los receptores, y después bien se reciclan a la superficie celular, comienzan a almacenarse intracelularmente o se degradan en liposomas. Las rutas de internalización cumplen diversas funciones, tales como la captación de nutrientes, retirada de proteínas activadas, eliminación de macromoléculas, entrada oportunista de virus y toxinas, disociación y degradación del ligando y regulación a nivel del receptor. Muchos receptores siguen 30 más de una ruta intracelular, dependiendo del tipo de célula, de la 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

35 **[0202]** 218. Las composiciones, incluyendo anticuerpos, pueden usarse de forma terapéutica en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 **[0203]** 219. En Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (19ª ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995 se describen vehículos adecuados y sus formulaciones. Normalmente, en la formulación se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para hacer a la formulación isotónica. Los ejemplos de vehículos 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 45 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 obvio para los expertos en la materia que determinados vehículos pueden ser más preferibles dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y de la concentración de la composición que se administre.

50 **[0204]** 220. Los expertos en la materia conocen 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 subcutánea. Otros compuestos se administrarán de acuerdo con procedimientos convencionales 55 usados por los expertos en la materia.

60 **[0205]** 221. Además de la molécula seleccionada las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos y similares. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos y similares.

65 **[0206]** 222. La composición farmacéutica puede administrarse de varias maneras dependiendo de si se desea el tratamiento local o sistémico, y de la zona que vaya a tratarse. 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.

**[0207]** 223. 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 de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

**[0208]** 224. 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 oleaginosas, espesantes y similares.

**[0209]** 225. Las composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, sobrecitos o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, saporíferos, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes.

**[0210]** 226. Algunas de las composiciones pueden administrarse posiblemente 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 relación con una base inorgánica tal como hidróxido sódico, hidróxido de amonio, hidróxido potásico, y bases orgánicas tales como mono-, di-, trialquil y aril aminas y etanolaminas sustituidas.

## 30 (2) Usos terapéuticos

**[0211]** 227. Para administrar las composiciones, las dosificaciones y los programas eficaces pueden determinarse de forma empírica y la realización de dichas determinaciones se incluye en la experiencia de la técnica. Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son lo suficientemente grandes para producir el efecto deseado en el que se afecta a los síntomas del trastorno. La dosificación no debería ser tan grande como para ocasionar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas, reacciones anafilácticas y similares, no deseadas. Generalmente, la dosificación variará con la edad, afección, sexo y grado de la enfermedad en el paciente, con la vía de administración o, si se incluyen otros fármacos en el régimen, y puede determinarla un experto en la materia. El médico individual puede ajustar la dosificación 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. En la bibliografía pueden encontrarse directrices de dosificaciones apropiadas para determinadas clases de productos farmacéuticos. Por ejemplo, en la bibliografía sobre usos terapéuticos de anticuerpos, pueden encontrarse directrices para seleccionar dosis apropiadas para anticuerpos, por ejemplo, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., (1985) cap. 22 y págs. 303-357; Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, Nueva York (1977) págs. 365-389. Una dosificación diaria típica del anticuerpo usado solo podría variar de aproximadamente 1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

### b) Suministro dirigido

**[0212]** 228. Los liposomas y las microcápsulas desvelados pueden dirigirse a un tipo de célula particular, tal como células de los islotes, mediante anticuerpos, receptores o ligandos de receptores. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigirse a 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 en diversos tipos de células específicos distintos.

## 8. Productos alimentarios

**[0213]** 229. En el presente documento también se desvelan productos alimentarios que comprenden cualquiera de las microcápsulas y emulsiones desveladas en el presente documento. Por "producto alimentario" se entiende cualquier artículo que un sujeto pueda consumir (por ejemplo, comer, beber o ingerir). 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 cárnico, 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 frutos secos, 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, azúcar blanco o moreno), una salsa, un caldo, un jarabe, una barrita nutricional, una bebida, un polvo de bebida seco, una mermelada o gelatina, un producto de pescado o un alimento para mascotas. En otro aspecto, el producto alimentario es pan, tortillas, cereal, salchicha, pollo, helado, yogur, leche, aliño para ensaladas, salvado de arroz, zumo de frutas, un polvo de bebidas seco, rosquillas, galletas, galletas saladas, tentempiés, tartas de frutas o pasteles.

10

### 9. Microplacas y micromatrices

**[0214]** 230. 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.

15 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.

**[0215]** 231. 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.

20

### 10. Medios legibles por ordenador

25

**[0216]** 232. Se entiende que los ácidos nucleicos y las proteínas que se desvelan 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 presentarse por Val o V. Los expertos en la materia saben cómo presentar y expresar cualquier secuencia de ácido nucleico o proteína en cualquiera de las diversas maneras que existen, cada una de las cuales se considera desvelada en el presente documento. En el presente documento se contempla específicamente la presentación de estas secuencias en medios legibles por ordenador, tales como discos flexibles, cintas, microplacas, discos duros, discos compactos y discos de video disponibles en el comercio, u otros medios legibles por ordenador. También se desvelan representaciones en código binario de las secuencias desveladas. Los expertos en la materia saben cuáles con los medios legibles por ordenador. Por lo tanto, es en los medios legibles por ordenador donde se registran, almacenan o guardan las secuencias de ácidos nucleicos o proteínas.

30

35

**[0217]** 233. Se desvelan medios legibles por ordenador que comprenden las secuencias e información con respecto a las secuencias expuestas en el presente documento.

40

### 11. Kits

**[0218]** 234. En el presente documento se desvelan 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 reactivo 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 pueden incluir, por ejemplo, los lípidos o antioxidantes, junto con medios para usarlos o administrarlos.

50

### 12. Composiciones con funciones similares

**[0219]** 235. Se entiende que las composiciones desveladas en el presente documento tienen ciertas funciones, tales como producir ciertas relaciones de lípidos. En el presente documento se desvelan 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 conseguirán, en última estancia, el mismo resultado, por ejemplo, producción de una cierta relación de lípidos.

55

### 60 D. Métodos para realizar las composiciones

**[0220]** 236. 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.

65



### 1. Síntesis de ácidos nucleicos

**[0221]** 237. Por ejemplo, los ácidos nucleicos, tales como los oligonucleótidos para usar como cebadores pueden prepararse 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, N.Y., 1989) Capítulos 5, 6) a métodos puramente sintéticos, por ejemplo, por el método de cianoetil fosforamidita usando un sintetizador de ADN Milligen o Beckman System 1Plus (por ejemplo, un sintetizador automático Modelo 8700 de Milligen-Biosearch, Burlington, MA o Modelo 380B ABI). También se describen métodos de síntesis útiles para preparar 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). Pueden fabricarse moléculas de ácido nucleico de proteínas usando métodos conocidos tales como los descritos en Nielsen et al., *Bioconjug. Chem.* 5: 3-7, 1994.

### 15 2. Síntesis peptídica

**[0222]** 238. Un método para producir las proteínas desveladas es unir dos o más péptidos o polipéptidos entre sí por técnicas de química de proteínas. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos pueden sintetizarse químicamente usando equipamiento de laboratorio disponible en la actualidad usando química de Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) o Boc (*tert*-butiloxycarbonilo). (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 por enlace covalente mediante un enlace peptídico en sus extremos carboxilo y amino, respectivamente, para formar un anticuerpo, o un fragmento del mismo. (Grant GA (1992) *Synthetic Peptides: A User Guide*. W.H. Freeman y Co., N.Y. (1992); Bodansky M and Trost B., Ed. (1993) *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc., NY (que se incorpora en el presente documento por referencia al menos para material relacionado con la síntesis peptídica). 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 ligarse para formar un péptido o fragmento del mismo mediante reacciones de condensación peptídica similares.

**[0223]** 239. Por ejemplo, el ligamiento enzimático de segmentos peptídicos clonados o sintéticos permite que se unan fragmentos peptídicos relativamente cortos para producir fragmentos peptídicos más grandes, 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 quimiosselectiva de un péptido-tioéster sintético desprotegido con otro segmento peptídico desprotegido que contiene un resto de Cys amino-terminal para proporcionar un producto intermedio unido por tioéster como el producto covalente inicial. Sin un cambio en las condiciones de reacción, este producto 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).

**[0224]** 240. Como alternativa, segmentos peptídicos desprotegidos se unen químicamente formándose el enlace entre los segmentos peptídicos como resultado del ligamiento químico que es un enlace no natural (no peptídico) (Schnolzer, M. 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*, pág. 257-267, 1992).

### 3. Procedimientos para realizar las composiciones

**[0225]** 241. Se desvelan procedimientos para realizar las composiciones así como para realizar los productos 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. Existen 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.

**[0226]** 242. 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 de origen no natural desvelados.

[0227] 243. 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. Métodos de uso de las composiciones.

#### 5 4. Métodos de uso de las composiciones como herramientas de investigación

[0228] 244. Las composiciones desveladas pueden usarse de diversas maneras como herramientas de investigación y de la producción, por ejemplo, de lípidos y antioxidantes.

10 [0229] 245. Las composiciones desveladas pueden usarse como se analiza en el presente documento como reactivos en micromatrices o como reactivos para explorar o analizar micromatrices existentes. Las composiciones desveladas pueden usarse en cualquier método conocido para aislar o identificar polimorfismos mononucleotídicos. Las composiciones también pueden usarse en cualquier método para determinar el análisis alélico, por ejemplo, en 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 explorar ensayos, relacionados con microplacas/micromatrices. Las composiciones también pueden usarse de cualquier manera conocida para usar las realizaciones legibles por ordenador de las composiciones desveladas, por ejemplo, para estudiar la relación o para realizar análisis de modelación molecular relacionada con las composiciones desveladas.

20

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

[0230] 246. Las composiciones y los 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 la modificación se propaga 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 homóloga 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. En el presente documento se desvelan métodos para realizar este tipo de recombinación homóloga.

#### 35 V. REALIZACIONES ESPECÍFICAS

[0231] 247. En el presente documento se desvela un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en la que la secuencia 18S tiene al menos un 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 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*, de la clase *Labyrinthulomycetes*, de la subclase *Thraustochytridae*, del orden *Thraustochytriales*, de la familia *Thraustochytriaceae* y/o del 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.

45

[0232] 248. En el presente documento también se desvela un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos un 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en el que el microorganismo es del género *Schizochytrium*. El microorganismo eucariota puede ser *Schizochytrium sp.*

50 [0232] 249. En el presente documento también se desvela un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos un 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 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.

55 [0233] 250. En el presente documento también se desvela un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos un 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en el que el microorganismo produce un lípido o fracción de ácidos grasos de al menos aproximadamente 4 % en peso a 6 % en peso. El lípido puede comprender DHA. La composición lipídica puede también 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 extracción 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.

60 [0235] 251. También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos un 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ

ID NO: 1. La composición puede comprender además un medio y/o nutrientes.

**[0236]** 252. También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos un 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en la que la composición es una biomasa. El microorganismo eucariota de la composición puede ser del filo *Labyrinthulomycota*, de la clase *Labyrinthulomycetes*, de la subclase *Thraustochytridae*, del orden *Thraustochytriales*, de la familia *Thraustochytriaceae*, o del 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.

**[0237]** 253. También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos un 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en el que el microorganismo es del género *Schizochytrium*. El microorganismo eucariota puede ser *Schizochytrium* sp.

**[0238]** 254. También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos un 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 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.

**[0239]** 255. También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos un 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 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 también 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 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.

**[0240]** 256. También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

**[0241]** 257. 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.

**[0242]** 258. 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 heterótrofo, y aislar la composición lipídica. También se desvela una composición lipídica preparada de acuerdo con este método.

**[0243]** 259. 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 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos un 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 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, leuprolide, un gel, una cápsula de gelatina, un comprimido, una loción, una crema, una pulverización, una emulsión o un polvo.

**[0244]** 260. 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 el 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 la cubierta exterior también pueden comprender gelatina de tipo B, polifosfato, goma arábiga, alginato, quitosano, carragenina, pectina, almidón, almidón modificado, alfa lactalbúmina, betalactoglobulina, ovoalbúmina, polisorbitón, maltodextrina, ciclodextrina, celulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, proteína láctea, proteína sérica, 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.

- 5
- [0245]** 261. 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.
- 10 **[0246]** 262. La cubierta exterior de las microcápsulas desveladas pueden tener un diámetro medio de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2.000  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1.000  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 30 pm 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  $\mu\text{m}$ .
- 15 **[0247]** 263. También se desvela un complemento nutricional que comprende cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro o microcápsulas, descritos anteriormente. Los complementos nutricionales desvelados pueden estar en forma de un comprimido, cápsula de gelatina, cápsula, líquido o jarabe.
- [0248]** 264. También se desvela un producto alimentario que comprende cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro o microcápsulas descritos anteriormente. El producto alimentario puede ser un producto horneado, una pasta, un producto cárnico, 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 frutos secos, 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, un caldo, un jarabe, una barrita 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 de 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 bebidas seco, rosquillas, galletas, galletas saladas, tartas de frutas o pasteles.
- 20
- 25
- 30 **[0249]** 265. 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 **[0250]** 266. 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.
- [0251]** 267. También se desvela un método para reducir en un sujeto los niveles de colesterol, niveles de triglicéridos, o una combinación de los mismos, 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.
- 40
- [0252]** 268. 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.
- 45
- [0253]** 269. 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 sitios anteriormente.
- 50
- [0254]** 270. También se deberá 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.
- 55
- [0255]** 271. 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.
- 60
- [0256]** 272. 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.
- 65 **[0257]** 273. 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.

5 **[0258]** 274. 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.

**[0259]** 275. También se desvela una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas descritos anteriormente y un vehículo farmacéutico.

10

**[0260]** 276. También se desvela un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. El producto alimentario puede ser un producto horneado, una pasta, un producto cárnico, 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 frutos secos, 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, un caldo, 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 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 bebidas seco, rosquillas, galletas, galletas saladas, tartas de frutas o pasteles.

25 **[0261]** 277. 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 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en la que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

35

**[0262]** 278. 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 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

50 **[0263]** 279. 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 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

60 **[0264]** 280. 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 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o un producto alimentario que comprende una composición

65

que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

5 **[0265]** 281. 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 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que  
10 comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

15 **[0266]** 282. 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 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia  
20 mostrada en SEQ ID NO: 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

25 **[0267]** 283. 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 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo  
30 eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o un producto alimentario que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S  
35 tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

**[0268]** 284. También se desvela un método para tratar o prevenir la 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 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID  
40 NO: 1, un complemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, un dispositivo de suministro que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o un producto alimentario que comprende una composición  
45 que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

**[0269]** 285. También se desvela una formulación farmacéutica que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos 94 % de  
50 identidad con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

## VI. EJEMPLOS

**[0270]** 286. Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la materia una divulgación y descripción completa de cómo se realizan y evalúan los compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o métodos reivindicados en el presente documento y se pretende que sirvan puramente como ejemplos y no se presente que limiten la divulgación. Se ha intentado asegurar la precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero debería 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 la atmosférica o cercana a la misma.  
60

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

**[0271]** 287. Para aislar ONC-T18 de hojas de mangle (árbol de manglar), recogidas en Advocate Harbor, Nueva Escocia, se emplearon técnicas de purificación de cepas bacteriológicas clásicas. La cepa DNC-T18 se cultivó en serie a 25 °C en un medio agar con nutrientes 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 µg hasta que se aseguró la pureza. Posteriormente, se preparó un medio líquido que contenía agua de mar filtrada 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 oxigenó mediante agitación a 120 rpm.

**[0272]** 288. Se preparó ONC-T18 del medio por centrifugación con la biomasa celular, después se lavó, se volvió a centrifugar y se liofilizó hasta su finalización. 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 con tapón roscado de 10 ml y añadiendo HCl metanólico al 10 % y diclorometanol 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, detector de ionización de llama) 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 CG de dos patrones internos (C19:0 y C23:0) añadidos en cantidades definidas tanto al comienzo (C23:0) como al final (C19:0) del procedimiento de transesterificación. En la figura 2 se muestra 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.

**[0273]** 289. A partir del análisis de estos resultados, junto con los mostrados en la Figura 1, puede verse que ONC-T18 demostró la capacidad de 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 seleccionó basándose en una combinación de características económicamente deseables: (1) capacidad máxima de crecimiento heterótrofo (en comparación con cepas de control); (2) contiene un alto porcentaje de ácidos grasos altamente insaturados omega-3; (3) capacidad de crecer en nutrientes económicos; (4) termotolerancia y son (5) eurihalinos.

