

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 975**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2011 PCT/IB2011/051991**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011 WO11141855**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2011 E 11723681 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2569427**

54 Título: **Procedimiento de producción de pachulol y 7-epi-alfa-selineno**

30 Prioridad:

10.05.2010 US 333002 P
10.05.2010 EP 10162433

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2018

73 Titular/es:

FIRMENICH SA (100.0%)
1, route des Jeunes, P.O. Box 239
1211 Geneva 8, CH

72 Inventor/es:

SCHALK, MICHEL y
DEGUERRY, FABIENNE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 655 975 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

Procedimiento de producción de pachulol y 7-epi-alfa-selineno

Campo técnico

5 La presente invención proporciona un procedimiento de producción de pachulol y 7-epi-a-selineno, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto al menos un polipéptido con pirofosfato de farnesilo (FPP). En particular, dicho procedimiento puede llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo* para producir pachulol y 7-epi-a-selineno, compuestos que pueden ser útiles en el campo de la perfumería.

Estado de la técnica

10 Los terpenos se encuentran en la mayoría de los organismos (microorganismos, animales y plantas). Estos compuestos están constituidos de unidades de cinco carbonos llamadas unidades de isopreno y se clasifican por el número de estas unidades presentes en su estructura. Así, los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos son terpenos que contienen 10, 15 y 20 átomos de carbono, respectivamente. Los sesquiterpenos, por ejemplo, son ampliamente encontrados en el reino de las plantas. Muchas moléculas de sesquiterpeno son conocidas por sus propiedades de aroma y fragancia y sus efectos cosméticos, medicinales y antimicrobianos. Se han identificado más
15 de 300 hidrocarburos de sesquiterpeno y 3000 sesquiterpenoides y cada año se identifican muchas estructuras nuevas. Los extractos de planta obtenidos por diferentes medios tales como destilación con vapor o extracción con disolvente se usan como fuente de terpenos. Las moléculas de terpeno se usan frecuentemente como tales, pero en algunos casos se usan reacciones químicas para transformar los terpenos en otras moléculas de alto valor.

20 La producción biosintética de los terpenos implica a enzimas llamadas las terpeno sintasas. Existe prácticamente una infinidad de sesquiterpeno sintasas presentes en el reino de las plantas, todas usando el mismo sustrato (pirofosfato de farnesilo, FPP), pero que tienen diferentes perfiles de producto. Han sido clonados genes y ADNc que codifican sesquiterpeno sintasas y caracterizado las enzimas recombinantes correspondientes. La biosíntesis de los terpenos en plantas y otros organismos ha sido ampliamente estudiada y no se detalla más aquí.

25 Generalmente, el precio y la disponibilidad de los extractos naturales de planta dependen de la abundancia, rendimiento del aceite y origen geográfico de las plantas. Además, la disponibilidad y calidad de los extractos naturales es muy dependiente del clima y otras condiciones locales que conducen a la variabilidad de año a año, haciendo que el uso de tales componentes en la perfumería de alta calidad sea muy difícil o incluso imposible algunos años.

30 El aceite de valeriana es uno de estos extractos naturales. Es un aceite aromático, del que algunos componentes pueden ventajosamente usarse en el campo de la perfumería y los aromas. Sin embargo, la purificación de estos constituyentes individuales del aceite no es factible a gran escala.

Un procedimiento independiente de la planta de producción de los constituyentes del aceite de valeriana sería, por tanto, muy deseable, pero hasta la fecha no está disponible una síntesis química rentable de tales compuestos.

35 El pachulol y 7-epi-a-selineno son moléculas de sesquiterpeno que existen de forma natural, que son útiles en el campo de la perfumería y los aromas. Una vía bioquímica que conduce a la síntesis de pachulol y 7-epi-a-selineno sería, por tanto, de gran interés.

40 El análisis de la composición del aceite de *Valeriana jatamansi* mostró que el pachulol era el principal constituyente de este aceite. Véase, por ejemplo, Mathela C.S. y col. (2005), Chem. Biodivers. 2(9), 1174-1182 y Bos R. y col. Flav. Fragr. J. 12(2), 123-131. Sin embargo, este documento no proporciona ni incluso sugiere una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que conduzca a la producción de pachulol y 7-epi-a-selineno.

Una sesquiterpeno sintasa capaz de sintetizar pachulol ya ha sido descrita en el documento WO 2005/052163. Se ha informado una sesquiterpeno sintasa capaz de sintetizar 7-epi-a-selineno sintasa en Lucker y col. (2004), Phytochemistry 65, 2649-2659. Sin embargo, una sesquiterpeno sintasa capaz de sintetizar tanto pachulol como 7-epi-a-selineno nunca ha sido desvelada en el estado de la técnica.

45 El porcentaje de identidad entre las sesquiterpeno sintasas conocidas y el polipéptido de la invención es muy bajo. En particular, la pachulol sintasa descrita en el documento WO 2005/052163 es solo el 39 % idéntica a la sesquiterpeno sintasa de la invención. La secuencia de proteínas más próxima a la sesquiterpeno sintasa de la invención son una vetispiradieno sintasa de *Solanum tuberosus* (acceso de NCBI N.º AAD02269) y una proteína predicha de *Populus trichocarpa* (acceso de NCBI N.º XP_002321642 que tienen ambas el 49 % de identidad con la presente sesquiterpeno sintasa. El documento US6468772 desvela procedimientos de identificación y alteración de grupos R asociados a carbonos alfa encontrados en el sitio activo de terpeno sintasas para crear novedosas terpeno sintasas.
50

El documento WO2000/017327 desvela novedosas sintasas y ácidos nucleicos correspondientes, en el que las sintasas tienen un sitio activo en que el que restos de aminoácidos clave se modifican para generar los productos de

terpenoide deseados.

'The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases' por Duguerry y col. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol 1.454, N.º 2, 15/10/06, páginas 123-136, describe el aislamiento y la caracterización genes de sintasa de aceite de pachuli.

5 A pesar de los amplios estudios de ciclación de terpenos, el aislamiento y la caracterización de las terpeno sintasas es todavía difícil, particularmente en plantas, debido a su baja abundancia, sus patrones de expresión frecuentemente transitorios, y la complejidad de purificarlos de las mezclas de resinas y compuestos fenólicos en tejidos donde se expresan.

10 Es un objetivo de la presente invención proporcionar procedimientos de preparación de pachulol y 7-epi- α -selineno de una forma económica, como se indica anteriormente. Por consiguiente, la presente invención tiene el objetivo de producir pachulol y 7-epi- α -selineno mientras que tiene poco residuo, un proceso más eficiente en energía y recursos, y mientras que reduce la dependencia de combustibles fósiles.

Abreviaturas usadas

	pb	par de bases
15	BSA	albúmina de suero bovino
	ADNc	ADN complementario
	ADN	ácido desoxirribonucleico
	dNTP	desoxinucleótido trifosfato
	DTT	ditiotreitól
20	FPP	pirofosfato de farnesilo
	CG	cromatografía de gases
	IPTG	isopropil-D-tiogalacto-piranósido
	LB	caldo de lisogenia
	MOPSO	ácido 3-(N-morfolino)-2-hidroxiopropanosulfónico
25	EM	espectrómetro de masas
	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
	RMCE	intercambio de casete mediado por recombinasa
	3' 75'-RACE	amplificación rápida de los extremos de ADNc 3' y 5'
	ARN	ácido ribonucleico
30	ARNm	ácido ribonucleico mensajero

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para producir biosintéticamente pachulol y 7-epi- α -selineno de una forma económica, fiable y reproducible.

35 Una "sesquiterpeno sintasa" o un "polipéptido que tiene una actividad de sesquiterpeno sintasa" está previsto aquí como un polipéptido capaz de catalizar la síntesis de una molécula de sesquiterpeno o de una mezcla de moléculas de sesquiterpeno del precursor de terpeno acíclico FPP.

40 Como "pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa" o como "polipéptido que tiene una actividad de pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa", los presentes inventores indican aquí un polipéptido capaz de catalizar la síntesis de tanto el pachulol como el 7-epi- α -selineno a partir de FPP. El pachulol y el 7-epi- α -selineno pueden ser los únicos productos o pueden ser parte de una mezcla con otros sesquiterpenos.