**[0274]** 290. Además, múltiples cepas diferentes de microbios productores de aceite se compararon 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>	127,95	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	63,87	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	96,26	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

	[ ] DHA	[ ] EPA	Lípidos totales	Peso (g)
ONC-T21				
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	81,38	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	18,92	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
ONC-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

**[0275]** 291. Se entiende que, como en el caso de ONC-T18, como se describe en el presente documento, se desvela un conjunto de microbios productores de aceite, representado por sus capacidades productoras de aceite 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 eucariotas de *Thraustochytrium* ONC-T18 usando técnicas genéticas

**[0276]** 292. 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 la PCR y se designó la SEQ ID NO: 1 para las especies eucariotas (véase la figura



2).

**[0277]** 293. La comparación de SEQ ID NO: 1 con secuencias de ácido nucleico halladas en la base de datos genómica, GenBank (Centro Nacional de Información Biotecnológica, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) usando el algoritmo BLAST (herramienta de búsqueda de alineamiento local básica) identificó la SEQ ID NO: 1 como la más relacionada con *Thraustochytrium striatum* [AF265338] (97,5 % de similitud).

**[0278]** 294. A continuación se muestran los resultados de BLAST para *Thraustochytrium sp.* ONC-T18

Secuencias que produjeron alineamientos significativos:	Puntuación (bits)	Valor E
gi  14279326  gb  AF265338.1  Thraustochytrium striatum subunidad pequeña...	2126	0,0
gi  50508012  dbj  AB183657.1  Thraustochytriidae sp. MBIC11072 gen...	2121	0,0
gi  54778780  gb  AY773276.1  Thraustochytriidae sp. FJN-10 18S rib...	1857	0,0
gi  50508019  dbj  AB183664.1  Thraustochytriidae sp. MBIC11093 gen...	1828	0,0
gi  38524571  dbj  AB126669.1  Thraustochytrium sp. CHN-1 gen para ...	1748	0,0
gi  24817740  dbj  AB073308.2  Thraustochytriidae sp. N1-27 gen para ...	1628	0,0
gi  50508018  dbj  AB183663.1  Thraustochytriidae sp. MBIC11092 gen...	1257	0,0
gi  50508017  dbj  AB183662.1  Thraustochytriidae sp. MBIC11091 gen...	1257	0,0
gi  50508015  dbj  AB183660.1  Thraustochytriidae sp. MBIC11084 gen...	1255	0,0
gi  50508011  dbj  AB183656.1  Thraustochytriidae sp. MBIC11070 gen...	1255	0,0
gi  50508016  dbj  AB183661.1  Thraustochytriidae sp. MBIC11086 gen...	1249	0,0
gi  15823623  dbj  AB052555.1  Schizochytrium sp. KH105 gene para 18...	1245	0,0
gi  50508013  dbj  AB183658.1  Thraustochytriidae sp. MBIC11075 gen...	1227	0,0
gi  50508010  dbj  AB183655.1  Thraustochytriidae sp. MBIC11067 gen...	1213	0,0
gi  54303872  gb  AY758384.1  Schizochytrium sp. FJU-512 18S riboso...	1158	0,0
gi  14279326  gb  AF265338.1  AF265338 Thraustochytrium striatum peq...	1106	0,0
gi  6492308  gb  AF155209.1  AF155209 parásito laberintúlido de almeja...	765	0,0
gi  16209570  gb  AY052644.1  parásito laberintúlido de almeja QPX peq...	757	0,0
gi  9755031  gb  AF261664.1  AF261664  parásito laberintúlido de almeja...	757	0,0
gi  58176547  gb  AY870336.1  Thraustochytriidae sp. Fngl 18S ribos...	735	0,0
gi  67624914  dbj  AB191425.1  Eucariota no cultivado gen para peq ...	724	0,0
gi  5509891  dbj  AB022112.1  Thraustochytrium striatum gen para 18...	724	0,0
gi  561884  gb  L34054.1  ULKRRE Ulkenia profunda ARN ribosómico 18S ...	702	0,0
gi  50508014  dbj  AB183659.1  Thraustochytriidae sp. MBIC11077 gen...	686	0,0
gi  50508008  dbj  AB183653.1  Thraustochytriidae sp. MBIC11060 gen...	686	0,0
gi  50508009  dbj  AB183654.1  Thraustochytriidae sp. MBIC11063 gen...	658	0,0
gi  41391986  emb  AJ535188.1  Pleurosira cf. laevis 18S rRNA gen,...	634	e-178
gi  28316562  gb  AF525670.1  Pleurosira laevis small subunid ribos...	634	e-178
gi  5509889  dbj  AB022110.1  Thraustochytrium aureum gen para 18S ...	634	e-178
gi  561883  gb  L34668.1  TUKRRE Thraustochytrium kinnei ribosom 18S...	628	e-176
gi  5509894  dbj  AB022115.1  Ulkenia radiata gen para ARNr 18S	624	e-175
gi  5509893  dbj  AB022114.1  Ulkenia profunda gen para ARNr 18S	624	e-175
gi  5509895  dbj  AB022116.1  Ulkenia vizurgensis gen para ARNr 18S	603	e-169
gi  9027563  gb  AF257315.2  Thraustochytriidae sp. BS2 18S ribosom...	589	e-164
gi  5509886  dbj  AB022107.1  Schizochytrium limacinum gen para 18S...	581	e-162
gi  48727879  gb  AY620254.1  Metromonas simplex clon TC-S s. pequeña...	571	e-159
gi  33309650  gb  AF411282.1  Cercozoo no identificado 18S ribosómico ...	569	e-158
gi  28076844  gb  AF530543.1  Eucariota no cultivado clon AT4-68 18S...	531	e-147
gi  30144485  gb  AY256273.1  Aislado eucariota no cultivado E170 peq...	517	e-143
gi  30144529  gb  AY256317.1  Aislado eucariota no cultivado D107 peq...	507	e-140
gi  14579477  gb  AF363207.1  Eucariota marino clon ME1-24 18S rib...	505	e-139
gi  39578677  gb  AY426906.1  Eucariota marino no cultivado clon BL0...	504	e-139
gi  39981869  gb  AY381216.1  Eucariota no cultivado clon BL010625.3...	504	e-139
gi  73533408  gb  DQ103811.1  Eucariota marino no cultivado clon M4_...	504	e-139
gi  73533402  gb  DQ103805.1  Eucariota marino no cultivado clon M3_...	504	e-139
gi  73533389  gb  DQ103792.1  Eucariota marino no cultivado clon M2_...	504	e-139
gi  73533382  gb  DQ103785.1  Eucariota marino no cultivado clon M1_...	504	e-139
gi  30144534  gb  AY256322.1  Aislado eucariota no cultivado D179 peq...	504	e-139
gi  24817738  dbj  AB073305.2  Thraustochytriidae sp. H1-14 gen para...	504	e-139
gi  30268157  emb  AJ519935.1  AST519935 Aplanochytrium stocchinoi p...	504	e-139
gi  58531881  gb  AY882527.1  Eucariota marino no cultivado clon T41...	504	e-139
gi  463127  gb  L27634.1  LADDLRRNA Labyrinthuloides minuta similar a 16S...	504	e-139

Secuencias que produjeron alineamientos significativos:	Puntuación (bits)	Valor E
gi  39981839  gb  AY381186.1  Eucariota no cultivado clon OR000415.1...	502	e-138
gi  39981824  gb  AY381171.1  Eucariota no cultivado clon HE001005.1...	502	e-138
gi  18026024  gb  AY046848.1  Aislado eucariota no cultivado C3_E019...	502	e-138
gi  18026022  gb  AY046846.1  Aislado eucariota no cultivado C3_E017 ...	502	e-138
gi  18026014  gb  AY046838.1  Aislado eucariota no cultivado C3_E008 ...	502	e-138
gi  18026008  gb  AY046832.1  Aislado eucariota no cultivado C3_E002 ...	502	e-138
gi  18025980  gb  AY046804.1  Aislado eucariota no cultivado C2_E014 ...	502	e-138
gi  18025969  gb  AY046793.1  Aislado eucariota no cultivado C2_E002 ...	502	e-138
gi  18025801  gb  AY046625.1  Aislado eucariota no cultivado C1_E024 ...	502	e-138
gi  67624915  dbj  AB191426.1  Eucariota no cultivado gen para peq ...	502	e-138
gi  67624913  dbj  AB191424.1  Eucariota no cultivado gen para peq ...	502	e-138
gi  67624912  dbj  AB191423.1  Eucariota no cultivado gen para peq ...	502	e-138
gi  39981861  gb  AY381208.1  Eucariota no cultivado clon BL010320.1...	500	e-138
gi  14349249  dbj  AB052556.1  Thraustochytrium sp. KK17-3 gen para...	500	e-138
gi  20218962  dbj  AB073307.1  Thraustochytriidae sp. M4-103 gen para...	498	e-137
gi  59709960  gb  AY916582.1  Eucariota no cultivado clon Zeuk76 18S...	496	e-136
gi  18025960  gb  AY046784.1  Aislado eucariota no cultivado A3_E043 ...	496	e-136
gi  18025789  gb  AY046613.1  Aislado eucariota no cultivado C1_E009 ...	496	e-136
gi  30144548  gb  AY256336.1  Aislado eucariota no cultivado D278 peq...	496	e-136
gi  2138106  gb  U59933.1 U59933 Scybalium jamaicense 18S ribosom....	496	e-136
gi  53828186  gb  AY744948.1  Phytophthora palmivora aislado 88108 ...	494	e-136
gi  60687349  gb  AY821976.1  Oomiceto no cultivado clon CV1_B2_5 peq...	494	e-136
gi  60687347  gb  AY821974.1  Oomiceto no cultivado similar a Phytophthora ...	494	e-136
gi  60687342  gb  AY821969.1  Oomiceto no cultivado clon CV1_B1_49 p...	494	e-136
gi  39981870  gb  AY381217.1  Eucariota no cultivado clon BL010625.3...	494	e-136
gi  39981864  gb  AY381211.1  Eucariota no cultivado clon BL010320.2...	494	e-136
gi  39981860  gb  AY381207.1  Eucariota no cultivado clon BL010320.6...	494	e-136
gi  39981844  gb  AY381191.1  Eucariota no cultivado clon BL000921.1...	494	e-136
gi  18026046  gb  AY046870.1  Aislado eucariota no cultivado C3_E044 ...	494	e-136
gi  18026039  gb  AY046863.1  Aislado eucariota no cultivado C3_E035 ...	494	e-136
gi  18026031  gb  AY046855.1  Aislado eucariota no cultivado C3_E026 ...	494	e-136
gi  42412527  gb  AY486144.1  Pythium insidiosum ARN ribosómico 18S ...	494	e-136
gi  73533425  gb  DQ103828.1  Eucariota marino no cultivado clon M2_...	494	e-136
gi  34576227  gb  AY129064.1  Eucariota marino no cultivado UEPAC45p4...	494	e-136
gi  30144522  gb  AY256310.1  Aislado eucariota no cultivado D85 peq...	494	e-136
gi  30144521  gb  AY256309.1  Aislado eucariota no cultivado D84 peq...	494	e-136
gi  30144518  gb  AY256306.1  Aislado eucariota no cultivado D79 peq...	494	e-136
gi  30144475  gb  AY256263.1  Aislado eucariota no cultivado E106 peq...	494	e-136
gi  30144473  gb  AY256261.1  Aislado eucariota no cultivado E94 peq...	494	e-136
gi  21954246  gb  AY116220.1  Eucariota no cultivado clon 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 aislado 129F-...	494	e-136
gi  53693108  gb  AY742759.1  Pythium vexans aislado Pyv6-2 18S rib...	494	e-136
gi  53693105  gb  AY742756.1  Pythium splendens aislado 117 18S rib...	494	e-136
gi  53693104  gb  AY742755.1  Pythium aphanidermatum 18S ribosóm....	494	e-136
gi  53693097  gb  AY742748.1  Phytophthora capsici aislado 98110 18...	494	e-136
gi  53693096  gb  AY742747.1  Phytophthora tropicalis aislado 23047...	494	e-136
gi  53693094  gb  AY742745.1  Phytophthora palmivora aislado 8829 1...	494	e-136
gi  58531862  gb  AY882508.1  Eucariota marino no cultivado clon T53...	494	e-136

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

[0279] 295. La producción de aceites derivados de microbios (o de organismos unicelulares) depende de diversas 5 variables de proceso, tales como el nivel de inóculo inicial, el tipo de sustrato, la composición de los medios, la temperatura y el pH. Específicamente, la producción, basada en microbios, de ácidos grasos altamente insaturados usando cepas de *Traustochytridos*, muestra una correlación directa entre biomasa y producción de ácidos grasos. En consecuencia, para conseguir el máximo resultado es un factor importante conocer las necesidades básicas o la optimización de parámetros. Por lo tanto, para determinar el mejor medio para la producción de cantidades 10 aumentadas de ácidos grasos, se realizaron experimentos de optimización de la biomasa inicial. Específicamente, se usó el método de Taguchi recientemente desarrollado (Joseph J y Piganatiells JR, IIE Trans 20: 247-254, 1998), basado en matrices ortogonales, 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 obtener un entendimiento de los efectos acumulados de las variables que presentan un impacto en la producción de biomasa. Hubo efectos en la producción de biomasa, en las variaciones de la concentración de nitrógeno (extracto de levadura, peptona, L-glutamato), carbono (glucosa) y sal (sal marina artificial). Por lo tanto, se prepararon  
 5 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<sub>25</sub> de tal manera que el medio de nitrógeno de elección se diferenció mediante el uso de análisis de la relación de señal y ruido (SNL) a las 48 y 120 horas, usando la siguiente fórmula:

10

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

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

15 **[0280]** 296. Los resultados de estos experimentos (que se dirigen específicamente a consideraciones de biomasa), como se muestra más adelante en la figura 2, demostraron que la tasa de utilización de 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  
 20 experimentos similares con variaciones en glucosa y salinidad (concentración de sal marina), la composición de medio óptima y más asequible 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

25

**[0281]** 297. Se prepararon medios consistentes en una fuente de nitrógeno (peptona, extracto de levadura, L-glutamato (MSG) o combinaciones de estos) y una fuente de carbono (glucosa), en una solución salina (agua marina artificial), para determinar la mejor composición de medios para la producción de biomasa y DHA óptima de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 3 (mostrada en la Tabla 4). Después de cultivar a 25 °C y a 130 rpm  
 30 durante 3 días, se determinó la biomasa, los ácidos grasos totales por litro de medio, el porcentaje de contenido de ácidos grasos en peso, el 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 más adelante.

35 **[0282]** 298. En este caso, el DHA se confirmó por comparación con patrones conocidos de DHA usando espectrometría de masas y cromatografía de gases y métodos de fijación máximos. Los hallazgos del paquete experimental ❶, en el que se investigaron variaciones en las formas tanto naturales como orgánicas del nitrógeno, demostraron que la composición óptima de los medios debía contener entre 4,0 y 6,0 g l<sup>-1</sup> de extracto de levadura y L-glutamato para una producción de biomasa y DHA óptimas. Por otro lado, el paquete experimental ❷ que investigó  
 40 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 ❸, en el que se modificó la concentración de sodio en el medio, representó máximos para la producción de DHA y biomasa entre el 5 y 15 % de agua marina artificial l<sup>-1</sup> dH<sub>2</sub>O. Los resultados del paquete experimental ❹, en el que se evaluaron variaciones en los niveles de glucosa, demostraron que el intervalo de 40 a menos de 160 g l<sup>-1</sup> de glucosa se traducía en producción de biomasa y  
 45 DHA óptimas. Finalmente, los resultados del paquete experimental ❺, indican que ONC-T18 producía valores equivalentes tanto para biomasa celular como para concentración de DHA, cuando se usaba glucosa o glicerol como fuente de carbono.