La capacidad de un polipéptido para catalizar la síntesis de sesquiterpenos particulares (por ejemplo, pachulol y 7-epi- α -selineno) puede ser simplemente confirmada realizando el ensayo enzimático que se detalla en el Ejemplo 2.

45 Según la presente invención, también se indica que los polipéptidos incluyen polipéptidos truncados, a condición de que mantengan su actividad de sesquiterpeno sintasa como se define en cualquiera de las realizaciones de la presente invención y que compartan al menos el porcentaje de identidad definido con el fragmento correspondiente de SEQ ID NO: 1.

50 Como se pretende en el presente documento más adelante, "una secuencia de nucleótidos obtenida modificando SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma" engloba cualquier secuencia que ha sido obtenida cambiando la secuencia de SEQ ID NO: 2 o del complemento de la misma usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo introduciendo cualquier tipo de mutaciones tales como mutaciones de delección, inserción o sustitución. Ejemplos de tales procedimientos se citan en la parte de la descripción con respecto a los polipéptidos de variante y los procedimientos para prepararlos.

55 El porcentaje de identidad entre dos secuencias peptídicas o nucleotídicas es una función del número de aminoácidos o restos de nucleótidos que son idénticos en las dos secuencias cuando se ha generado un alineamiento de estas dos secuencias. Restos idénticas se definen como restos que son iguales en las dos

secuencias en una posición dada del alineamiento. El porcentaje de identidad de secuencia, como se usa en el presente documento, se calcula a partir del alineamiento óptimo tomando el número de restos idénticos entre dos secuencias dividiéndolo entre el número total de restos en la secuencia más corta y multiplicando por 100. El alineamiento óptimo es el alineamiento en el que el porcentaje de identidad es el más alto posible. Pueden introducirse huecos en una o ambas secuencias en una o más posiciones del alineamiento para obtener el alineamiento óptimo. Estos huecos se tienen entonces en cuenta como restos no idénticos para el cálculo del porcentaje de identidad de secuencia.

El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos puede lograrse de diversas formas usando programas informáticos y, por ejemplo, programas informáticos públicamente disponibles disponible de la web mundial. Preferentemente, puede usarse el programa BLAST (Tatiana y col, FEMS Microbiol Lett., 1999, 174:247-250, 1999) establecido a los parámetros por defecto, disponible del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/bl2seq/wblast2.cgi>, para obtener un alineamiento óptimo de secuencias peptídicas o nucleotídicas y para calcular el porcentaje de identidad de secuencia.

Es un objeto de la presente invención, por tanto, un procedimiento de producción de pachulol y 7-epi- α -selineno que comprende

- a) poner en contacto FPP con al menos un polipéptido que tiene una actividad de pachulol y 7-epi-a-selineno sintasa y que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 % idéntica a SEQ ID NO: 1; en el que dicho poner en contacto es *in vitro*, o *in vivo* en un organismo o célula transformada para expresar dicho polinucleótido;
- b) opcionalmente, aislar el pachulol y el 7-epi- α -selineno producidos en la etapa a).

Según una realización preferida, el procedimiento es un procedimiento para producir pachulol y 7-epi- α -selineno como productos principales. Según una realización incluso más preferida, el pachulol y el 7-epi- α -selineno representan en total al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, preferentemente al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % del producto producido por el procedimiento de la invención.

Según otra realización de la invención, el 7-epi- α -selineno es el producto principal y el pachulol es el segundo producto principal. Por ejemplo, el 7-epi- α -selineno puede representar al menos el 20 %, preferentemente al menos el 30 %, preferentemente al menos el 34 % del producto obtenido por el procedimiento de la invención. Como otro ejemplo, el pachulol puede representar al menos el 10 %, preferentemente al menos el 15 %, preferentemente al menos el 16 % del producto obtenido por el procedimiento de la invención.

Según una realización preferida, el producto del procedimiento de la presente invención comprende además al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en germacreno A, α -guaieno, α -humuleno, α -selineno, seicheleno, α -pachuleno, α -bulneseno y (E)-nerolidol, definiéndose estos compuestos por la forma de su estructura como se representa en la Figura 1. En una realización más preferida, el producto del procedimiento de la presente invención comprende todos estos compuestos.

El procedimiento puede llevarse a cabo *in vitro*, además de *in vivo*, como se explicará en detalle más adelante.

El polipéptido que va a ponerse en contacto con FPP *in vitro* puede obtenerse por extracción de cualquier organismo que lo expresa, usando tecnologías de extracción de proteínas o enzimas convencionales. Si el organismo hospedador es un organismo unicelular o célula que libera el polipéptido de la invención en el medio de cultivo, el polipéptido puede simplemente ser recogido del medio de cultivo, por ejemplo por centrifugación, opcionalmente seguido de etapas de lavado y resuspensión en soluciones de tampón adecuadas. Si el organismo o célula acumula el polipéptido dentro de sus células, el polipéptido puede obtenerse por rotura o lisis de las células y adicionalmente extracción del polipéptido del lisado celular.

El polipéptido que tiene una actividad de pachulol y 7-epi-a-selineno sintasa, ya sea en una forma aislada o junto con otras proteínas, por ejemplo en un extracto de proteína en bruto obtenido de células cultivadas o microorganismos, puede entonces suspenderse en una solución de tampón a pH óptimo. Si es adecuado, pueden añadirse sales, BSA y otros tipos de co-factores enzimáticos con el fin de optimizar la actividad enzimática. Condiciones apropiadas se describen en más detalle en los ejemplos más adelante.

El precursor FPP puede entonces añadirse a la suspensión o solución, que entonces se incuba a temperatura óptima, por ejemplo entre 15 y 40 °C, preferentemente entre 25 y 35 °C, más preferentemente a 30 °C. Después de la incubación, pueden aislarse el pachulol y 7-epi- α -selineno, y opcionalmente los otros subproductos de sesquiterpeno producidos, de la solución incubada por procedimientos de aislamiento convencionales, tales como extracción con disolvente y destilación, opcionalmente después de eliminar los polipéptidos de la solución.

Según otra realización preferida, el procedimiento de cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas se lleva a cabo *in vivo*. En este caso, la etapa a) comprende cultivar un organismo hospedador no humano o célula capaz de producir FPP y transformarlo para expresar al menos un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos

al menos el 70 % idéntica a SEQ ID NO: 1 y que tiene una actividad de pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa, en condiciones propicias para la producción de pachulol y 7-epi- α -selineno.

5 Según una realización más preferida, el procedimiento comprende además, antes de la etapa a), transformar un organismo no humano o célula capaz de producir FPP con al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 % idéntica a SEQ ID NO: 1 y que tiene una actividad de pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa, de manera que dicho organismo exprese dicho polipéptido.

Estas realizaciones de la invención son particularmente ventajosas, ya que es posible llevar a cabo el procedimiento *in vivo* sin aislar previamente el polipéptido. La reacción se produce directamente dentro del organismo o célula transformado para expresar dicho polipéptido.

10 Según una realización particular de la invención, el al menos un ácido nucleico que codifica el pachulol y la 7-epi- α -selineno sintasa comprende una secuencia de nucleótidos al menos el 50 %, preferentemente al menos el 55 %, preferentemente al menos el 60 %, preferentemente al menos el 65 %, preferentemente al menos el 70 %, preferentemente al menos el 75 %, preferentemente al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 % e incluso más preferentemente al menos el 98 % idéntica a SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma. Según una realización incluso más preferida, dicho ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma. En una realización más preferida, dicho ácido nucleico consiste en SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma.

20 Según una realización preferida, el al menos un ácido nucleico usado en cualquiera de las realizaciones anteriores comprende una secuencia de nucleótidos que ha sido obtenida modificando SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma. Según una realización incluso más preferida, dicho al menos un ácido nucleico consiste en una secuencia de nucleótidos que ha sido obtenida modificando SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma.

Según otra realización, el al menos un ácido nucleico se aísla de *Valeriana jatamansi*.

25 Se indica que el organismo o célula "expresa" un polipéptido, a condición de que el organismo o célula se transforme para alojar un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido, este ácido nucleico se transcribe en ARNm y el polipéptido se encuentra en el organismo hospedador o célula. El término "expresar" engloba "expresar heterológamente" y "expresar en exceso", el último con referencia a niveles de ARNm, polipéptido y/o actividad enzimática, además de lo que se mide en un organismo o célula no transformado. Una descripción más detallada de procedimientos adecuados para transformar un organismo hospedador no humano o célula se describirá después en el parte de la memoria descriptiva que se dedica a tales organismos hospedadores no humanos transformados o células y en los ejemplos.

30 Se indica que un organismo o célula particular es "capaz de producir FPP" cuando produce FPP naturalmente o cuando no producen FPP naturalmente, pero se transforma para producir FPP, ya sea antes de la transformación con un ácido nucleico como se describe en el presente documento o junto con dicho ácido nucleico. Organismos o células transformados para producir una cantidad más alta de FPP que el organismo que existe de forma natural o célula también están englobados por los "organismos o células capaces de producir FPP". Procedimientos para transformar organismos, por ejemplo microorganismos, de manera que produzcan FPP ya son conocidos en la técnica. Tales procedimientos pueden encontrarse, por ejemplo, en la bibliografía, por ejemplo en las siguientes publicaciones Martin, V.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D. y Keasling, J.D. *Nat Biotechnol.*, 2003, 21(7), 796-802 (transformación de *E. coli*); Wu, S., Schalk, M., Clark, A., Miles, R.B., Coates, R. y Chappell, J., *Nat Biotechnol.*, 2006, 24(11), 1441-1447 (transformación de plantas); Takahashi, S., Yeo, Y., Greenhagen, B. T., McMullin, T., Song, L., Maurina-Brunker, J., Rosson, R., Noel, J., Chappell, J, *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(1), 170-181 (transformación de levadura).

45 Para llevar a cabo la invención *in vivo*, el organismo hospedador o célula se cultiva en condiciones propicias para la producción de pachulol y 7-epi- α -selineno. Por consiguiente, si el hospedador es una planta transgénica, se proporcionan condiciones de crecimiento óptimas, tales como condiciones óptimas de luz, agua y nutrientes, por ejemplo. Si el hospedador es un organismo unicelular, condiciones propicias para la producción de pachulol y 7-epi- α -selineno pueden comprender la adición de cofactores adecuados al medio de cultivo del hospedador. Además, puede seleccionarse un medio de cultivo para maximizar la síntesis de pachulol y 7-epi- α -selineno. Condiciones de cultivo óptimas se describen de un modo más detallado en los siguientes ejemplos.

50 Organismos hospedadores no humanos adecuados para llevar a cabo el procedimiento de la invención *in vivo* pueden ser cualquier organismo multicelular o unicelular no humano. En una realización preferida, el organismo hospedador no humano usado para llevar a cabo la invención *in vivo* es una planta, un procarionta o un hongo. Puede usarse cualquier planta, procarionta u hongo. Plantas particularmente útiles son aquellas que producen naturalmente altas cantidades de terpenos. En una realización más preferida, la planta está seleccionada de la familia de *Solanaceae*, *Poaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Asteraceae* o *Lamiaceae*. Por ejemplo, la planta está seleccionada de los géneros *Nicotiana*, *Solanum*, *Sorghum*, *Arabidopsis*, *Brassica* (colza), *Medicago* (alfalfa), *Gossypium* (algodón), *Artemisia*, *Salvia* y *Mentha*. Preferentemente, la planta pertenece a la especie de *Nicotiana tabacum*.

En una realización más preferida, el organismo hospedador no humano usado para llevar a cabo el procedimiento de la invención *in vivo* es un microorganismo. Puede usarse cualquier microorganismo, pero según una realización incluso más preferida, dicho microorganismo es una bacteria o levadura. Lo más preferentemente, dicha bacteria es *E. coli* y dicha levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

5 Algunos de estos organismos no producen FPP naturalmente. Para ser adecuados para llevar a cabo el procedimiento de la invención, estos organismos tienen que transformarse para producir dicho precursor. Así, pueden transformarse ya sea antes de la modificación con el ácido nucleico descrito según cualquiera de las realizaciones anteriores o simultáneamente, como se ha explicado anteriormente.

10 También puede usarse células eucariotas superiores aisladas, en lugar de organismos completos, como hospedadores para llevar a cabo el procedimiento de la invención *in vivo*. Células eucariotas adecuadas pueden ser cualquier célula no humana, pero son preferentemente células de planta o fúngicas.

15 Según una realización preferida, el al menos un polipéptido que tiene una actividad de pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa usado en cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas o codificado por el ácido nucleico usado en cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas comprende una secuencia de aminoácidos, preferentemente al menos el 75 %, preferentemente al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 % e incluso más preferentemente al menos el 98 % idéntica a SEQ ID NO: 1. Según una realización más preferida, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. En una realización incluso más preferida, dicho polipéptido consiste en SEQ ID NO: 1.

20 Según otra realización preferida, el al menos un polipéptido que tiene una actividad de pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa usado en cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas o codificado por el ácido nucleico usado en cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas comprende una secuencia de aminoácidos que es una variante de SEQ ID NO: 1 obtenida por ingeniería genética. En otros términos, dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que ha sido obtenida modificando SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma. Según una realización más preferida, el al menos un polipéptido que
25 tiene una actividad de pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa usado en cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas o codificado por el ácido nucleico usado en cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas consiste en una secuencia de aminoácidos que es una variante de SEQ ID NO: 1 obtenida por ingeniería genética, es decir, una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que ha sido obtenida modificando SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma.

30 Como se usa en el presente documento, el polipéptido está previsto como un polipéptido o fragmento de péptido que engloba las secuencias de aminoácidos identificadas en el presente documento, además de polipéptidos truncados o de variante, a condición de que mantengan su actividad como se ha definido anteriormente y que compartan al menos el porcentaje de identidad definido con el fragmento correspondiente de SEQ ID NO: 1.

35 Ejemplos de polipéptidos de variante son proteínas que existen de forma natural que resultan de eventos de corte y empalme de ARNm alternativos o de escisión proteolítica de los polipéptidos descritos en el presente documento. Variaciones atribuibles a la proteólisis incluyen, por ejemplo, diferencias en los extremos N o C tras la expresión en diferentes tipos de células hospedadoras, debido a eliminación proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de los polipéptidos de la invención. Los polipéptidos codificados por un ácido nucleico obtenido por mutación natural o artificial de un ácido nucleico de la invención, como se describe más adelante, también están englobados por la
40 invención.

También pueden usarse variantes de polipéptido resultantes de una fusión de secuencias de péptidos adicionales en los extremos amino y carboxilo en los procedimientos de la invención. En particular, una fusión tal puede potenciar la expresión de los polipéptidos, ser útil en la purificación de la proteína o mejorar la actividad enzimática del polipéptido en un entorno o sistema de expresión deseado. Tales secuencias de péptidos adicionales pueden ser
45 péptidos señal, por ejemplo. Por consiguiente, la presente invención engloba procedimientos usando polipéptidos de variante, tales como aquellos obtenidos por fusión con otros oligo- o polipéptidos y/o aquellos que están unidos a péptidos señal. Los polipéptidos resultantes de una fusión con otra proteína funcional, tal como otra proteína de la vía de biosíntesis de los terpenos, también pueden ser usados ventajosamente en los procedimientos de la invención.

50 Según otra realización, el al menos un polipéptido que tiene una actividad de pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa usado en cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas o codificado por el ácido nucleico usado en cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas se aísla de *Vaderiana jatamansi*.

Una herramienta importante para llevar a cabo el procedimiento de la invención es el polipéptido en sí. Un polipéptido que tiene una actividad de pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa y que comprende una secuencia de
55 aminoácidos al menos el 50 % idéntica a SEQ ID NO: 1. Según una realización preferida, el polipéptido es capaz de producir pachulol y 7-epi- α -selineno como los principales productos. Según una realización incluso más preferida, el pachulol y el 7-epi- α -selineno representan en total al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, preferentemente al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % del

producto producido por el polipéptido.