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

N.º de exp.	Fuentes de carbono		Tipos de sal		Fuentes de nitrógeno			Ácidos grasos totales (g l <sup>-1</sup> )	Porcentaje de 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	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	7,7	34,53	20,20	1,5578	
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	8,0	2,0	10,0	44,01	17,49	1,7156	
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	6,0	4,0	11,5	50,69	16,23	1,8624	
	Glucosa	66,0	Sal marina	15,0	4,0	6,0	16,9	69,07	24,19	4,0877	
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	2,0	8,0	21,3	81,73	20,99	4,4752	
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	0,0	10,0	0,15	1,97	28,81	28,81	0,0428
2	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	13,2	58,92	31,44	4,1362	
	Glucosa	60,0	NaCl	15,0	10,0	0,0	9,6	63,75	38,45	3,7009	
	Glucosa	60,0	NaSO <sub>4</sub>	15,0	10,0	0,0	0,05	1,41	20,14	0,0109	
3	Glucosa	60,0	Sal marina	5,0	10,0	0,0	14,6	59,23	31,44	4,6004	
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	10,8	51,01	26,17	2,8144	
	Glucosa	60,0	Sal marina	37,5	10,0	0,0	15,9	69,32	25,32	4,0194	
	Glucosa	60,0	Sal marina	75,0	10,0	0,0	10,8	61,02	25,25	2,7356	
	Glucosa	60,0	Sal marina	100,0	10,0	0,0	11,8	68,21	24,02	2,8290	
	Glucosa	60,0	Sal marina	125,0	10,0	0,0	11,2	59,63	22,56	2,5256	
4	Glucosa	5,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	0,63	5,21	29,18	0,1844	
	Glucosa	20,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	4,06	29,59	24,01	0,9752	
	Glucosa	40,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	9,91	59,39	23,88	2,3665	
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	10,76	51,01	26,17	2,8144	
5	Glucosa	100,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	12,79	69,50	31,55	4,0344	
	Glucosa	160,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	1,00	9,40	30,01	0,3013	
	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: Tiempo óptimo para recoger ONC-T18 para una producción máxima de DHA

[0283] 299. Se cultivó ONC-T18 en la misma composición de medios y condiciones a las mostradas en el ejemplo 1. Resulta de interés en este caso particular el tiempo en el cual debería recogerse ONC-T18 para obtener las máximas cantidades de DHA, DPA y EPA así como tener en cuenta el tiempo que se necesita para obtener dichas cantidades (véase la figura 3).

[0284] 300. Los resultados cinéticos experimentales mostraron que el momento óptimo para recoger ONC-T18 para la producción óptima de DHA dentro del matraz y del biorreactor varió entre 3 y 5 días, respectivamente.

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

[0285] 301. La fracción de lípidos total de ONC-T18 se extrajo 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. A la mezcla se añadieron 30 ml de metanol:cloroformo (2:1 v/v) y se agitó suavemente a 120 rpm durante 20 min, decantándose el sobrenadante resultante. Después, el sedimento se resuspendió 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 llevaron a un embudo de separación. Después, se añadieron al embudo 5 ml de cloroformo y 5 ml de H<sub>2</sub>O dando como resultado la formación de un sistema líquido de dos fases. Después de mezclar intensamente dentro del embudo de separación, se retiró la capa de cloroformo, se concentró con gas N<sub>2</sub>, se resuspendió en cloroformo y se conservó a -20 °C hasta que se analizó. Se aplicó puntualmente aproximadamente 1 µl de la fracción de lípidos total en *chromarods* múltiples, se separó y se analizó usando un instrumento *Latroscan* MK6 para TLC/FID.

[0286] 302. El análisis de los resultados muestra que el componente de ácidos grasos que produce ONC-T18 con fermentación heterótrofa 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 de fosfolípidos distinguible. Tras el aislamiento posterior de la fracción de fosfolípidos, primero mediante una combustión del 50 % y después del 75 % seguido de separación basada en disolvente, se determinó que había una fracción de fosfolípidos grande y compleja. Los resultados mostraron la presencia de componentes de fosfatidilcolina, fosfatidilserina y ácido fosfatídico en la muestra.

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

[0287] 303. El eucariota ONC-T18 se cultivó usando las condiciones y el medio mencionados anteriormente. La biomasa celular resultante después de fermentación heterótrofa, se recogió por 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 (reciente o liofilizada) se suspendió en un volumen de acetona 10 x, se agitó durante 5 minutos a 200 rpm, se centrifugó a 3800 x g durante 5 minutos y se concentró hasta la 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 conservaron a -20 °C hasta su análisis por HPLC. Después se realizó la identificación de extractos de carotenoides en un Agilent 1100 de HPLC (Agilent, Palo Alto, CA, Estados Unidos) equipado con un detector de longitud de onda variable ajustado 470 nm. Las muestras se inyectaron a través de una columna protectora C18 Symmetry (Waters, Milford, IA, Estados Unidos) a una columna de fase inversa Bondclone C18 (Phenomenex, Torrance, CA, Estados Unidos; partículas de 10 µm; 3,9 x 300 mm de d.i.). El volumen de inyección fue de 10 µl y se usó un caudal de 1,00 ml/min 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, se usó el área máxima de astaxantina para calcular sus concentraciones. La identidad del carotenoide se confirmó adicionalmente mediante HPLC-MS usando una HPLC de Waters equipada con una matriz de fotodiodos (Waters modelo 996) que conducía a un espectrómetro de masas ESI-Q-Tof (Waters, Milford, MA, Estados Unidos). El análisis por HPLC de ONC-T18 reveló posteriormente la presencia de varios compuestos antioxidantes (entre 50 a 1250 mg kg<sup>-1</sup>) dentro de la biomasa celular. Estos compuestos incluyeron los carotenoides antioxidantes astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equineona 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 1 a 20 mg kg<sup>-1</sup> y 1 a 200 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, así como varios compuestos polifenólicos flavonoides no identificados.

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

[0288] 304. La capacidad de ONC-T18 para producir DHA, EPA y DPA se comparó con la de microorganismos conocidos. La cantidad de biomasa celular por litro de medio, el porcentaje del contenido de grasas o de 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.

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

Microorganismo	Cantidad de biomasa celular (g l <sup>-1</sup> )	Porcentaje del 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 ATCC 26185	2,3	sin datos	41,9	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	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	1,95	sin datos	sin datos
<i>S. aggregatum</i> ATCC 28209	1,4	1,7	6,0	6,1 sin datos	1	1	sin datos	sin datos
<i>S. limacinum</i> SR21 MYA-1381	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

[0289] 305. Como se demuestra en la Tabla 5, resulta evidente que, cuando se realizan cultivos 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. Adicionalmente, de acuerdo con la presente invención, el porcentaje de contenido de DHA y DPA dentro de ONC-T18 es extremadamente alto, mostrando niveles de EPA que son comparables a los de 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 en el ejemplo 1.

9. Ejemplo 9: Información sobre fuentes de carbono alternativas

[0290] 306. 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 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 medios en matraces de 500 ml, cultivados a 25 °C durante 3 días, a 120 rpm en el caso de 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 % vol:vol de 200 ml de medio (ajustado a pH 6,5), mientras que como control se añadió glicerol al 6 % a 200 ml de medio (peso:vol).

30 Tabla 6. Contenido de ácidos grasos, biomasa y glicerol para estudiar una 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 % (peso:vol)	0,29	0,52	26,31	0,24	9,49	426,12	76,00	9,13
GAW 40 % (vol:vol)	0,37	1,32	19,69	0,42	6,36	294,55	68,59	5,94
GWW 40 % (vol:vol)	0,46	5,55	12,46	1,01	3,82	274,33	2,70	3,08

[0291] 307. El análisis de estos resultados ha determinado que, aunque el uso de componentes de corrientes 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, produce 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**

**[0292]** 308. *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 puede cultivarse para la producción de aceites omega 3 en diversas configuraciones de reactor hasta 100.000 l. 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 temperatura 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 pudo producir 40 g/l de peso seco de las células (dcw, *dry cell weight*), 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 medios, tanto de nitrógeno como de carbono, para obtener un efecto de multiplicación similar en la biomasa sin afectar al contenido de TFA o de DHA. Por ejemplo, usando el medio de 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 pudo producir 80 g/l de peso seco de las 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 sobre el peso seco de las células y lípidos**

**[0293]** 309. Se investigó el crecimiento de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 en diversas fuentes de nitrógeno y carbono de bajo coste. Específicamente, durante 72 horas a 25 °C, se cultivaron 50 ml de ONC-T18 en matraces de 250 ml que contenían sales marinas artificiales 6 g/l. Las concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno se muestran más adelante 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 el análisis de metil éster de ácidos grasos, se realizaron por triplicado junto con inyecciones de CG por triplicado.

**[0294]** 310. Los resultados indican que *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 produce biomasa seca de células óptima (es decir, mayor que la de los dos medios de control) cuando se cultiva en las fuentes de nitrógeno EMD de 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 de dextrosa aumentaba el contenido de lípidos, mientras que la fructosa y la dextrosa producían alto contenido de DHA en comparación con los controles.

TABLA 7. Cultivo de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

Medio (sal 6 g/l, cultivo de 72 h, 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	1,244	29,72
	Semilla de algodón-MSG	60	10	9,99	297,08	2,70	45,20	0,500	16,94
	EMD™YE-MSG	60	10	15,49	343,96	5,02	70,68	0,786	20,70
	EMD™YE	60	10	35,79	189,01	6,76	37,14	0,448	19,65
	EMD™YE Peptona-MSG	60	10	11,70	379,48	4,19	83,50	0,926	23,33
	Sigma™YE-MSG	60	10	9,77	257,86	3,28	54,60	0,618	19,69
	Sigma™YE	60	10	10,39	341,98	3,53	58,30	0,629	17,01
	Fermtech™YE-MSG	60	10	13,99	269,53	3,82	56,97	0,664	21,10
	Fermtech™YE	60	10	17,07	243,23	4,15	48,01	0,530	19,74
Harina de pescado (62 % de proteína)	60	10	19,53	290,72	5,68	73,59	0,828	25,31	
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	0,28	23,78	0,256	26,40
	Almidón (trigo)	5	10	8,03	86,96	0,47	17,62	6,185	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

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

- 5 **[0295]** 311. Se ensayaron 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 & Dyer, Can J. Biochem. Physiol, 37: 912-917, 1959); el método de extracción y transesterificación combinado usado específicamente con especies de Traustochytridos que permiten el procesamiento de muestras para un análisis rápido por CG de FAME (metil ésteres de ácidos grasos) (Lewis et al., J Microbiol. Methods, 43: 107-116, 10 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 & Jenkins, J. Agric. Food Chem., 45: 132-135, 1997).
- 15 **[0296]** 312. Específicamente, se dividieron 40 gramos de peso seco de células de biomasa de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 producidos en un solo ciclo de fermentación (véase el 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 cromatografía de gases con detector de ionización de llama, CG-FID, de nuevo por triplicado con ciclos por triplicado por muestra. Los resultados demuestran que el contenido de ácidos grasos total 20 podría variar entre métodos individuales con fluctuaciones más probablemente debido a la saturación de disolvente: compuesto, a cuestiones de alteración de la biomasa y a otras cuestiones de condiciones físicas (por ejemplo, temperatura y tiempo).

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

**25 Bligh y Dyer**

	DHA	EPA	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA
	mg de omega-3 por gramo de biomasa (mg/g)											
<b>1</b>	104,39	4,25	36,28	5,82	113,94	77,27	4,92	44,01	1,13	1,67	28,86	430,99
<b>2</b>	136,75	5,45	46,51	7,40	142,96	98,38	6,07	56,49	1,40	2,19	37,92	552,98
<b>3</b>	134,59	4,78	42,51	6,91	128,54	87,01	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>128,48</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>

**Transesterificación directa**

	DHA	EPA	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA
	mg de omega-3 por gramo de biomasa (mg/g)											
<b>1</b>	104,39	4,24	36,39	5,42	112,94	75,27	5,42	44,01	1,13	1,67	28,86	420,99
<b>2</b>	89,83	4,54	34,81	5,60	103,04	73,43	5,56	42,85	0,98	1,87	25,35	392,88
<b>3</b>	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>26,89</b>	<b>408,17</b>

30

**Saponificación simultánea**

	DHA	EPA	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA
	mg de omega-3 por gramo de biomasa (mg/g)											
<b>1</b>	204,85	6,75	46,55	8,56	182,26	134,81	8,73	105,04	2,16	3,20	66,68	785,25
<b>2</b>	188,51	6,17	47,64	9,32	208,29	121,25	10,35	95,80	2,53	2,89	61,41	770,14
<b>3</b>	198,25	6,12	47,21	9,65	207,71	136,51	9,58	98,50	2,41	3,10	63,58	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>63,89</b>	<b>779,31</b>

a

**Extracción de fase sólida**

35

	DHA	EPA	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA
	mg de omega-3 por gramo de biomasa (mg/g)											
<b>1</b>	169,17	0,42	68,41	10,83	204,43	140,14	8,09	76,97	1,75	3,00	47,05	748,33
<b>2</b>	172,26	0,44	69,59	11,01	207,01	143,74	8,11	78,72	1,74	3,27	47,86	819,04
<b>3</b>	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>

Nota: Cada valor enumerado anterior es la media de ciclos por triplicado usando CG-FID, cromatografía de gases con detector de ionización de llama, para análisis de FAME



**13. Ejemplo 13:****A. Materiales y métodos****5 (1) Aislamiento y mantenimiento de Traustoaquitrinos**

**[0297]** 313. Se recogieron setenta muestras marinas que incluían: *Spartina alterniflora*, *Zostera marina* y sedimento en lugares 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  
10 contenían 10 ml de agua marina natural filtrada en 0,2  $\mu\text{m}$  estéril, 300  $\text{mg l}^{-1}$  de penicilina y 500  $\text{mg l}^{-1}$  de estreptomicina. 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 Diversity Press, Hong Kong, págs. 49-61 (2000)). Después, con el asa se transfirieron granos de polen y se extendieron en estrías 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 contenía antibióticos y  
15 se incubaron. Se seleccionaron colonias hialinas, irregulares, individuales, compuestas de células esféricas o limaciformes y atípicas de colonias de levadura o bacterianas y para su pureza se subcultivaron al menos tres veces en placas B1.

**(2) Producción de biomasa para la exploración de ácidos grasos**

**[0298]** 314. Para explorar aislados con respecto al 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 Lakes, NJ, Estados Unidos), que se esterilizó por autoclave, seguido de la  
25 adición de glucosa 5  $\text{g l}^{-1}$  esterilizada filtrada en 0, 2  $\mu\text{m}$  (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 con asa de una placa de agar y se cultivó durante 4 días a 18 °C en un agitador a 100 rpm. Después se usaron 5 ml de este cultivo para inocular un cultivo de 95 ml incubado durante 4 días más (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 conservaron a -80 °C antes de su derivatización para el análisis de ácidos grasos.  
30

**(3) Preparación de metil ésteres de ácidos grasos (FAME, fatty acid methyl esters)**

**[0299]** 315. La exploración 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  
35 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 minutos para asegurar una dispersión uniforme de la biomasa y se pusieron a 90 °C durante 120 minutos. Una vez que se hubo completado la transesterificación, se retiraron las 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 alícuotas de 3 x 2 ml  
40 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 (CG) de FAME**

**[0300]** 316. Se llevó a cabo análisis CG 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. Los análisis se realizaron usando un CG Agilent 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Estados Unidos) equipado con una columna capilar de sílice fusionada OMEGAWAX 320 de 30 m x 0,32 m de diámetro interno (grosor de la película de 0,25  $\mu\text{m}$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y detector de  
50 ionización de llama (1  $\mu\text{l}$  de volumen de inyección, gas transportador  $\text{H}_2\text{O}$  con un flujo constante de 5,0  $\text{ml min}^{-1}$  y se ajustó a 250 °C, relación de separación 50:1 para detector FID (detector de ionización de llama, *flame ionization detector*) a 275 °C)). La confirmación de la identidad de FAME se realizó usando un espectrómetro de masas Trace CG-DSQ (Thermo Electron, Boston, MA, Estados Unidos) y comparación de los tiempos de retención para patrones de laboratorio).

55

**(5) Identificación genética**

**[0301]** 317. 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 amplificación del gen de ARNr 18S, se modificaron de Vinda et al. Eukaryot Microbiol. 46:637-647 (1999)) concretamente T18S1F 5'-CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3' y T18S5R 5'-TCACTACGGAAACCTTGTACGAC-3'. Una mezcla de reacción de PCR de 20  $\mu\text{l}$  contenía 2U de ADN polimerasa Biolase™ (Biolin, Boston, MA, Estados Unidos), tampón de reacción 1 x  $\text{NH}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$  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  $k$  minutos a  $94\text{ }^\circ\text{C}$ , 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  $94\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 segundos a  $64\text{ }^\circ\text{C}$  y 2 minutos a  $72\text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 ciclos, seguido de una extensión final de 10 minutos a  $72\text{ }^\circ\text{C}$ . 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 las secuencias de nucleótidos de microorganismos similares conservados en GenBank (Benson et al., Nucleic Acids Res 33:D34-38 (2005)) usando DS Gene (Accelrys, San Diego, CA, Estados Unidos). Posteriormente se generó 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 1.000 nuevos muestreos de bootstrap (Felsenstein, Evolution 39: 783-791 (1985)).