5 Según otra realización de la invención, el 7-epi- α -selineno es el producto principal y el pachulol es el segundo producto principal. Por ejemplo, el 7-epi- α -selineno puede representar al menos 20 %, preferentemente al menos el 30 %, preferentemente al menos el 34 % del producto obtenido por el procedimiento de la invención. Como otro ejemplo, el pachulol puede representar al menos el 10 %, preferentemente al menos el 15 %, preferentemente al menos el 16 % del producto obtenido por el procedimiento de la invención.

10 Según otra realización, el producto del polipéptido comprende además al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en germacreno A, α -guaiano, α -humuleno, α -selineno, seicheleno, α -pachuleno, α -bulneseno y (E)-nerolidol, definiéndose estos compuestos por la forma de su estructura como se representa en la Figura 1. En una realización más preferida, el producto del procedimiento de la presente invención comprende todos estos compuestos.

15 Según una realización preferida, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos, preferentemente al menos el 75 %, preferentemente al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 % e incluso más preferentemente al menos el 98 % idéntica a SEQ ID NO: 1. Según una realización más preferida, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Según una realización incluso más preferida, el polipéptido consiste en SEQ ID NO: 1.

20 Según otra realización preferida, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es una variante de SEQ ID NO: 1 obtenida por ingeniería genética. En otros términos, dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que ha sido obtenida modificando SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma. Según una realización más preferida, el polipéptido que tiene una actividad de pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa consiste en una secuencia de aminoácidos que es una variante de SEQ ID NO: 1 obtenida por ingeniería genética, es decir, una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que ha sido obtenida modificando SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma.

Según otra realización, el polipéptido se aísla de *Valeriana jatamansi*.

25 Como se usa en el presente documento, el polipéptido está previsto como un polipéptido o fragmento de péptido que engloba las secuencias de aminoácidos identificadas en el presente documento, además de polipéptidos truncados o de variante, a condición de que mantengan su actividad como se ha definido anteriormente y que compartan al menos el porcentaje de identidad definido con el fragmento correspondiente de SEQ ID NO: 1.

30 Ejemplos de polipéptidos de variante son proteínas que existen de forma natural que resultan de eventos de corte y empalme de ARNm alternativos o de escisión proteolítica de los polipéptidos descritos en el presente documento. Variaciones atribuibles a la proteólisis incluyen, por ejemplo, diferencias en los extremos N o C tras la expresión en diferentes tipos de células hospedadoras, debido a eliminación proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de los polipéptidos. Los polipéptidos codificados por un ácido nucleico obtenido por mutación natural o artificial de un ácido nucleico, como se describen más adelante, también están englobados por la invención.

35 También están englobados por los polipéptidos variantes de polipéptido resultantes de una fusión de secuencias de péptidos adicionales en los extremos amino y carboxilo. En particular, una fusión tal puede potenciar la expresión de los polipéptidos, ser útil en la purificación de la proteína o mejorar la actividad enzimática del polipéptido en un entorno o sistema de expresión deseado. Tales secuencias de péptidos adicionales pueden ser un péptido señal, por ejemplo. Por consiguiente, la presente invención engloba variantes de los polipéptidos, tales como aquellas obtenidas por fusión con otros oligo- o polipéptidos y/o aquellas están unidas a péptidos señal. Polipéptidos resultantes de una fusión con otra proteína funcional, tal como otra proteína de la vía de biosíntesis de los terpenos, también están englobados por los polipéptidos.

45 Como se ha mencionado anteriormente, el ácido nucleico que codifica el polipéptido es una herramienta útil para modificar organismos hospedadores no humanos o células previstos para ser usados cuando el procedimiento se lleve a cabo *in vivo*.

50 Según una realización preferida, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos al menos el 50 %, preferentemente al menos el 55 %, preferentemente al menos el 60 %, preferentemente al menos el 65 %, preferentemente al menos el 70 %, preferentemente al menos el 75 %, preferentemente al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 % e incluso más preferentemente al menos el 98 % idéntica a SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma. Según una realización más preferida, el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma. Según una realización incluso más preferida, el ácido nucleico consiste en SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma.

Según otra realización, el ácido nucleico se aísla de *Valeriana jatamansi*.

55 El ácido nucleico puede definirse como que incluye polímeros de desoxirribonucleótido o ribonucleótido en ya sea forma mono- o bicatenaria (ADN y/o ARN). El término "secuencia de nucleótidos" también debe entenderse como

que comprende una molécula de polinucleótido o una molécula de oligonucleótido en forma de un fragmento separado o como un componente de un ácido nucleico mayor. Los ácidos nucleicos también engloban ciertas secuencias de nucleótidos aisladas que incluyen aquellas que están sustancialmente libres de material endógeno contaminante. El ácido nucleico puede ser truncado, a condición de que codifique un polipéptido englobado por la presente invención, como se ha descrito anteriormente.

Según una realización más preferida, el al menos un ácido nucleico según cualquiera de las realizaciones anteriores comprende una secuencia de nucleótidos que ha sido obtenida modificando SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma. Preferentemente, dicho ácido nucleico consiste en una secuencia de nucleótidos que ha sido obtenida modificando SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma.

Los ácidos nucleicos que comprenden una secuencia obtenida por mutación de SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma están englobados por la invención, a condición de que las secuencias comprendan compartan al menos el porcentaje de identidad definido con los fragmentos correspondientes de SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma y a condición de que codifiquen un polipéptido que tiene una actividad de pachulol y 7-epi-a-selineno sintasa, como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores. Las mutaciones pueden ser cualquier tipo de mutaciones de estos ácidos nucleicos, tales como mutaciones puntuales, mutaciones por delección, mutaciones por inserción y/o mutaciones por desplazamiento del marco. Puede prepararse un ácido nucleico de variante con el fin de adaptar su secuencia de nucleótidos a un sistema de expresión específico. Por ejemplo, se sabe que los sistemas de expresión bacterianos expresan más eficientemente polipéptidos si los aminoácidos están codificados por un codón preferido. Debido a la degeneración del código genético, en el que más de un codón puede codificar el mismo aminoácido, múltiples secuencias de ADN pueden codificar el mismo polipéptido, estando todas estas secuencias de ADN englobadas por la invención.

Otra herramienta importante para transformar organismos hospedadores o células adecuados para llevar a cabo el procedimiento de la invención *in vivo* es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según cualquier realización de la invención.

Un "vector de expresión", como se usa en el presente documento, incluye cualquier vector recombinante lineal o circular que incluye, pero no se limitan a, vectores virales, bacteriófagos y plásmidos. El experto es capaz de seleccionar un vector adecuado según el sistema de expresión. En una realización, el vector de expresión incluye el ácido nucleico operativamente unido a al menos una secuencia reguladora, que controla la iniciación y/o terminación de la transcripción y/o traducción, tal como un promotor de la transcripción, operador o potenciador, o un sitio de unión al ribosoma de ARNm y, opcionalmente, que incluye al menos un marcador de selección. Las secuencias de nucleótidos están "operativamente unidas" cuando la secuencia reguladora se refiere funcionalmente al ácido nucleico.

Pueden usarse vectores de expresión en los procedimientos de preparación de un hospedador organismo y/o célula genéticamente transformado, en organismos hospedadores y/o células que alojan los ácidos nucleicos y en los procedimientos para producir o preparar los polipéptidos que tienen una actividad de pachulol y 7-epi-a-selineno sintasa, como se desvela adicionalmente más adelante.

Organismos hospedadores no humano recombinantes y células transformados para alojar al menos un ácido nucleico de manera que exprese heterológamente o exprese por exceso al menos un polipéptido también son herramientas muy útiles para llevar a cabo el procedimiento de la invención.

Un ácido nucleico según cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas puede usarse para transformar los organismos hospedadores no humanos y células y el polipéptido expresado puede ser cualquiera de los polipéptidos anteriormente descritos.

Organismos hospedadores no humano pueden ser cualquier organismo multicelular o unicelular no humano. En una realización preferida, el organismo hospedador no humano es una planta, un procariota o un hongo. Cualquier planta, procariota u hongo es adecuado para ser transformado según la presente invención. Plantas particularmente útiles son aquellas que producen naturalmente altas cantidades de terpenos. En una realización más preferida, la planta está seleccionada de la familia de *Solanaceae*, *Poaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Asteraceae* o *Lamiaceae*. Por ejemplo, la planta está seleccionada de los géneros *Nicotiana*, *Solanum*, *Sorghum*, *Arabidopsis*, *Brassica* (colza), *Medicago* (alfalfa), *Gossypium* (algodón), *Artemisia*, *Salvia* y *Mentha*. Preferentemente, la planta pertenece a la especie de *Nicotiana tabacum*.

En una realización más preferida, el organismo hospedador no humano es un microorganismo. Cualquier microorganismo es adecuado para la presente invención, pero según una realización incluso más preferida, dicho microorganismo es una bacteria o levadura. Lo más preferentemente, dicha bacteria es *E. coli* y dicha levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

También puede transformarse células eucariotas superiores aisladas, en lugar de organismos completos. Como células eucariotas superiores, los presentes inventores indican aquí cualquier célula eucariota no humana, excepto células de levadura. Células eucariotas superiores preferidas son células vegetales o células fúngicas.

El término "transformado" se refiere al hecho de que el hospedador se sometió a ingeniería genética para comprender una, dos o más copias de cada uno de los ácidos nucleicos requeridos en cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas. Preferentemente, el término "transformado" se refiere a hospedadores que expresan heterológicamente los polipéptidos codificados por el ácido nucleico con el que se transforman, además de expresar en exceso dichos polipéptidos. Por consiguiente, en una realización, los polipéptidos se expresan en cantidad más alta en un organismo transformado que en el mismo organismo no transformado así.

Se conocen varios procedimientos en la técnica para la creación de organismos hospedadores transgénicos o células tales como plantas, hongos, procariontes, o cultivos de células eucariotas superiores. Vectores de clonación y expresión apropiados para su uso como hospedadores de células bacterianas, fúngicas, de levadura, planta y de mamífero se describen, por ejemplo, en Pouwels y col., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, Elsevier, New York and Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vectores de clonación y de expresión para plantas superiores y/o células vegetales en particular están disponibles para el experto. Véase, por ejemplo, Schardl y col. Gene 61: 1-11, 1987.

Los procedimientos para transformar organismos hospedadores o células para alojar ácidos nucleicos transgénicos son familiares para el experto. Para la creación de plantas transgénicas, por ejemplo, procedimientos actuales incluyen: electroporación de protoplastos de planta, transformación mediada por liposomas, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por polietilenglicol, bombardeo de partículas, microinyección de células vegetales y transformación usando virus.

En una realización, se integra ADN transformado en un cromosoma de un organismo hospedador no humano y/o célula de forma que resulte un sistema recombinante estable. Puede usarse cualquier procedimiento de integración cromosómica conocida en la técnica en la práctica de la invención, que incluye, pero no se limita a, intercambio de casete mediado por recombinasa (RMCE), inserción cromosómica específica de sitio viral, inyección de adenovirus y pronuclear.

Con el fin de llevar a cabo el procedimiento para producir pachulol y 7-epi-a-selineno *in vitro*, como se expone en el presente documento anteriormente, es muy ventajoso proporcionar un procedimiento de preparación de al menos un polipéptido que tiene una actividad de pachulol y 7-epi-a-selineno sintasa como se describe en cualquier realización de la invención. Comprendiendo el procedimiento

- a) cultivar un organismo hospedador no humano o célula transformado con el vector de expresión como se ha descrito anteriormente, de manera que aloje un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente y exprese o exprese en exceso un polipéptido como se ha descrito anteriormente;
- b) aislar el polipéptido del organismo hospedador no humano o célula cultivado en la etapa a).

Según una realización preferida, dicho procedimiento comprende además, antes de la etapa a), transformar un organismo hospedador no humano o célula con el vector de expresión de manera que aloje un ácido nucleico y exprese o expresa en exceso el polipéptido.

Puede usarse un ácido nucleico según cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas.

La transformación y el cultivo del organismo hospedador no humano o célula puede llevarse a cabo como se ha descrito anteriormente para el procedimiento de producción de pachulol y 7-epi- α -selineno *in vivo*. La etapa b) puede realizarse usando cualquier técnica muy conocida en la técnica para aislar un polipéptido particular de un organismo o célula.

Una "variante de polipéptido", como se hace referencia en el presente documento, significa un polipéptido que tiene una actividad de pachulol y 7-epi-a-selineno sintasa y que es sustancialmente homólogo al polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores, pero que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de la codificada por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos debido a una o más deleciones, inserciones o sustituciones.

Las variantes pueden comprender secuencias conservativamente sustituidas, que significa que un resto de aminoácido dado está sustituido por un resto que tiene características fisicoquímicas similares. Ejemplos de sustituciones conservativas incluyen sustitución de un resto alifático por otro, tales como He, Val, Leu, o Ala por otro, o sustituciones de un resto polar por otro, tales como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Véase Zubay, Biochemistry, 1983, Addison-Wesley Pub. Co. Los efectos de tales sustituciones pueden calcularse usando matrices de puntuación de sustituciones tales como PAM-120, PAM-200 y PAM-250, como se trata en Altschul, J. Mol. Biol., 1991, 219, 555-565. Son muy conocidas otras sustituciones conservativas tales, por ejemplo sustituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobia similares.

También están englobadas por la invención variantes de péptido que existen de forma natural. Ejemplos de tales variantes son proteínas que resultan de eventos de corte y empalme de ARNm alternos o de la escisión proteolítica de los polipéptidos descritos en el presente documento. Variaciones atribuibles a la proteólisis incluyen, por ejemplo, diferencias en los extremos N o C tras la expresión en diferentes tipos de células hospedadoras, debido a eliminación proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de los polipéptidos.

Pueden usarse variantes de los polipéptidos para obtener, por ejemplo, actividad enzimática potenciada o reducida deseada, regioquímica o estereoquímica modificadas, o utilización de sustrato o distribución de productos alteradas, elevada afinidad por el sustrato, mejorada especificidad por la producción de uno o más de los compuestos deseados, elevada velocidad de la reacción enzimática, actividad o estabilidad más alta en un entorno específico (pH, temperatura, disolvente, etc.), o nivel de expresión mejorado en un sistema de expresión deseado. Puede prepararse una variante o mutante dirigido a sitio por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Pueden obtenerse variantes y derivados de polipéptidos nativos aislando variantes que existen de forma natural, o la secuencia de nucleótidos de variantes, de otras líneas o especie de planta o de las mismas, o programando artificialmente mutaciones de secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos. Pueden llevarse a cabo alteraciones de la secuencia de aminoácidos nativa por cualquiera de varios procedimientos convencionales.

Pueden usarse variantes de polipéptido resultantes de una fusión de secuencias de péptidos adicionales en los extremos amino y carboxilo de los polipéptidos para potenciar la expresión de los polipéptidos, ser útil en la purificación de la proteína o mejorar la actividad enzimática del polipéptido en un entorno o sistema de expresión deseado. Tales secuencias de péptidos adicionales pueden ser péptidos señal, por ejemplo. Por consiguiente, la presente invención engloba variantes de los polipéptidos, tales como aquellos obtenidos por fusión con otros oligo- o polipéptidos y/o aquellos que están unidos a péptidos señal. Polipéptidos de fusión englobados por la invención también comprenden polipéptidos de fusión resultantes de una fusión de otras proteínas funcionales, tales como otras proteínas de la vía de biosíntesis de los terpenos.

Por tanto, en una realización, el procedimiento de preparación de un polipéptido de variante que tiene una actividad de pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa, como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, comprende las etapas de:

- (a) seleccionar un ácido nucleico según cualquiera de las realizaciones expuestas anteriormente;
- (b) modificar el ácido nucleico seleccionado para obtener al menos un ácido nucleico mutante;
- (c) transformar células hospedadoras u organismos unicelulares con la secuencia de ácidos nucleicos mutante para expresar un polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mutante;
- (d) cribar el polipéptido según al menos una propiedad modificada; y,
- (e) opcionalmente, si el polipéptido no tiene actividad de pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa de variante deseada, repetir las etapas de proceso (a) a (d) hasta que se obtenga un polipéptido con una actividad de pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa de variante deseada;
- (f) opcionalmente, si se identificó un polipéptido que tiene una actividad de pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa de variante deseada en la etapa d), aislar el ácido nucleico mutante correspondiente obtenido en la etapa (c).