## 15 (6) Identificación de carotenoides

**[0302]** 318. Se recogieron células por centrifugación a  $3800 \times g$  y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato. Después se resuspendieron en un volumen de acetona  $10 \times$  (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos), se agitaron durante 5 minutos a 200 rpm, se centrifugaron a  $3.800 \times g$  durante 5 min y se concentraron hasta sequedad por evaporación de  $\text{N}_2$ , seguido de resuspensión en una cantidad mínima de acetona al 10 % en hexano antes de análisis por HPLC. Las identificaciones se llevaron a cabo en un HPLC 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 protectora  $\text{C}_{18}$  Symmentry (Waters, Milford, MA, Estados Unidos) a una columna de fase inversa Bondclone  $\text{C}_{18}$  (Phenomenex, Torrance, CA, Estados Unidos); partículas  $10\ \mu\text{m}$ ;  $3,9 \times 100\ \text{mm}$  de d.i.). El volumen de inyección fue de  $10\ \mu\text{l}$  y se usó un flujo de  $1\ \text{ml}\ \text{min}^{-1}$  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 (astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenona y  $\beta$ -caroteno) y comparando áreas máximas con concentraciones definidas.

## 30 (7) Optimización de fermentación

**[0303]** 319. 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  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . Se llevaron a cabo estudios de cultivo adicionales usando un Biorreactor Bplus Twin SI Biostat<sup>®</sup> (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.

## 40 b) Resultados

**[0304]** 320. Se desarrolló un procedimiento de recogida y de exploración mediante el cual se aislaron miembros de la familia de protistas Labyrinthulida, especialmente de los géneros *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 al microscopio. 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 CG, productividad de biomasa, TFA máximo, concentraciones de DHA y a un menor grado número de concentraciones de EPA (Fig. 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  $2300\ \text{mg}\ \text{l}^{-1}$ , de 27,1 a 321,14, de 5,18 a 83,63 y de 2,97 a  $21,25\ \text{mg}\ \text{g}^{-1}$ , respectivamente (Fig. 11).

**[0305]** 321. 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 el 22 y 80 % del contenido de C20 a C22 total de estas células (Fig. 11). Esto confirma hallazgos previos, por lo que los traustochytridos 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 C20 a C22 como DHA que es aproximadamente del 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 1381/8821 (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 (Fig. 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 (Fig. 11).

5 **[0306]** 322. Huang et al. (Mar Biotechnol 5: 450-457 (2003)) sugirieron que para los traustocóquitridos aislados de las aguas costeras tropicales de Japón y Fiji, 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  
10 docosatetraenoico (Huang et al., Mar Biotechnol 5: 450-457 (2003)). En el caso de esta recogida de traustocóquitridos, aislados de las aguas templadas de la Costa Atlántica de Canadá, pudieron determinarse cuatro perfiles de PUPA, 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 %.

**[0307]** 323. A través de secuenciación directa del gen de ADN<sub>r</sub> 188, ONC-T18 se identificó positivamente como un miembro de la familia de Traustocóquitridos (Número de referencia de GenBank: DQ374149). El análisis filogenético  
15 indicó que ONC-T18 formada 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 *Thraustochytriidae* 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  
20 diversidad genética es bastante baja entre todos los miembros de *Thraustochytriidae* mostrados en la figura 12, que varían del 97,5-91,0 % 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 resto de las aguas templadas de América, Europa y Canadá.

25 **[0308]** 324. El perfil de ácidos grasos de ONC-T18 incluyó 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. Adicionalmente, el análisis de los perfiles de utilización de carbono y nitrógeno para las cepas ONC-T18, SR21 y KH105 mostró un patrón de asimilación similar. El contenido de DPA  
30 n-6 en la cepa ONC-T18 varió de 6-10 %, lo que parece ser extremadamente alto cuando se considera la aparición limitada de DPA n-6 en la biosfera. Sin embargo, Nakahara et al. (J Am Oil Chem Soc 73: 1421-1426 (1996)) indicaron niveles similares de DPA-6 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 %).

**[0309]** 325. 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  
35 diversidad de PUFA presentes y un aumento global de TFA en 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 productos 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 81: 76-78 (1996)),  
40 ONC-T18 creció mejor en un biorreactor. Este resultado coincide con el de Nakahara et al., J Am Oil Chem Soc 73: 1421-1426 (1996)), que descubrieron que *Schizochytrium* sp. SR21 mostraba alta resistencia a la agitación mecánica, y por lo tanto se desarrollaba en condiciones de biorreactor.

**[0310]** 326. Además, se descubrió que se producían pigmentos carotenoides en fermentaciones en placa, matraz y  
45 biorreactor de *Thraustochytrium* sp. ONC-T 18, dando como resultado una descoloración naranja pálido. La producción de estos antioxidantes es máxima dentro de fermentaciones en biorreactor simultáneamente con la producción de ácidos grasos. Además, usando espectrometría de masas de HPLC, se determinó que estos compuestos antioxidantes se identificaron 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  
50 protistas traustocóquitridos. Específicamente, se mostró que *Schizochytrium aggregatum* producía equinenona y cantaxantina (Valadon, Trans Br Mycol Soc 67: 1-15 (1976)), mientras que Carmona et al. (Biosci Biotechnol Biochem 67: 884-888 (2003) y Huang et al. (Mar Biotechnol 5: 450457 (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  
55 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 *Thraustochytrium* spp., la producción de PUFA y de carotenoides puede relacionarse de modo que las grasas de almacenamiento que se producen pueden protegerse de la oxidación.

60 **[0311]** 327. 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 por tanto, 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  
65 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 ( $DT \leq 15\%$ ), contenido de ácidos grasos totales (TFA) y DHA de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

Glucosa ( $g\ l^{-1}$ )	Biomasa ( $g\ l^{-1}$ )	TFA. (% biomasa)	DHA (% TFA)	DHA ( $g\ l^{-1}$ )	
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 ( $g\ l^{-1}$ )	MSG ( $g\ l^{-1}$ )	Biomasa ( $g\ l^{-1}$ )	TFA (% biomasa)	DHA (% TFA)	DHA ( $g\ l^{-1}$ )
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 ( $g\ l^{-1}$ )	Biomasa ( $g\ l^{-1}$ )	TFA (% biomasa)	DHA (% TFA)	DHA ( $g\ l^{-1}$ )	
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	

**[0312]** 328. En 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 (de aproximadamente 80 %) a una concentración de 1 % de extracto de levadura y/o glutamato monosódico (p/v). Sin embargo, los cultivos con una concentración de nitrógeno baja, también limitaron el crecimiento celular y por tanto la producción de ácidos grasos totales. En este experimento se obtuvo producción óptima usando glutamato monosódico  $8\ g\ l^{-1}$  y extracto de levadura  $2\ g\ l^{-1}$ , produciendo biomasa  $26,1\ g\ l^{-1}$  y DHA  $4,5\ g\ l^{-1}$  (Tabla 9). Además, los aumentos del carbono hasta  $100\ g\ l^{-1}$  aumentaron eficazmente el rendimiento de DHA, lo que coincide con los resultados obtenidos para *Schizochytrium* sp. SR21 (Yokochi et al., Appl Microbiol Biotechnol 49: 72-76, (2003)) y es contrario a los mostrados en *T. aureum* en el que concentraciones de glucosa por encima de  $10\ g\ l^{-1}$  eran inhibitorias (Ilda et al., J Ferment Bioeng 81: 76-78 (1996)). Se obtuvieron rendimientos de DHA máximos de más de  $4,0\ g\ l^{-1}$  en medio de glucosa, con rendimientos matores 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, 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, pudiendo soportar salinidades que variaban de  $2,0$  a  $50,0\ g\ l^{-1}$ , 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  $g\ l^{-1}$  variaban hasta el 45 % entre el óptimo a  $4,6\ g\ l^{-1}$  y el mínimo a  $2,5\ g\ l^{-1}$  (Tabla 9).

**[0313]** 329. En la Figura 15 se presenta la biomasa, y los TFA y DHA producidos por ONC-T18 durante un periodo de 168 h en un biorreactor de 5 litros. La curva de crecimiento representada es típica de varias conseguidas en condiciones idénticas. Se alcanzó una producción máxima de biomasa después de 120 h, cerca del punto de agotamiento de la fuente de carbono (es decir, glucosa). Este también fue el punto en el que el contenido de ácidos grasos de la biomasa alcanzó un máximo a aproximadamente 70 % de biomasa. Curiosamente, después de solo 24 horas de cultivo, el contenido de DHA aumentó al 30 % de ácidos grasos totales, permaneciendo después de esto constante a 20-25 %. Estos resultados son coherentes con los de otras cepas de traustoquítridos productoras de ácidos grasos, aunque hay disparidad con respecto a la velocidad a la que se producen estas reacciones.

### 35 c) Análisis

**[0314]** 330. Previamente, la mayoría de los estudios de *Labyrinthomycolata* identificaron cepas que no podían almacenar ácidos grasos totales en cantidades mayores del 20 % de la biomasa. Por ejemplo, antes del aislamiento de *Schizochytrium* sp. SR21 que podía 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)). Por otro lado, ONC-T18, puede acumular hasta el 80 % de su biomasa como lípidos.

**[0315]** 331. Para que los microorganismos oleaginosos, tal 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 h) 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 pueden 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 Traustochytrids, 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 alta tanto de biomasa como de ácidos grasos totales es notable. Prestándose por sí mismo bien a aumentar paulatinamente invalidando la naturaleza corrosiva del agua salada en el equipo de fermentación industrial.

## REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos una identidad del 98 % ó 99 % con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.
- 5
2. Una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos una identidad del 98 % o 99 % con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.
3. Una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos una identidad del 97 % con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 y en el que el microorganismo eucariota produce
- 10
- (a) 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 o de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 3 % en peso de EPA n-3; o
- 15
- (b) un carotenoide; o
- (c) uno o más de ácidos grasos C:14, C:16, C:18 o C:20.
4. Una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos una identidad del 97 % con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, que adicionalmente comprende un antioxidante, un carotenoide, un xantófilo o un compuesto fenólico.
- 20
5. Un método para aumentar las concentraciones de ácidos grasos totales o la producción de biomasa de un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos una identidad del 97 % con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, que comprende cultivar el microorganismo eucariota en condiciones de crecimiento heterótrofas, en el que se aumenta la agitación del cultivo y/o en el que se aumenta la concentración de dO<sub>2</sub> en el cultivo y/o en el que se aumenta la temperatura del cultivo en comparación con las condiciones de cultivo convencionales.
- 25
6. Un método para disminuir la concentración de ácidos grasos totales o la producción de biomasa de un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos una identidad del 97 % con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, que comprende cultivar el microorganismo eucariota en condiciones de crecimiento heterótrofas, en el que se disminuye la concentración de dO<sub>2</sub> en el cultivo y/o se disminuye la agitación del cultivo y/o se disminuye la temperatura del cultivo en comparación con las condiciones de cultivo convencionales.
- 30
7. Un método para disminuir la producción de DHA de un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos una identidad del 97 % con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, que comprende cultivar el microorganismo eucariota en condiciones de crecimiento heterótrofas, en el que se aumenta la agitación del cultivo y/o se aumenta la concentración de dO<sub>2</sub> en el cultivo y/o se aumenta la temperatura del cultivo en comparación con las condiciones de cultivo convencionales.
- 35
8. Un método para aumentar la producción de DHA de un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos una identidad del 97 % con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, que comprende cultivar el microorganismo eucariota en condiciones de crecimiento heterótrofas, se disminuye la agitación del cultivo y/o se disminuye la concentración de dO<sub>2</sub> en el cultivo y/o se disminuye la temperatura del cultivo en comparación con las condiciones de cultivo convencionales.
- 40
9. Un procedimiento para cultivar un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos una identidad del 97 % con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, que comprende: cultivar el microorganismo eucariota en condiciones, en las que las condiciones comprenden un medio que comprende sal de sodio en forma de una sal marina artificial (marina trófica), una fuente de nitrógeno y una fuente de carbono.
- 45
10. Un procedimiento para preparar lípidos que contienen ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y/o ácido docosapentaenoico, comprendiendo el procedimiento:
- 50
- proporcionar un cultivo, comprendiendo el cultivo un medio de cultivo y un microorganismo que tiene el número de acceso de la ATCC PTA-6245;
- 55
- cultivar el microorganismo en el medio cultivo en condiciones adecuadas para la producción de lípidos que contienen ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y/o ácido docosapentaenoico; y
- 60
- recuperar dichos lípidos del cultivo.
11. Un procedimiento para preparar ácido docosahexaenoico, comprendiendo el procedimiento:
- 65
- cultivar un microorganismo que tiene el número de acceso a la ATCC PTA-6245 en un medio nutriente;

recuperar los lípidos del medio;  
hidrolizar dichos lípidos para preparar ácido docosahexaenoico; y  
recuperar dicho ácido docosahexaenoico.

- 5 12. Un procedimiento para preparar lípidos que contienen uno o más de ácidos grasos C:14, C:16, C:18 o C:20, comprendiendo el procedimiento;
- proporcionar un cultivo, comprendiendo el cultivo un medio de cultivo y un microorganismo que tiene el número de acceso a la ATCC PTA-6245;
- 10 cultivar el microorganismo en el medio de cultivo en condiciones adecuadas para la producción de lípidos que contienen uno o más de ácidos grasos C:14, C:16, C:18 o C:20; y  
recuperar dichos lípidos del cultivo.
13. Un procedimiento para preparar uno o más ácidos grasos C:14, C:16, C:18 o C:20, comprendiendo el  
15 procedimiento;
- cultivar un microorganismo que tiene el número de acceso a la ATCC PTA-6245 en un medio nutriente;  
recuperar lípidos del medio;  
hidrolizar dichos lípidos para preparar uno o más ácidos grasos C:14, C:16, C:18 o C:20; y  
20 recuperar dichos uno o más de ácidos grasos C:14, C:16, C:18 o C:20.
14. Una microcápsula, que comprende una aglomeración de microcápsulas primarias y/o una sustancia de carga, teniendo cada microcápsula primaria individual una cubierta primaria, en la que la sustancia de carga comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, y está encapsulada por la cubierta primaria, y en la que la  
25 aglomeración está encapsulada por una cubierta exterior.
15. Un dispositivo de suministro que comprende una composición de cualquiera de las reivindicaciones 2-4.
16. Un complemento nutricional que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, ó 14.  
30
17. Un producto alimentario que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, el dispositivo de suministro de la reivindicación 15, la microcápsula de la reivindicación 14 o el complemento nutricional de la reivindicación 16.
- 35 18. El dispositivo de suministro de la reivindicación 15, la microcápsula de la reivindicación 14, el complemento nutricional de la reivindicación 16 o el producto alimentario de la reivindicación 17 para su uso en el suministro de una composición a un sujeto.
19. Un uso de una microcápsula de la reivindicación 14 para preparar un medicamento para el suministro de una  
40 sustancia de carga a un sujeto.
20. Una formulación farmacéutica que comprende una composición de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, el dispositivo de suministro de la reivindicación 15, la microcápsula de la reivindicación 14 y un portador farmacéutico.
- 45 21. Un cultivo de microalgas que contiene (a) una población de microorganismos eucariotas que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos una identidad del 97 % con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1; y (b) un medio de cultivo que comprende glicerol.
22. Un método de cultivo de microorganismos eucariotas que tienen una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S  
50 tiene al menos una identidad del 97 % con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, que comprende:
- (a) proporcionar un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos una identidad del 97 % con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1;
- 55 (b) colocar los microorganismos eucariotas, que tienen una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos una identidad del 97 % con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en medio de cultivo que comprende una fuente de carbono; y
- (c) cultivar los microorganismos eucariotas que tienen una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene al menos una identidad del 97 % con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en condiciones de crecimiento heterótrofas.  
60