Según una realización preferida, el polipéptido de variante preparado es capaz de producir pachulol y 7-epi- α -selineno como los productos principales. Según una realización incluso más preferida, el pachulol y el 7-epi- α -selineno representan en total al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, preferentemente al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % del producto producido por el polipéptido de variante preparado.

Según otra realización, el 7-epi- α -selineno es el producto principal y el pachulol es el segundo producto principal. Por ejemplo, el 7-epi- α -selineno puede representar al menos el 20 %, preferentemente al menos el 30 %, preferentemente al menos el 34 % del producto obtenido con el polipéptido de variante preparado. Como otro ejemplo, el pachulol puede representar al menos el 10 %, preferentemente al menos el 15 %, preferentemente al menos el 16 % del producto obtenido con el polipéptido de variante preparado.

Según otra realización, el producto del polipéptido de variante preparado comprende además al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en germacreno A, α -guaieno, α -humuleno, α -selineno, seicheleno, α -pachuleno, α -bulneseno y (E)-nerolidol, definiéndose estos compuestos por la forma de su estructura como se representa en la Figura 1. En una realización más preferida, el producto del polipéptido de variante preparado comprende todos estos compuestos.

En la etapa (b), puede crearse un gran número de secuencias de ácidos nucleicos mutantes, por ejemplo por mutagénesis al azar, mutagénesis específica de sitio o barajado de ADN. Los procedimientos detallados de barajado de genes se encuentran en Stemmer, DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. Proc Natl Acad Sci U S A., 1994, 91(22): 10747-1075. En resumen, barajado de ADN se refiere a un proceso de recombinación al azar de secuencias conocidas *in vitro*, que implica al menos dos ácidos nucleicos seleccionados para recombinación. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones en loci particulares sintetizando oligonucleótidos que contienen una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permiten la unión a fragmentos de la secuencia nativa. Tras la unión, la secuencia reconstruida resultante codifica un análogo que tiene la inserción, sustitución o delección de aminoácido deseada. Alternativamente, pueden emplearse procedimientos de mutagénesis específica de sitio dirigida por oligonucleótidos para proporcionar un gen alterado en el que codones predeterminados pueden ser alterados por sustitución, delección o inserción.

Por consiguiente, el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 1 puede ser recombinado con cualquier otro ácido nucleico de sesquiterpeno sintasa que codifica, por ejemplo aislado de un organismo distinto de *Valeriana jatamansi*.

Así, pueden obtenerse ácidos nucleicos mutantes y separarse, que pueden usarse para transformar una célula hospedadora según procedimientos convencionales, por ejemplo tal como se desvela en los presentes ejemplos.

5 En la etapa (d), el polipéptido obtenido en la etapa (c) se criba según al menos una propiedad modificada, por ejemplo una actividad enzimática modificada deseada. Ejemplos de actividades enzimáticas deseadas, según las que puede cribarse un polipéptido expresado, incluyen actividad enzimática potenciada o reducida, por ejemplo como se mide por el valor K_M o $V_{máx}$, regioquímica o estereoquímica modificadas y utilización de sustrato o distribución de productos alteradas. El cribado de actividad enzimática puede realizarse según procedimientos familiares para el experto y los desvelados en los presentes ejemplos.

10 La etapa (e) proporciona la repetición de las etapas de proceso (a)-(d), que puede realizarse preferentemente en paralelo. Por consiguiente, creando un número significativo de ácidos nucleicos mutantes, pueden transformarse muchas células hospedadoras con diferentes ácidos nucleicos mutantes al mismo tiempo, permitiendo el posterior cribado de un número elevado de polipéptidos. Así pueden aumentarse las probabilidades de obtener un polipéptido de variante deseado a criterio del experto.

15 Todas las publicaciones mencionadas en la presente solicitud desvelan y describen los procedimientos y/o materiales a propósito de los que se citan las publicaciones.

Descripción de los dibujos

20 Figura 1: Cromatogramas iónicos totales del análisis de CG-EM de los productos de sesquiterpeno generados por el pachulol y la 7-epi- α -selineno sintasa de la presente invención (SEQ ID NO: 1) (A) y perfil obtenido con un control negativo (B). Los picos marcados con números se identificaron como los sesquiterpenos: β -elemeno (producto de degradación de (+)-germacreno A) (1); α -guaieno (2); seicheleno (3); α -humuleno (4); α -pachuleno (5); α -selineno (6); α -bulneseno (7); 7-epi- α -selineno (8); (E)-nerolidol (9); alcohol de sesquiterpeno no identificado (10); pachulol (11).

25 Figura 2: Espectros de masas de los dos productos principales de pachulol y 7-epi- α -selineno sintasa de la invención (SEQ ID NO: 2) (pico 8 y pico 11 en la Figura 1 (A y B, respectivamente)) y comparación con los espectros de masas del 7-epi- α -selineno y pachulol auténticos (C y D, respectivamente).

Figura 3: Estructura de los sesquiterpenos producidos por el pachulol y la 7-epi- α -selineno sintasa de la invención (SEQ ID NO: 2).

Realizaciones específicas de la invención o ejemplos

La invención se describirá ahora en más detalle a modo de los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Aislamiento de un ADNc de sesquiterpeno sintasa de raíces de *Valeriana jatamansi*

35 Se obtuvieron plantas de *Valeriana jatamansi* (sinónimo: *Valeriana wallichii*) de B & T World Seeds (Paguignan, Aigues-Vives, Francia). Las plantas se cultivaron en un invernadero a temperatura mínima de 14 °C. Se recogieron por separado rizomas, raíces jóvenes y maduras y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. El material se machacó y se pulverizó a un polvo fino en nitrógeno líquido usando un mortero y pistilo. Se extrajo ARN total usando Concert™ Plant RNA Reagent de Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante, excepto que la precipitación con isopropanol se sustituyó por una precipitación con LiCl 2 M. Se evaluó la calidad del ARN en un gel de agarosa verificando la integridad de las bandas de ARN ribosómico. El ARNm se purificó del ARN total por cromatografía de afinidad en oligodT-celulosa usando el kit de aislamiento de ARNm FastTrack® 2.0 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

40 Se diseñaron oligonucleótidos degenerados para motivos conservados observados en alineamientos de las secuencias de aminoácidos de sesquiterpeno sintasas de planta (Deguerry y col, 2006, Arch Biochem Biophys. 454(2), 123-36). La RT-PCR con estos oligonucleótidos específicos de sesquiterpeno sintasas se realizó usando el kit Qiagen OneStep RT-PCR y un ciclador de gradiente térmico Mastercycler de Eppendorf. Mezclas de reacción típicas contienen 10 μ l de 5X tampón Qiagen OneStep RT-PCR, 200 μ M de cada dNTP, 0,4 μ M de cada cebador, 2 μ l de Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix, 1 μ l de inhibidor de ribonucleasas RNasin® (Promega Co.) y 1 μ g de ARN total en un volumen final de 50 μ l. Las condiciones del ciclador térmico fueron: 30 min a 50 °C (transcripción inversa); 15 min a 95 °C (activación por ADN polimerasa); 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 41 a 51 °C y 1 min a 72 °C. Los tamaños de los productos de PCR se evaluaron en un gel de agarosa al 1,2 %. Las bandas correspondientes al tamaño esperado se eliminaron del gen, se purificaron usando el kit de extracción en gel QIAquick® (Qiagen) y se clonaron en el vector pCR®2.1-TOPO usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen). Entonces se sometieron ADNc insertados a una secuenciación de ADN y la secuencia se comparó contra la base de datos de proteínas no redundantes de GenBank (NCBI) usando el algoritmo de BLASTX (Altschul y col. 1990, J. Mol. Biol. 215, 403-410). La combinación del cebador directo TpsCF2 (SEQ ID NO: 3) (5'-GGGA(A/T)(A/T)G(A/T)(A/T/G/C)(A/T)(C/T/G)GTTGAA(T/G)(T/G)TTATTTTGG-3') y el cebador inverso TpsCR3 (SEQ ID NO: 4) (5'-GT(A/T)(C/G)CGTG(A/T/G/C)G(A/C/T)GTCGTA(A/C/T)G(T/G)GTCATC-3') proporcionaron un fragmento de 81 pb que presentaba homología de secuencias con sesquiterpeno sintasas de planta conocidas.

Entonces se usó una combinación de amplificación rápida de los extremos de ADNc 3' y 5' (RACE) para obtener la secuencia de longitud completa del ADNc correspondiente a este fragmento. Para la 3'RACE, se dedujeron dos oligonucleótidos codificantes de la secuencia de 81 pb obtenida por RT-PCR: 20-3R1 (SEQ ID NO: 5) y 20-3R2 (SEQ ID NO: 6). Se preparó un ADNc bicatenario unido a adaptador usando el kit de amplificación de ADNc Marathon™ (Clontech) siguiendo el protocolo del fabricante. Este ADNc se preparó a partir de ARNm purificado de ARN total de rizoma de *V. jatamansi*. Mezclas de reacción de RACE típicas contienen, en un volumen final de 50 µl, 5 µl de 10X de tampón de reacción de PCR (Clontech), 200 µM de cada dNTP, 1 µl de mezcla de polimerasas Advantage® 2, 200 nM de cada cebador y 5 µl de ADNc 250 veces diluido. La amplificación se realizó en un ciclador de gradiente térmico Mastercycler de Eppendorf. Las condiciones del ciclado térmico fueron las siguientes: 1 min a 94 °C, 5 ciclos de 5 s a 94 °C y 3 min a 72 °C, 5 ciclos de 5 s a 94 °C y 3 min a 70 °C, 20 ciclos de 5 s a 94 °C y 3 min a 68 °C. Los productos de amplificación se evaluaron, se subclonaron, y la secuencia se analizó como se ha descrito anteriormente. El extremo 3' del ADNc se obtuvo después de una primera ronda de amplificación con el cebador 20-3R1 y el cebador AP1 (Clontech) y una segunda ronda de amplificación con el cebador 20-3R2 y el cebador AP2 (Clontech).

Se dedujeron dos cebadores inversos de la secuencia obtenida por 3'RACE: 20-5R1 (SEQ ID NO: 7) y 20-5R2 (SEQ ID NO: 8). Se usó el kit de amplificación de ADNc SMART™ RACE (Clontech) para preparar un 5'RACE-ready cDNA de ARN total de raíz de *V. jatamansi*. Se realizó la 5'RACE en 50 µl de 1X tampón de PCR Advantage 2 que contenía 200 µM de dNTP, 5 µl de Universal Primer Mix (Clontech), 2 µM del primer cebador específico de gen (20-5R1), 2,5 µl de 5'RACE-ready cDNA y 1 µl de mezcla de polimerasas Advantage® 2. Se realizó una segunda ronda de amplificación en la misma condición con 1 µl de la primera amplificación, el cebador específico de gen anidado (20-5R2) y el cebador universal anidado (Clontech). La condición de ciclado de temperaturas y el análisis de fragmentos de ADN fueron como se ha descrito anteriormente para la 3'RACE.

La combinación de 3' y 5'-RACE permitió la reconstitución de la secuencia de longitud completa de un ADNc que se llamó ValR20 (SEQ ID NO: 9). La secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 10) mostró homología con las sesquiterpeno sintasas de planta y contuvo motivos de aminoácidos de terpeno sintasas típicas tales como el motivo DDxxD. Las secuencias más próximas fueron una secuencia de aminoácidos de vetispiradieno sintasa de *S. tuberosum* (49 % de identidad) y una supuesta sesquiterpeno sintasa de *V. vinifera* (hasta el 46 % de identidad).

Ejemplo 2

Expresión heteróloga y caracterización de ValR20 como 7-epi- α -selineno y pachulol sintasa

Se diseñaron dos oligonucleótidos, Val-R20-topo-inicio (SEQ ID NO: 11) y Val-R20-parada (SEQ ID NO: 12), a partir de las regiones de inicio y parada de ValR20 y se usaron para amplificar la secuencia de longitud completa de este ADNc. Se diseñó Val-R20-topo-inicio según los kits de expresión Champion™ pET Direccional TOPO® (Invitrogen). La amplificación se realizó con la ADN polimerasa Pfu (Promega) del conjunto de 5'-RACE-Ready cDNA preparado con el kit de amplificación de ADNc Smart RACE (Clontech). Las condiciones de ciclado térmico fueron las siguientes: 2 min a 95 °C; 32 ciclos de 5 s a 94 °C, 20 s a 53 °C y 3 min a 72 °C. Los productos de PCR se purificaron sobre un gel de agarosa y se eluyeron usando el kit de extracción en gel QIAquick® (Qiagen, Valencia, CA). El producto de PCR se ligó en el plásmido pET101 siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen). Las construcciones se verificaron por secuenciación de ADN. Se seleccionó un clon, 504-ValR20 (SEQ ID NO: 2), para la posterior expresión heteróloga y experimentos de ensayo enzimático. En comparación con las secuencias reconstituidas de RACE, la secuencia de 504-ValR20 (SEQ ID NO: 2) mostró cuatro diferencias de nucleótidos que condujeron a tres cambios de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos codificada por 504-ValR20 se proporciona en SEQ ID NO: 1.

El plásmido se transfirió a células de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen). Se usaron colonias individuales de células transformadas para inocular 5 ml de medio LB. Después de alcanzar una DO de 0,3, se usaron cultivos de 5 ml para inocular 25 ml de medio LB. Los cultivos se incubaron a 37 °C hasta que alcanzó una DO de 0,5 y entonces se transfirieron a una estufa de incubación a 20 °C. Después de 1 hora de equilibrado, la expresión de las proteínas se indujo mediante la adición de IPTG 1 mM y el cultivo se incubó durante la noche a 20 °C. Al día siguiente, las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en 1 ml de tampón de extracción (MOPSO 50 mM, pH 7,4, DTT 1 mM, 10 % de glicerol) y se rompieron por sonicación. Los residuos de células se sedimentaron por centrifugación de 30 min a 18.000 g y se recuperó el sobrenadante que contenía las proteínas solubles.

Los ensayos enzimáticos se realizaron en tubos de vidrio sellados con Teflon usando 250 µl de extracto de proteína en un volumen final de 5 ml de tampón de extracción complementado con MgCl₂ 10 mM y pirofosfato de farnesilo 100 a 250 µM (preparado como se describe por Keller y Thompson, J. Chromatogr 645(1), 161-167, 1993). Los ensayos se solaparon con 3 ml de pentano y los tubos se incubaron durante la noche a 30 °C. Se recuperó la fase de pentano y el medio se extrajo con un segundo volumen de pentano. Las fracciones de pentano combinadas se concentraron bajo nitrógeno y se analizaron por CG-EM en un sistema detector selectivo de masas de cuadrupolo de CG Hewlett-Packard 6890N, equipado con una columna capilar de 0,25 mm de diámetro interno por 30 m de longitud DB-1EM (J&W Scientific). La temperatura del horno se programó de 50 °C (1 min de mantenimiento) a 280 °C a 10 °C/min. El gas portador fue He a un flujo constante de 1 ml/min. La identidad de los productos se

confirmó basándose en la concordancia de los índices de retención y espectros de masas de patrones auténticos cuando estuvieron disponibles o se basó en datos publicados (Joulain y Koenig, 1998). Se realizaron controles negativos con proteínas obtenidas de *E. coli* transformada con el plásmido pET101 sin inserción.

5 Se encontró que la enzima recombinante (SEQ ID NO: 1) era una sesquiterpeno sintasa de múltiples productos que convierte el pirofosfato de farnesilo en al menos 11 productos. El principal producto fue 7-epi- α -selineno, que representó el 34,2 % de la mezcla de sesquiterpenos total. El pachulol fue el segundo producto más abundante de la enzima (16,4 %). Otros sesquiterpenos producidos fueron germacreno A (12,2 %), α -guaieno (2,4 %), seicheleno (4,6 %), α -humuleno (5,3 %), α -pachuleno (2,4 %), α -selineno (9,6 %), α -bulneseno (6,3 %), (E)-nerolidol (2,5 %) y un alcohol de sesquiterpeno no identificado (4,1 %).