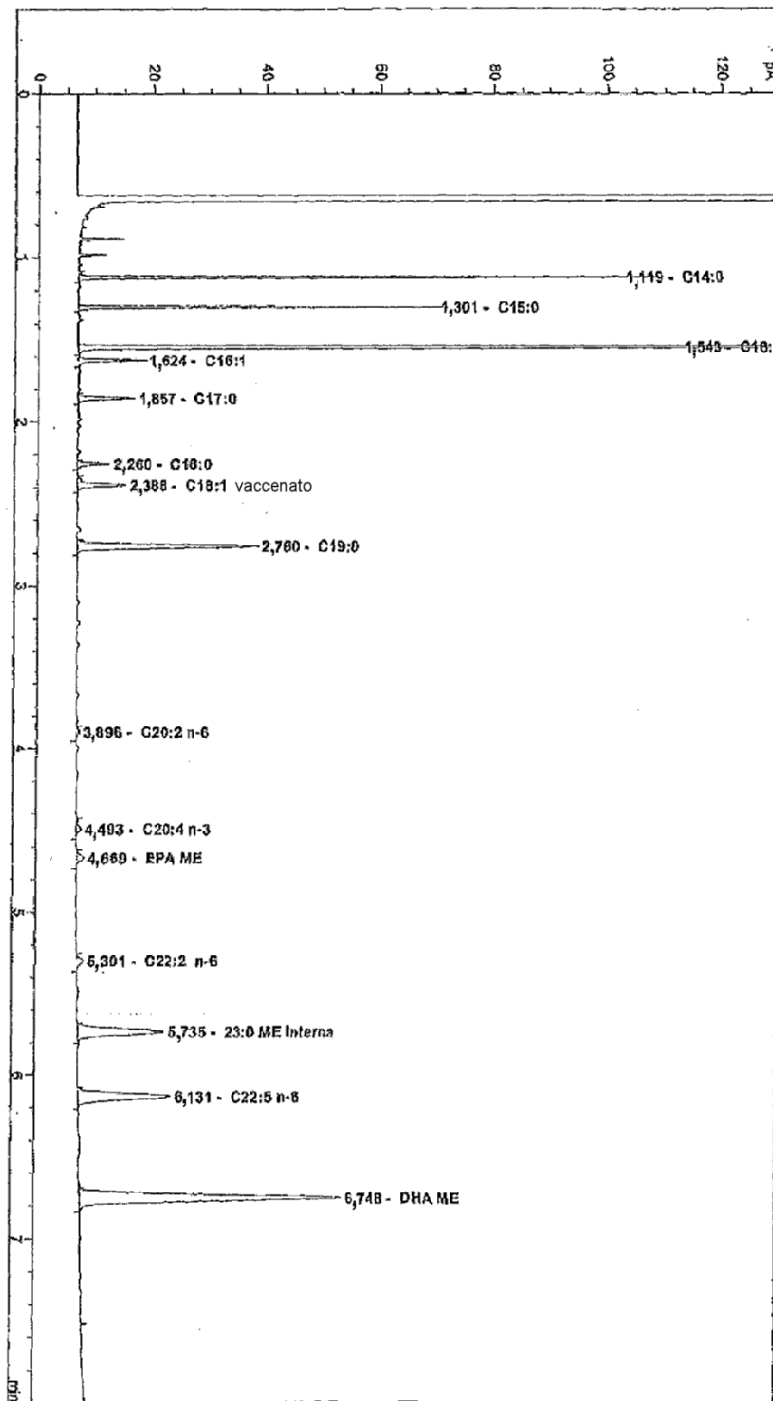
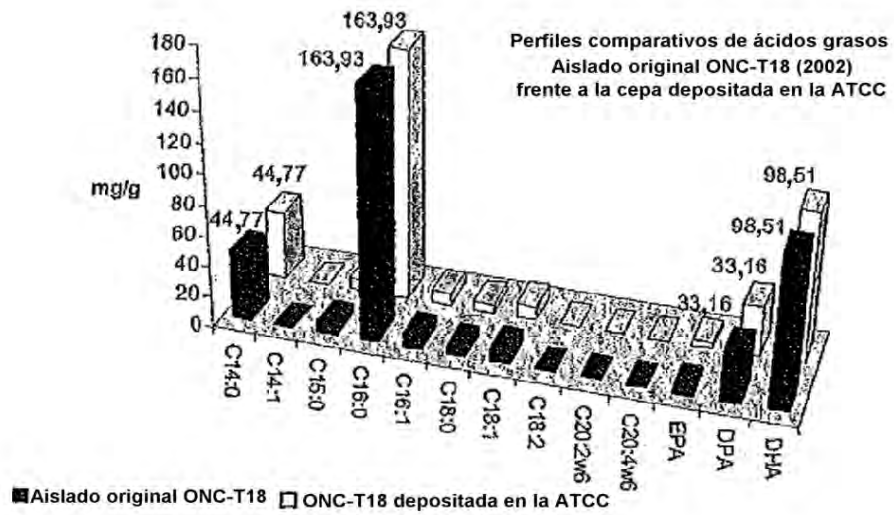


FIGURA 1



**FIGURA 2**



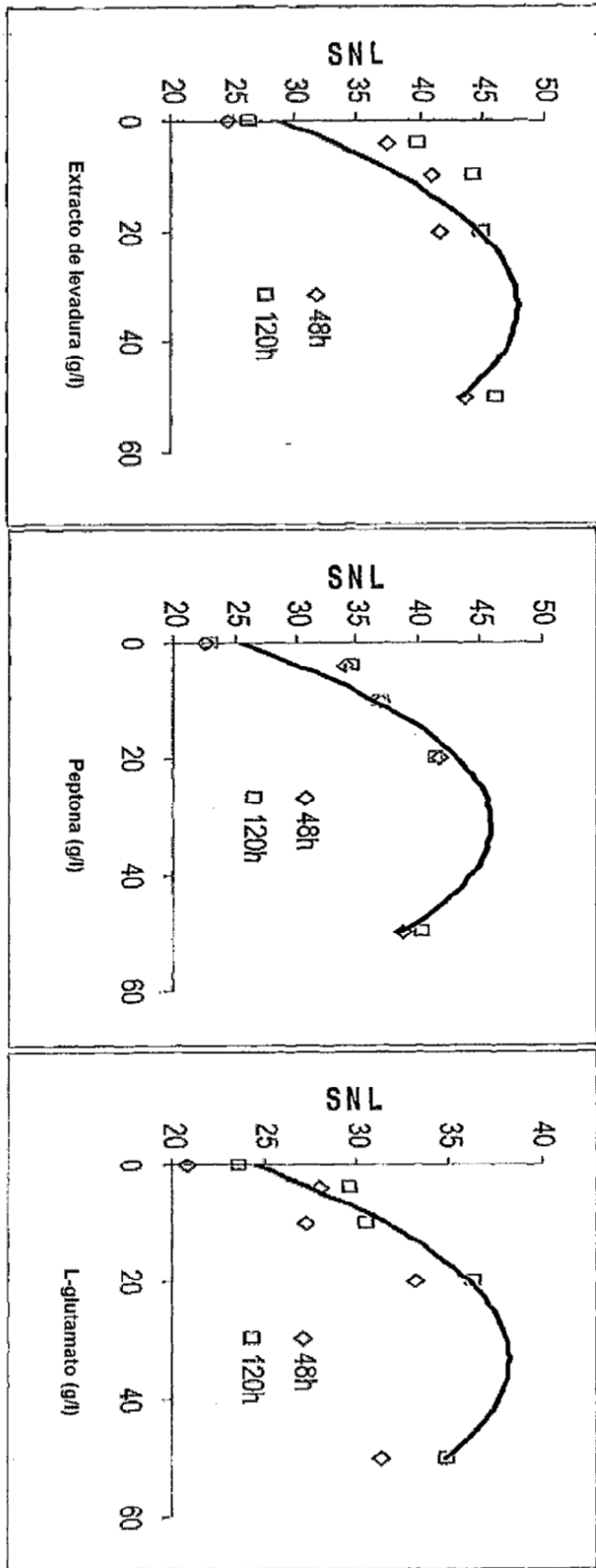


FIGURA 3

FIGURA 4

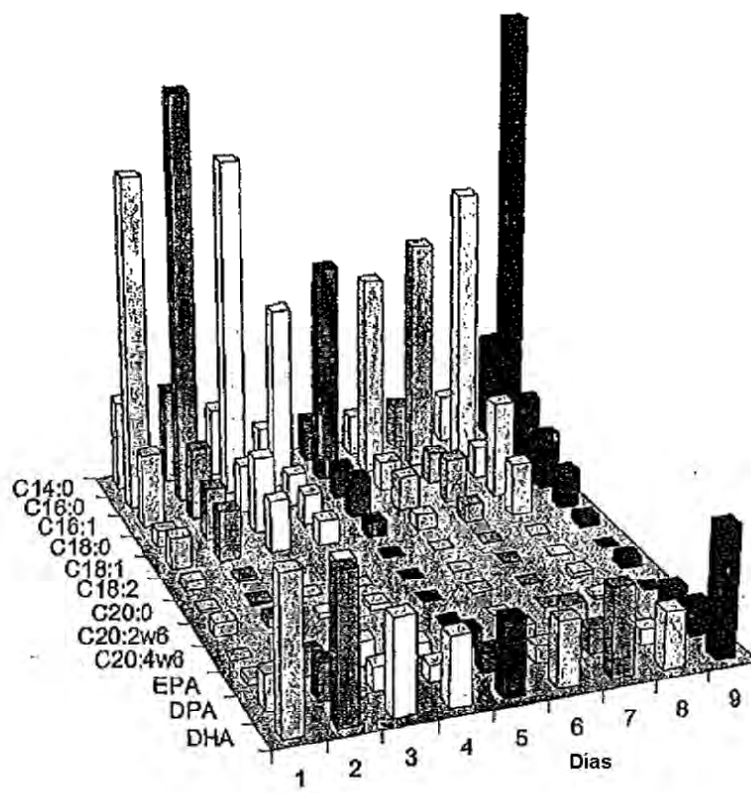
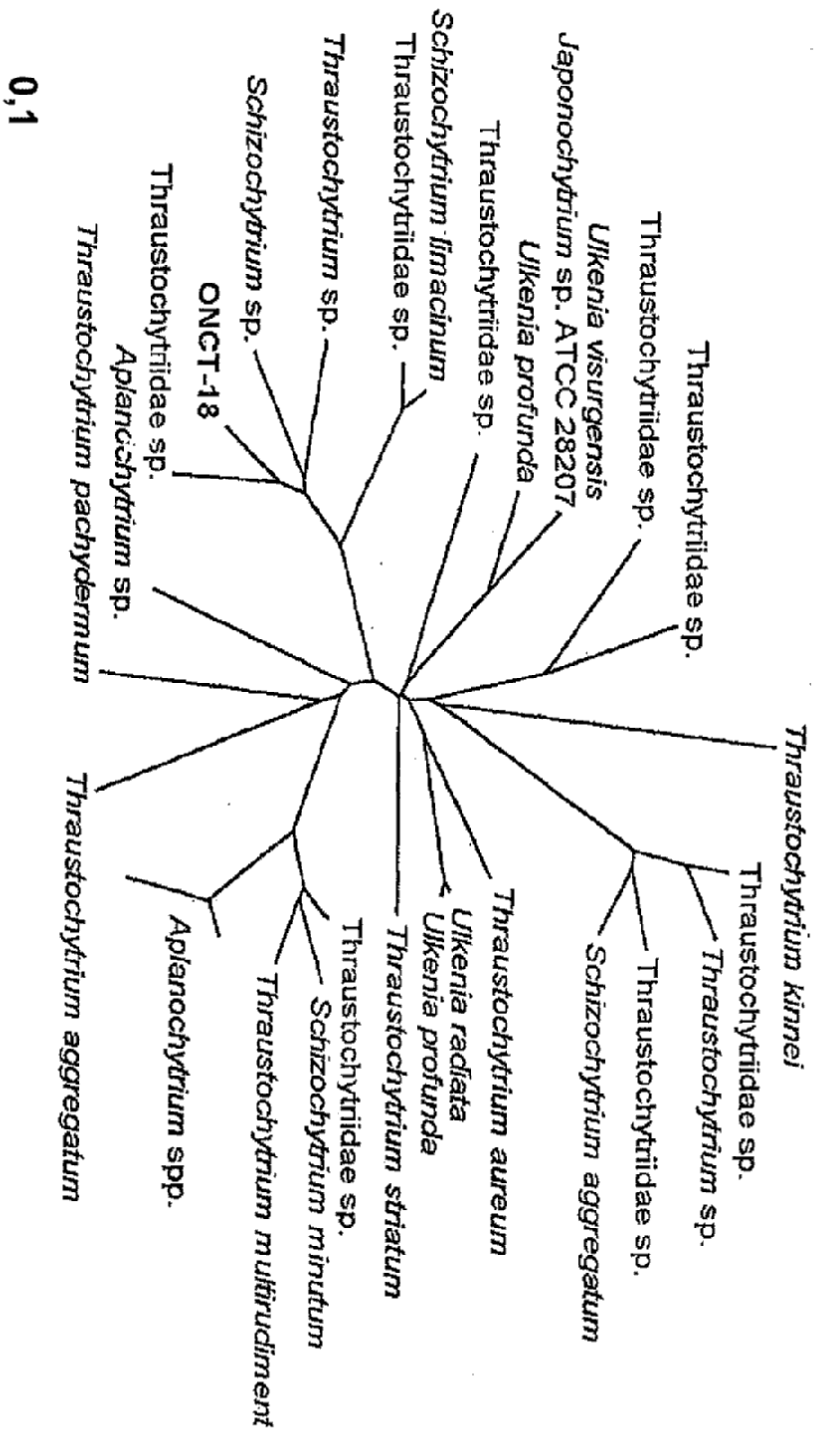


FIGURA 5

## Fuentes microbianas de PUFA

Microorganismo	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 (protista)	100 <sup>+</sup> (DHA)	1000

FIGURA 6



0,1

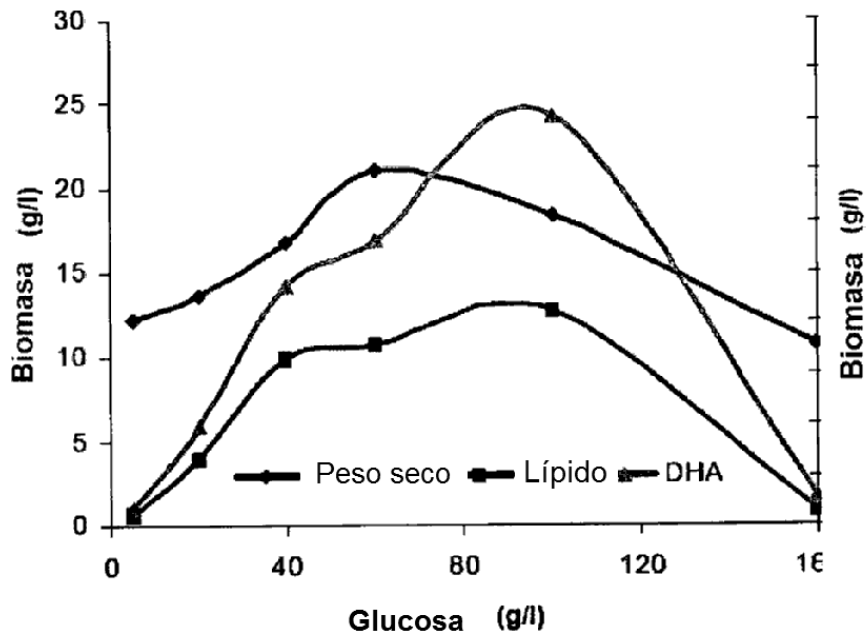
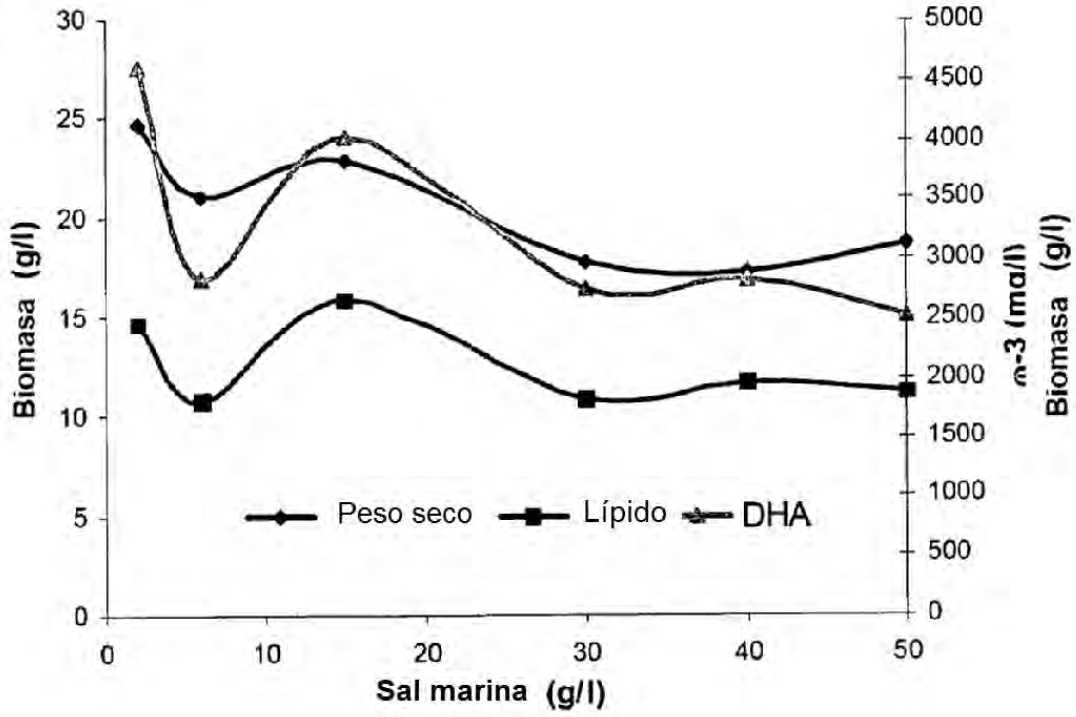


FIGURA 7

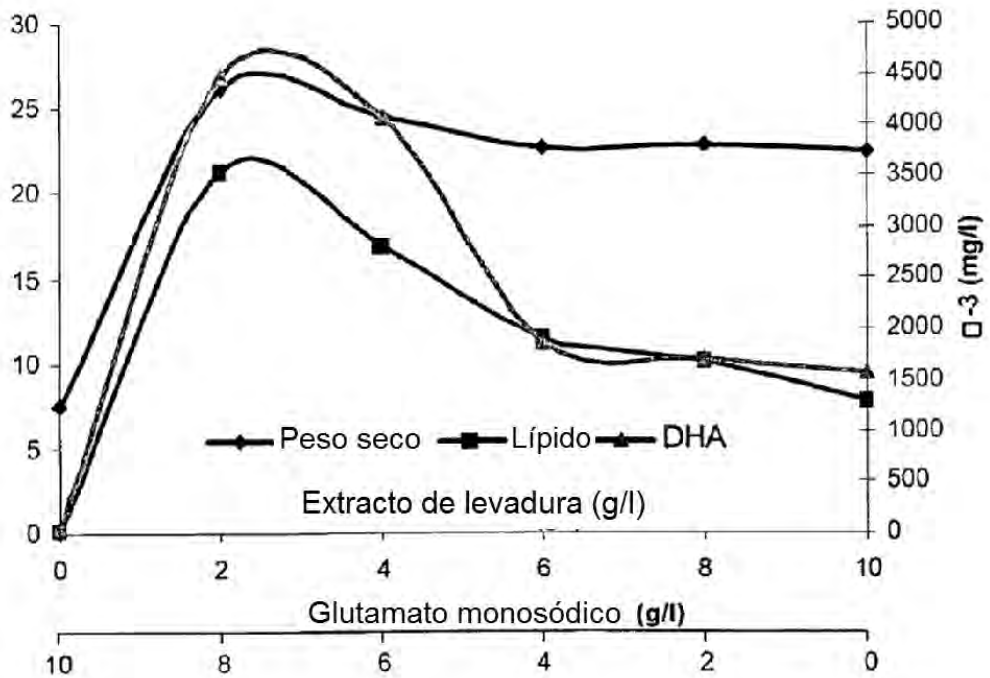
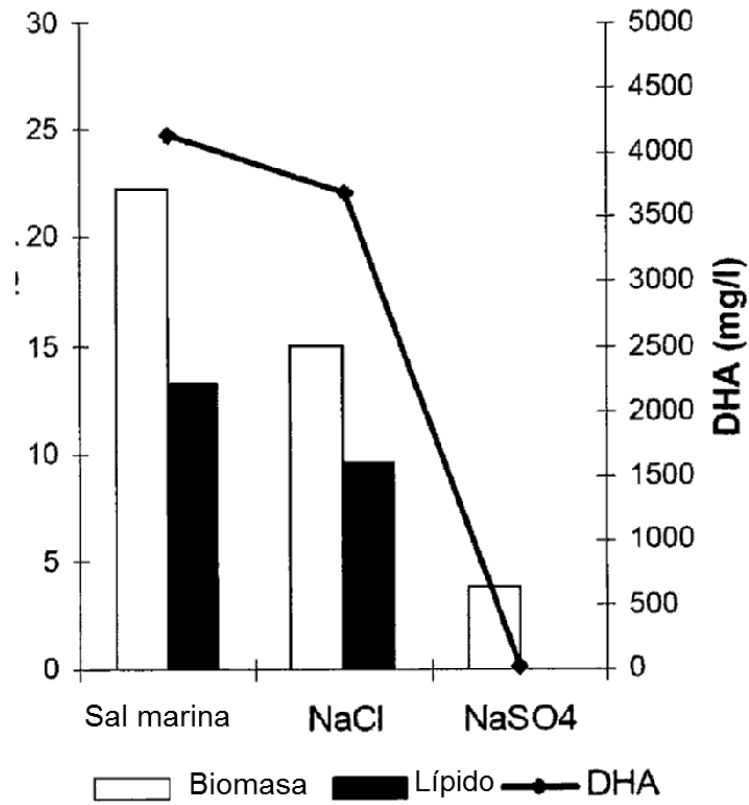


FIGURA 7 (cont)

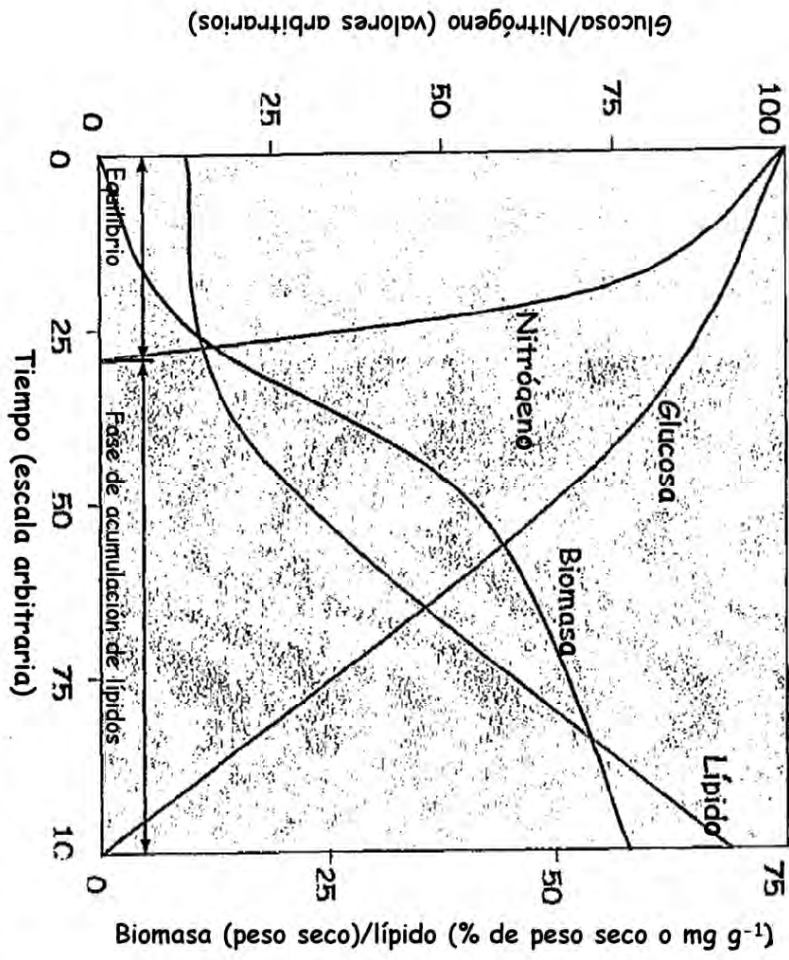


FIGURA 8

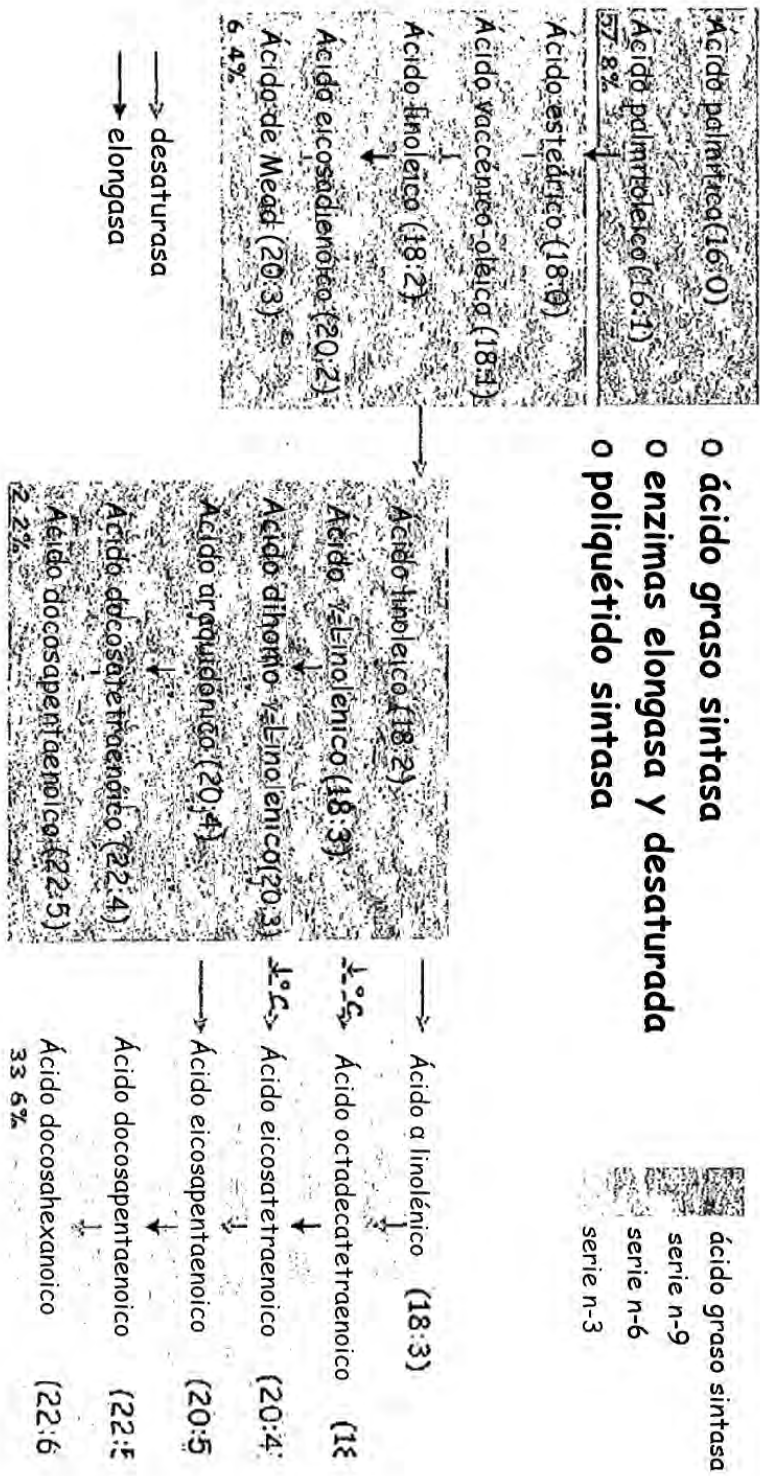
Modificado de Rattledge, C. (2004). *Lipid Technol.* 16:34-39.

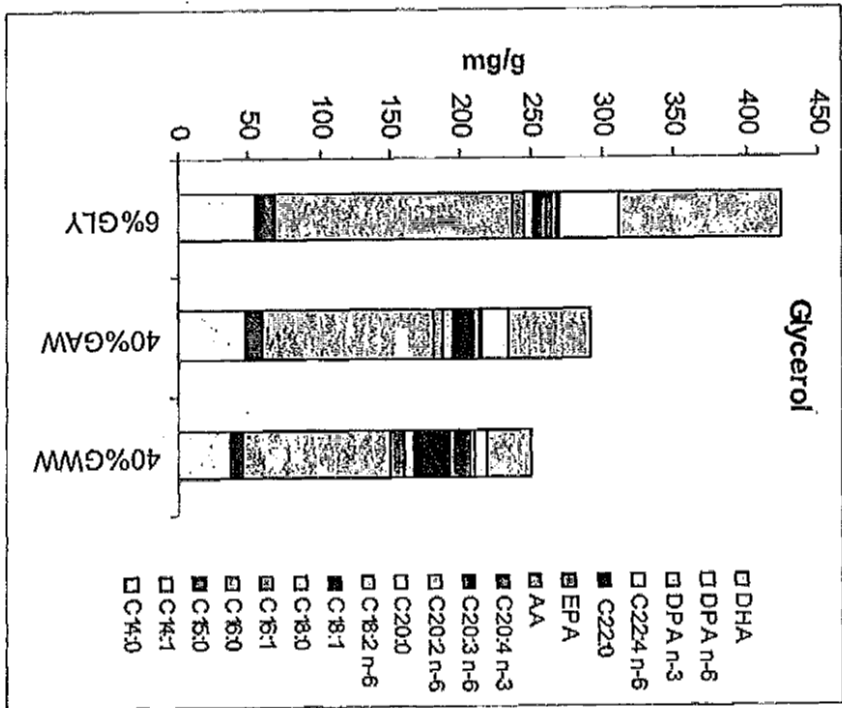


FIGURA 9

**Rutas metabólicas PUFA**

o ácido graso sintasa  
o enzimas elongasa y desaturada  
o poliquétido sintasa





**FIGURA 10**

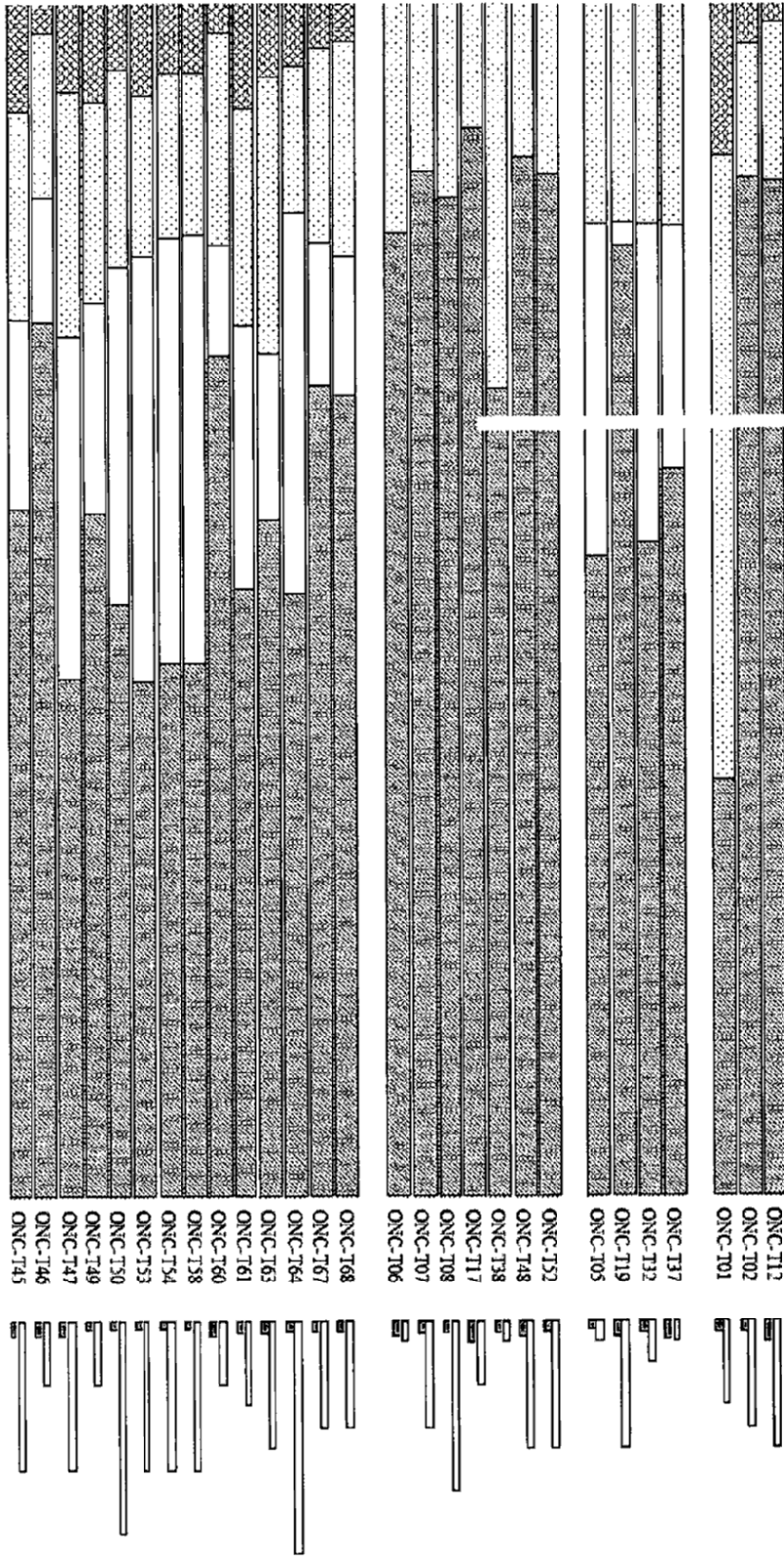
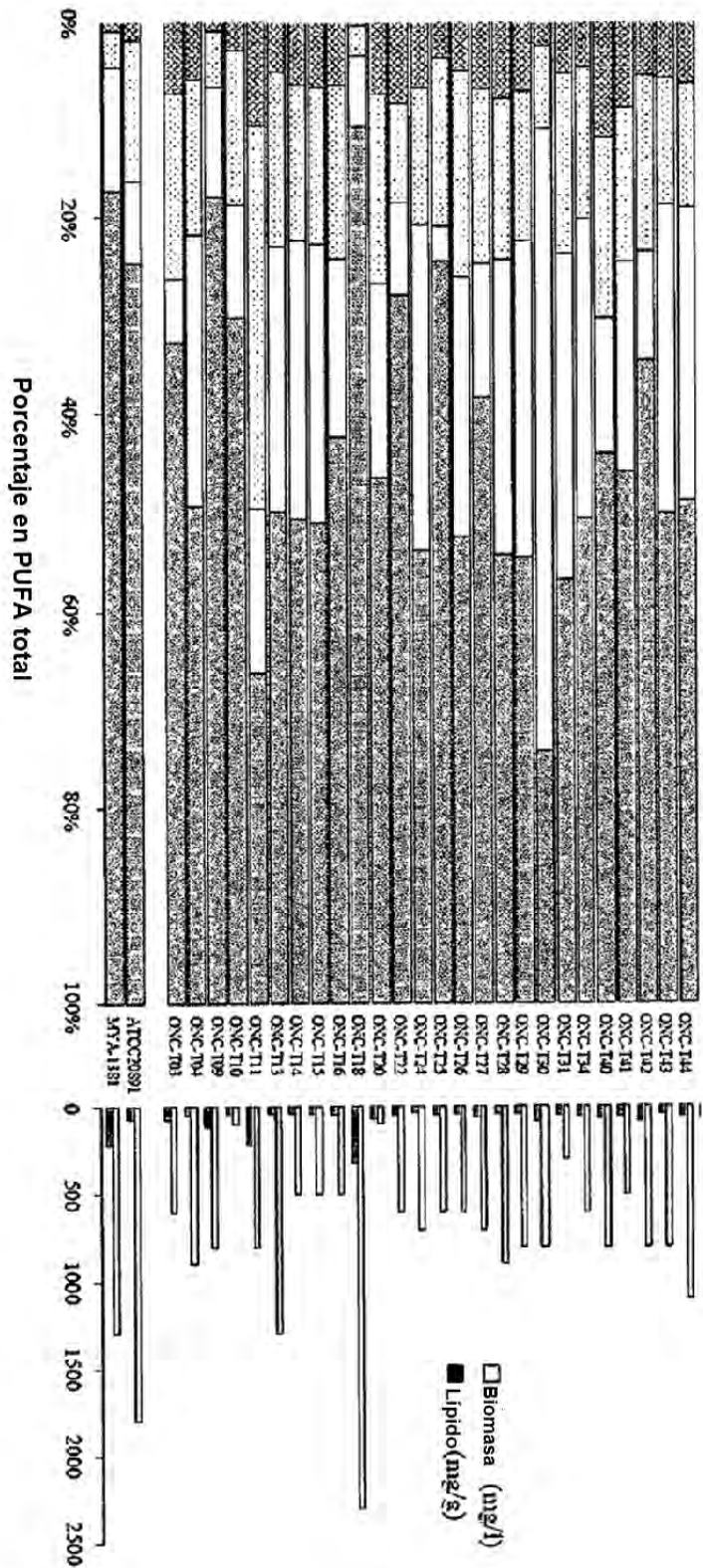


FIGURA 11



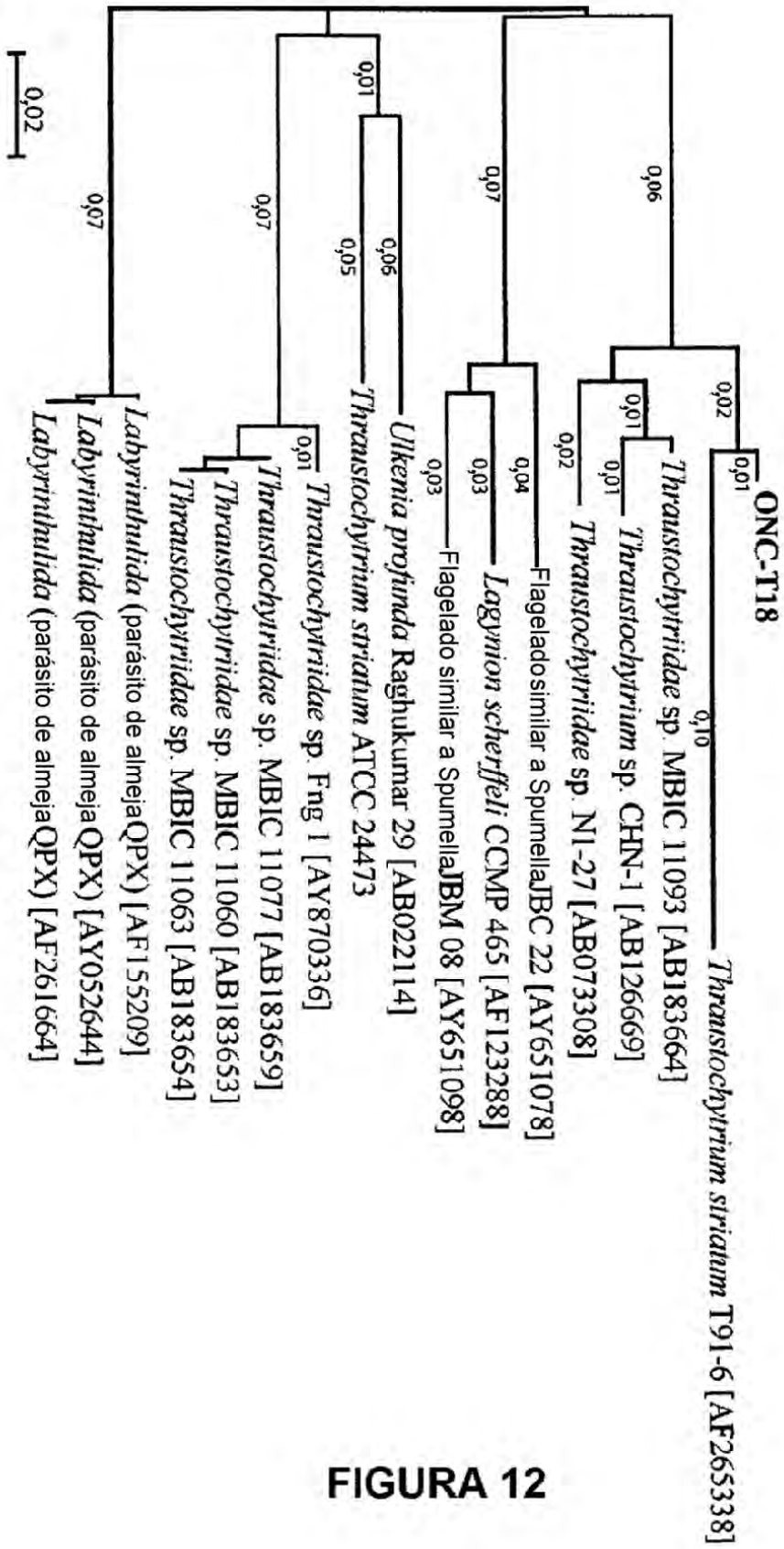
Agrupamiento de aislados recogidos basándose en sus perfiles de PUFA C20 y C22. Clave:

Ácido araquidónico;  Ácido eicosapentaenoico;  Ácido docosapentaenoico, n-6; y

Ácido docosahexaenoico. Los resultados se compararon con dos cepas de referencia: ATCC 20891 y

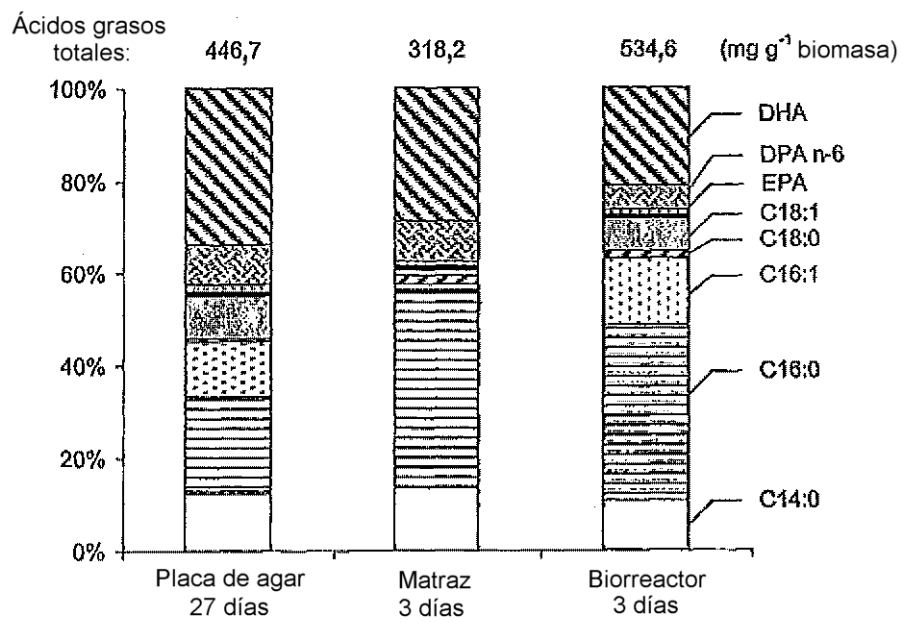
MYA-1381.

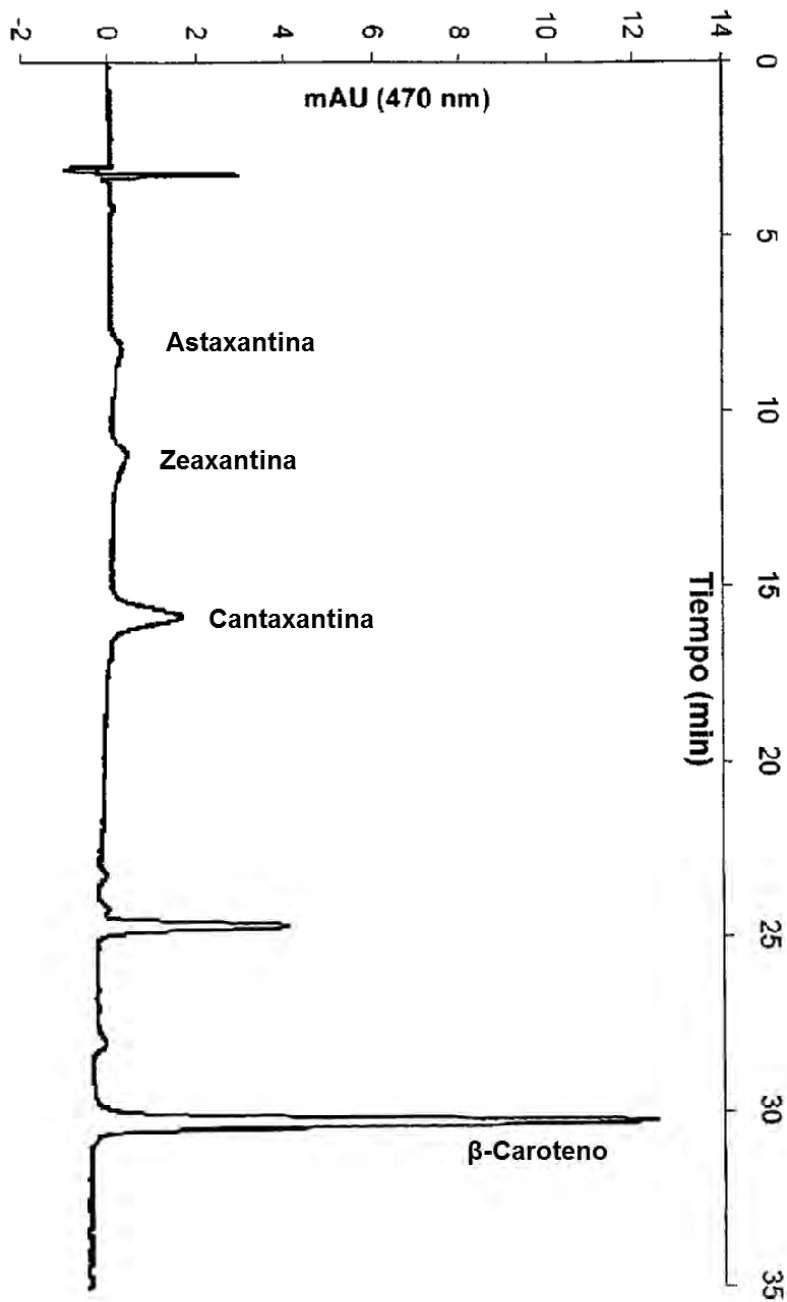
FIGURA 11 (cont)



**FIGURA 12**

**FIGURA 13**

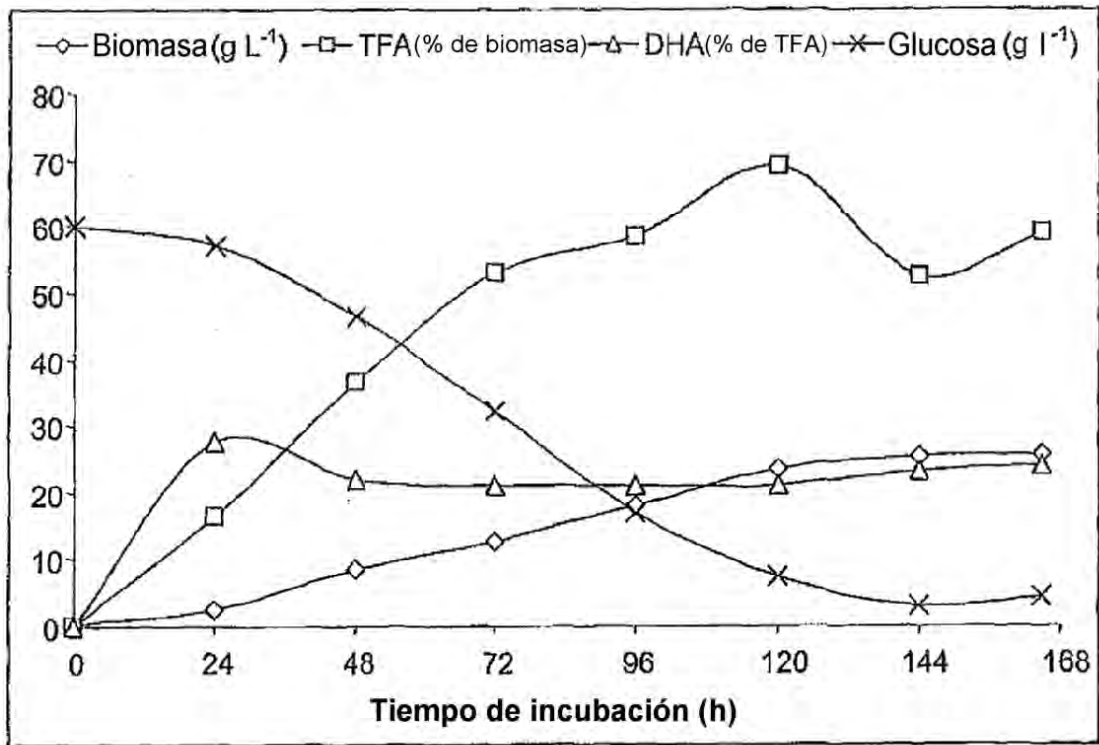




Nombre	Tiempo de retención (min)	Cantidad (µg/ml)	Carotenoide (µg/g)
Astaxantina	8,2	0,38	1,53
Zeaxantina	11,2	0,11	0,42
Cantaxantina	15,2	1,03	4,11
Equinona	24,6	0,37	1,46
β-Caroteno	30,3	5,07	20,23

**FIGURA 14**

**FIGURA 15**





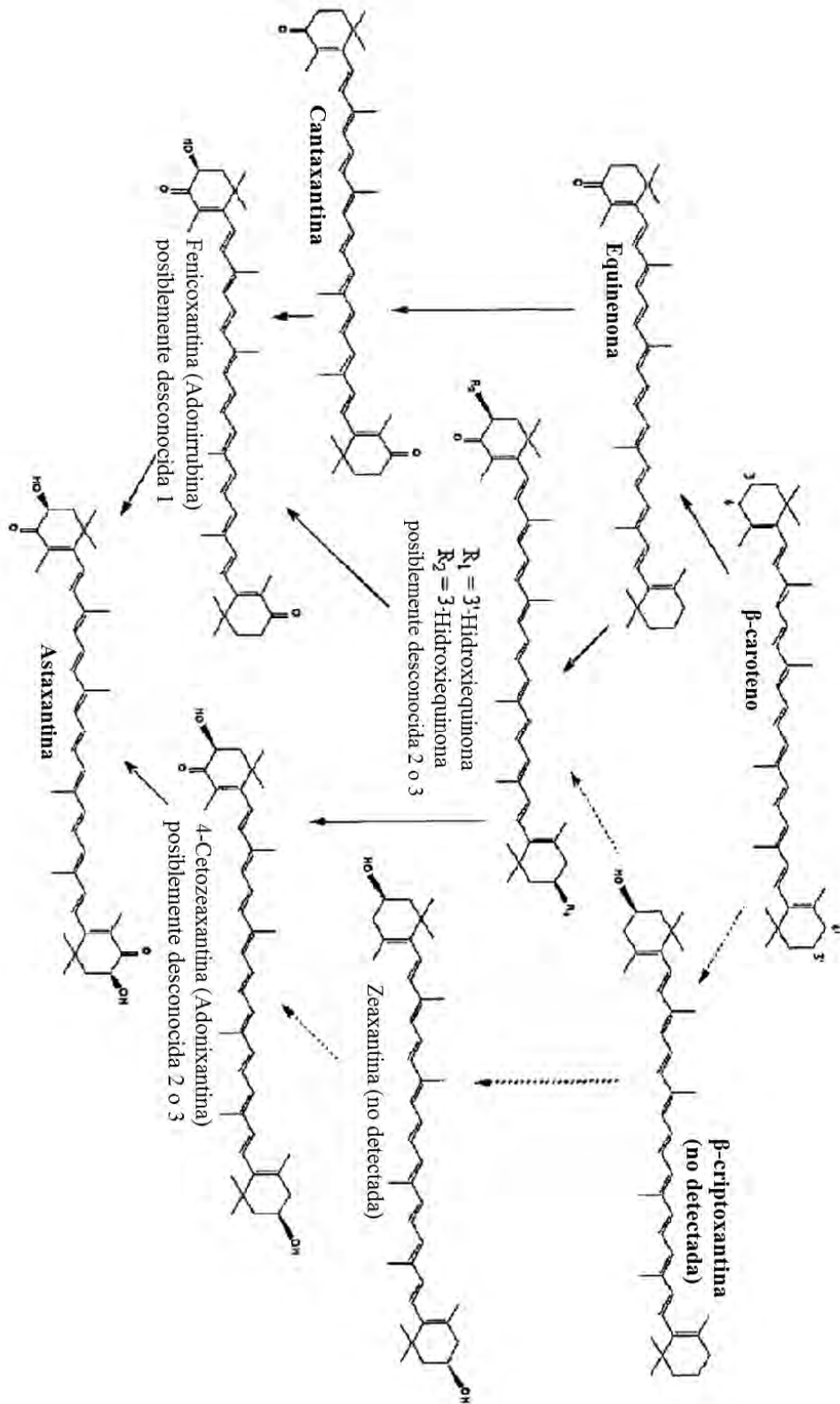


FIGURA 16

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

## Documentos de patentes citados en la descripción

- US 68820705 P [0001]
- US 75140105 P [0001]
- US 5130242 A, Barclay [0033]
- US 6451567 B, Barclay [0035]
- US 6582941 B, Yokochi [0036]
- US 6607900 B, Bailey [0037]
- US 20040161831 A, Komazawa [0038]
- US 5171680 A [0094]
- EP 45665 A [0167]
- CA 9739405 [0167]
- US 4897355 A [0176]
- US 20030193102 A [0196]
- WO 2004041251 A1 [0196]
- US 3610795 A [0200]

## Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- Modified from Ratledge, C. *Lipid Technol.*, 2004, vol. 16, 34-39 [0005]
- *Cochrane Database Syst Rev.*, vol. 3 [0043]
- *Drugs*, vol. 63, 845-53 [0043]
- *Ann Allergy Asthma Immunol*, vol. 90, 371-7 [0043]
- *Prev Cardiol*, vol. 6, 38-1 [0043]
- *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*, vol. 63, 351-62 [0043]
- *Am J Clin Nutr*, vol. 77, 532-43 [0043]
- *J Neural Transm Suppl*, vol. 64, 105-17 [0043]
- *Can J Psychiatry*, vol. 48, 195-203 [0043]
- *Eur J Pediatr*, vol. 162, 122-8 [0043]
- *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, vol. 68, 219-24 [0043]
- SMITH ; WATERMAN. *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482 [0061] [0162]
- NEEDLEMAN ; WUNSCH. *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443 [0061] [0162]
- PEARSON ; LIPMAN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 2444 [0061] [0162]
- ZUKER, M. *Science*, 1989, vol. 244, 48-52 [0062] [0163]
- JAEGER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 7706-7710 [0062] [0163]
- JAEGER et al. *Methods Enzymol*, 1989, vol. 183, 281-306 [0062]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0065]
- KUNKEL et al. *Methods Enzymol*, 1987, vol. 154, 367 [0065]
- METZ et al. *Science*, 2001, vol. 293, 290-3 [0076]
- KAULMANN ; HERTWECK. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, vol. 41, 1866-9 [0076]
- JOSEPH J ; PIGANATIELLS JR. *IIE Trans*, 1998, vol. 20, 247-254 [0078] [0279]
- RICHARD A. PASSWATER ; PH. D. *The Antioxidants - The Nutrients that Guard Your Body*. Keats Publishing Inc, 1985 [0094]
- KUMAR et al. *Pharmac. Ther.*, 1988, vol. 39, 301 [0094]
- MACHLIN L. J. ; BENDICH. *FASEB Journal*, 1987, vol. 1, 441-445 [0094]
- RATLEDGE C. *Lipid Tech.*, 2004, vol. 16, 34-39 [0113]
- LETSINGER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 6553-6556 [0137]
- PASTAN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, vol. 85, 4486 [0144]
- MILLER et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6, 2895 [0144]
- MITANI et al. *Hum. Gene Ther.*, 1994, vol. 5, 941-948 [0144]
- GOODMAN et al. *Blood*, 1994, vol. 84, 1492-1500 [0144]
- NAIDINI et al. *Science*, 1996, vol. 272, 263-267 [0144]
- AGRAWAL et al. *Exper. Hematol.*, 1996, vol. 24, 738-747 [0144]
- SCHWARTZENBERGER et al. *Blood*, 1996, vol. 87, 472-478 [0144]
- TIERS et al. *Nature*, 1978, vol. 273, 113 [0147]
- GREENWAY, P.J. et al. *Gene*, 1982, vol. 18, 355-360 [0147]
- LAIMINS, L. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981, vol. 78, 993 [0148]
- LUSKY, M.L. et al. *Mol. Cell Bio.*, 1983, vol. 3, 1108 [0148]
- BANERJI, J.L. et al. *Cell*, 1983, vol. 33, 729 [0148]
- OSBORNE, T.F. et al. *Mol. Cell Bio.*, 1984, vol. 4, 1293 [0148]
- SOUTHERN P. ; BERG, P. *J Molec. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1, 327 [0155]
- MULLIGAN, R.C. ; BERG, P. *Science*, 1980, vol. 209, 1422 [0155]
- SUGDEN, B. et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 410-413 [0155]

- T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*. W. H. Freeman & Co, 1983, 79-86 [0160]
- JAEGER et al. *Methods Enzymol.*, 1989, vol. 183, 281-306 [0163]
- 5 • THORSON et al. *Methods in Mol. Biol.*, 1991, vol. 77, 43-73 [0166]
- ZOLLER. *Curr. Opin. Biotech.*, 1992, vol. 3, 348-354 [0166]
- 10 • IBBA. *Biotechnol. Genet. Eng.*, 1995, vol. 13, 197-216 [0166]
- CAHILL et al. *Trends Biochem. Sci.*, 1989, vol. 14, 400-403 [0166]
- 15 • BENNER. *Trends. Biotechnol.*, 1994, vol. 12, 158-163 [0166]
- SPATOLA, A. F. *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*. Marcel Dekker, 1983, 267 [0167]
- 20 • SPATOLA, A.F. *Vega Data. Peptide Backbone Modifications*, March 1983, vol. 1 [0167]
- MORLEY. *Trends Pharm. Sci.*, 1980, 463-468 [0167]
- HUDSON, D. et al. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1979, vol. 14, 177-185 [0167]
- 25 • SPATOLA et al. *Life Sci.*, 1986, vol. 38, 1243-1249 [0167]
- HANN. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1982, 1307-314 [0167]
- 30 • ALMQUIST et al. *J. Med. Chem.*, 1980, vol. 23, 1392-1398 [0167]
- JENNINGS-WHITE et al. *Tetrahedron Lett.*, 1982, vol. 23, 2533 [0167]
- 35 • HOLLADAY et al. *Tetrahedron Lett.*, 1983, vol. 24, 4401-4404 [0167]
- HRUBY. *Life Sci.*, 1982, vol. 31, 189-199 [0167]
- RIZO ; GIERASCH. *Ann. Rev. Biochem.*, 1992, vol. 61, 387 [0169]
- 40 • *Methods in Cell Biology*. Academic Press, 1976, vol. XIV, 33 [0175]
- BRIGHAM et al. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 1989, vol. 1, 95-100 [0176]
- 45 • FEIGNER et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, vol. 84, 7413-7 [0176]
- SENTER et al. *Bioconjugate Chem.*, 1991, vol. 2, 447-451 [0201]
- 50 • BAGSHAWE, K.D. *Br. J. Cancer*, 1989, vol. 60, 275-281 [0201]
- BAGSHAWE et al. *Br. J. Cancer*, 1988, vol. 58, 700-703 [0201]
- SENTER et al. *Bioconjugate Chem.*, 1993, vol. 4, 3-9 [0201]
- 55 • BATTELLI et al. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1992, vol. 35, 421-425 [0201]
- PIETERSZ ; MCKENZIE. *Immunolog. Reviews*, 1992, vol. 129, 57-80 [0201]
- 60 • ROFFLER et al. *Biochem. Pharmacol.*, 1991, vol. 42, 2062-2065 [0201]
- HUGHES et al. *Cancer Research*, 1989, vol. 49, 6214-6220 [0201]
- LITZINGER ; HUANG. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, vol. 1104, 179-187 [0201]
- BROWN ; GREENE. *DNA and Cell Biology*, 1991, vol. 10, 399-409 [0201]
- REMINGTON. *The Science and Practice of Pharmacy*. Mack Publishing Company, 1995 [0203]
- *Handbook of Monoclonal Antibodies*. Noges Publications, 1985, 303-357 [0211]
- SMITH et al. *Antibodies in Human Diagnosis and Therapy*. Raven Press, 1977, 365-389 [0211]
- SENTER et al. *Bioconjugate Chem*, 1991, vol. 2, 447-51 [0212]
- BAGSHAWE. *Br J Cancer*, 1989, vol. 60, 275-81 [0212]
- BAGSHAWE et al. *Br J Cancer*, 1988, vol. 58, 700-3 [0212]
- SENTER et al. *Bioconjugate Chem*, 1993, vol. 4, 3-9 [0212]
- BATTELLI et al. *Cancer Immunol Immunother*, 1992, vol. 35, 421-5 [0212]
- PIETERSZ ; MCKENZIE. *Immunolog Reviews*, 1992, vol. 129, 57-80 [0212]
- ROFFLER et al. *Biochem Pharmacol*, 1991, vol. 42, 2062-5 [0212]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0221]
- IKUTA et al. *Ann. Rev. Biochem.*, 1984, vol. 53, 323-356 [0221]
- NARANG et al. *Methods Enzymol.*, 1980, vol. 65, 610-620 [0221]
- NIELSEN et al. *Bioconjug. Chem.*, 1994, vol. 5, 3-7 [0221]
- GRANT GA. *Synthetic Peptides: A User Guide*. W.H. Freeman and Co, 1992 [0222]
- *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc, 1993 [0222]
- ABRAHMSSEN L et al. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 4151 [0223]
- DAWSON et al. *Science*, 1994, vol. 266, 776-779 [0223]
- BAGGIOLINI M et al. *FEBS Lett.*, 1992, vol. 307, 97-101 [0223]
- CLARK-LEWIS I et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 16075 [0223]
- CLARK-LEWIS I et al. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 3128 [0223]
- RAJARATHNAM K et al. *Biochemistry*, 1994, vol. 33, 6623-30 [0223]
- SCHNOLZER, M. et al. *Science*, 1992, vol. 256, 221 [0224]
- DE LISLE MILTON RC et al. *Techniques in Protein Chemistry IV*. Academic Press, 1992, 257-267 [0224]
- BLIGH ; DYER. *Can J. Biochem. Physiol*, 1959, vol. 37, 912-917 [0295]
- LEWIS et al. *J Microbiol. Methods*, 2000, vol. 43, 107-116 [0295]

- **CARTENS et al.** *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, vol. 73, 1025-1031 [0295]
- **PINKART et al.** *J. Microbiol. Methods*, 1998, vol. 34, 9-15 [0295]
- 5 • **BATEMAN ; JENKINS.** *J. Agric. Food Chem.*, 1997, vol. 45, 132-135 [0295]
- **BREMER.** *Marine Mycology - A Practical Approach.* Fungal Diversity Press, 2000, 49-61 [0297]
- 10 • **BOWLES et al.** *J Biotechnol*, 1999, vol. 70, 193-202 [0298] [0305] [0315]
- **LEWIS et al.** *J Microbiol Meth.*, 2000, vol. 43, 107-116 [0299]
- 15 • **VINDA et al.** *J Eukaryot Microbiol.*, 1999, vol. 46, 637-647 [0301]
- **MO et al.** *Mar Biol*, 2002, vol. 140, 883-889 [0301]
- **BENSON et al.** *Nucleic Acids Res*, 2005, vol. 33, D34-38 [0301]
- 20 • **SAITO ; NEI.** *Mol Biol Evol*, 1987, vol. 4, 406-425 [0301]
- **FELSENSTEIN.** *Evolution*, 1985, vol. 39, 783-791 [0301]
- 25 • **LEWIS et al.** *J Microbiol Meth*, 2000, vol. 43, 107-116 [0304]
- **HUANG et al.** *Mar Biotechnol*, 2003, 5450-457 [0305]
- **BARCLAY et al.** *J Appl Phycol*, 1994, vol. 6, 123-129 [0305]
- 30 • **YOKOCHI et al.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, vol. 49, 72-76 [0305] [0312]
- **HUANG et al.** *Mar Biotechnol*, 2003, vol. 5, 450-457 [0306] [0307] [0315]
- **LEANDER ; PORTER.** *Mycologia*, 2001, vol. 93, 459-464 [0307]
- **CARMONA et al.** *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, vol. 67, 884-888 [0307]
- **NAKAHARA et al.** *J Am Oil Chem Soc*, 1996, vol. 73, 1421-1426 [0308] [0309]
- **ELLENBOGEN et al.** *Comp Biochem Physiol*, 1969, vol. 29, 805-81 [0308]
- **ILDA et al.** *J Ferment Bioeng*, 1996, vol. 81, 76-78 [0309] [0311] [0312]
- **VALADON.** *Trans Br Mycol Soc*, 1976, vol. 67, 1-15 [0310]
- **CARMONA et al.** *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, vol. 67 [0310]
- **HUANG et al.** *Mar Biotechnol*, 2003, vol. 5, 450457 [0310]
- **SIJTSMA et al.** *Recent Res Devel Microbiol*, 1998, vol. 2, 219-232 [0311]
- **BAJPAI et al.** *J Am Oil Chem Soc*, 1991, vol. 68, 509-514 [0312]
- **LI ; WARD.** *Ind Microbiol*, 1994, vol. 13, 238-241 [0312]
- **AKI et al.** *J Am Oil Chem Soc*, 2003, vol. 80, 789-794 [0312]
- **BAJPAI et al.** *J Am Oil Chem Soc*, 1991, vol. 68, 509-514 [0314]