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Firmenich SA

15 <120> PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE SESQUITERPENOS

<130> 7930PRIOR

<160> 11

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 553

<212> PRT

25 <213> *Valeriana jatamansi*

<400> 1

ES 2 655 975 T3

Met Leu Ser Thr Glu Ser Gln Val Phe Arg Pro Leu Ala Asn Phe Glu
 1 5 10 15

Lys Ser Leu Trp Gly Asn Leu Phe Thr Ser Phe Ser Val Asp Tyr Leu
 20 25 30

Thr Lys Lys Thr Asn Thr Glu Glu His Glu Gly Leu Leu Glu Lys Val
 35 40 45

Arg Leu Met Phe Leu Asp Ala Ser Lys Leu Lys Ile Pro Glu Lys Ile
 50 55 60

Asn Phe Ile Asn Thr Leu Glu Arg Leu Gly Val Ser Tyr His Met Glu
 65 70 75 80

Arg Glu Ile Glu Asp Gln Leu His Gln Met Phe Asp Ala His Ser Lys
 85 90 95

Phe Gln Asp Asp Ile Gln Arg Phe Asp Leu Phe Thr Leu Gly Ile Tyr
 100 105 110

Phe Arg Ile Leu Arg Gln His Gly Tyr Asn Ile Ser Ser Asp Val Phe
 115 120 125

Lys Lys Leu Lys Asp Ser Asn Gly Lys Phe Lys Glu Glu Leu Lys Asp
 130 135 140

Asp Val Ile Gly Ile Leu Ser Leu Tyr Glu Ala Thr His Val Arg Thr
 145 150 155 160

His Gly Asp Asp Ile Leu Asp Glu Ala Phe Ile Tyr Thr Lys Ala Gln
 165 170 175

Leu Glu Ser Met Ser Thr Ala Ser Leu Ser Pro Phe Leu Gly Met Gln
 180 185 190

ES 2 655 975 T3

Val Thr His Ala Leu Ile Gln Ser Leu His Lys Gly Ile Pro Arg Ile
195 200 205

Glu Ser Arg Asn Tyr Ile Ser Val Tyr Glu Glu Asp Pro Asn Lys Asn
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Arg Phe Ser Thr Ile Asp Phe Asn Leu Leu Gln Met
225 230 235 240

Leu His Lys Gln Glu Leu Cys Asp Ala Ser Arg Trp Trp Asn Glu Met
245 250 255

Glu Phe Glu Thr Lys Leu Ser Tyr Ala Arg Asp Arg Val Val Glu Gly
260 265 270

Tyr Leu Trp Thr Leu Ser Ala Tyr Tyr Glu Pro Lys Tyr Ser Leu Ala
275 280 285

Arg Arg Ile Leu Ile Lys Leu Met Ile Leu Val Ser Leu Thr Asp Asp
290 295 300

Thr Tyr Asp Ala Tyr Gly Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Thr Asp
305 310 315 320

Ala Val Glu Arg Leu Asp Glu Gly Ser Ile Asn Gln Leu Pro Asp Tyr
325 330 335

Met Lys Ile Leu Tyr Lys Ala Leu Leu Asp Phe Phe Glu Glu Thr Glu
340 345 350

Asp Ile Leu Cys Lys His Gly Ile Ile Asn Gly Ser His Arg Val Asn
355 360 365

Tyr Gly Lys Tyr Val Tyr Lys Glu Ile Val Asn Cys Tyr Asn Thr Glu
370 375 380

Tyr Lys Trp Phe Asn Lys Arg Tyr Val Pro Asp Phe Glu Glu Tyr Met
385 390 395 400

Gln Lys Ala Val Val Thr Ser Gly Asn Asn Leu Leu Ile Thr Trp Ser
405 410 415

Phe Gln Gly Met Asp Gln Val Ala Ser Ile Lys Ala Phe Glu Trp Val
420 425 430

Lys Ser His Pro Lys Met Val Val Ser Ser Asn Lys Val Leu Arg Leu
435 440 445

ES 2 655 975 T3

Val Asp Asp Val Met Ser His Glu Glu Glu Asp Glu Arg Gly His Val
 450 455 460

Ala Thr Gly Leu Glu Cys Tyr Gln Lys Thr Tyr Gly Gly Asn Arg Lys
 465 470 475 480

Glu Ile Ile Pro Glu Phe Tyr Lys Arg Ile Asp Asp Ala Trp Lys Asp
 485 490 495

Val Asn Glu Glu Phe Leu Lys Pro Asp Lys Leu Pro Leu Glu Ile Leu
 500 505 510

Met Arg Val Ile Asn Leu Thr Arg Ile Gly Asp Val Val Tyr Lys Tyr
 515 520 525

Asp Asp Gly Tyr Thr His Pro Thr Lys Ala Leu Lys Asp His Ile Ile
 530 535 540

Ser Leu Phe Val Asn Pro Ile Ile Ile
 545 550

- <210> 2
- <211> 1662
- <212> ADN
- <213> *Valeriana jatamansi*
- <400> 2

5

ES 2 655 975 T3

atgtaagca ctgagagtca agtttttcgt ccgttggcaa attttgagaa aagtttatgg 60
 ggaaatcttt tcacctcatt ttctgtggat tatctgacta agaaaacaaa tacagaagaa 120
 catgaaggat tattagaaaa agtgagactg atgttttttag atgcatccaa attgaagatt 180
 ccagaaaaga tcaatttcat aaatacactt gaaaggtttag gtgtatcata tcatatggag 240
 agagagattg aagatcagct tcatcagatg tttgatgctc attctaaatt tcaagatgat 300
 attcaacoggt ttgatttggt cactttggga atttacttca ggattctcag acaacatggg 360
 tataatatct ctagcggatgt tttcaagaag ttgaaagata gcaatggaaa attcaaggaa 420
 gaactaaaag atgatgtgat tggcattcta agcttgatg aagctacaca tgtaagaacc 480
 cacggtgacg atattctaga tgaagctttc atctatacaa aagctcaact agaactatg 540
 tocaccgcaa gtttaagccc gtttcttggg atgcaagtta cgcattgctt gattcagtct 600
 ctccacaaag ggatoccaa aatcgagtcg cgcaactata tatctgttta tgaagaagat 660
 ccaaacaaaa atgatctatt attgaggttc tcaacgattg atttcaatct gctgcaaatg 720
 cttcacaagc aagaattgtg tgatgcctca aggtggtgga atgaaatgga gtttgagacg 780
 aaactatctt atgcgagaga tcgagtggtg gaaggctatt tatggaccct tagcgcatat 840
 tacgaaccga aatactcttt ggctcgaaga atattaatca aattaatgat attggtatct 900

 cttacggatg atacgtatga tgcatatggt acgtagatg aacttcaact ctttacggat 960
 gcagtagaaa ggttggatga gggttocatc aatcagcttc ctgattacat gaagattctc 1020
 tataaggctc tgctagatth tttcgaggaa acagaagata tattatgcaa acatggaata 1080
 attaatggtt ctcatcgcgt taattatggg aaatatgtgt ataaagagat tgtgaattgc 1140
 tacaataccg agtacaatg gttcaacaaa agatacgtgc cggatthtga agaataatg 1200
 cagaaagcag tagtgacttc aggtaacaat ttgcttataa cgtggtcttt tcaaggaatg 1260
 gatcaagtgc caagtatcaa agcgttcgag tgggttaaaa gtcacocgaa aatggtatgc 1320
 tcgtcgaata aagtoctacg acttggtgac gacgtaatga gccacgagga agaagatgaa 1380
 aggggacatg ttgcaacagg ccttgaatgc tatcagaaaa catatggtgg aaatagaaaa 1440
 gagatcattc cagaatttta taagaggatt gatgatgctt ggaaagatgt aatgaagaa 1500
 ttttgaaac ccgataaatt accgctagaa atactaatgc gtgttattaa cctcacgaga 1560
 attggogacg ttgtttacaa gtatgacgac gggatatactc atccaacgaa agcattaag 1620
 gatcacatca tatcgttggt cgtgaatccc ataatacatat ga 1662

<210> 3
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cebador

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g o t
 5
 <400> 3
 gggawwgnw bgttgaakkt tattttgg 29
 <210> 4
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g o t
 20
 <400> 4
 gtwscgtgng hgtcgtahgk gtcac 26
 <210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador
 30
 <400> 5
 acccttagcg catattacga accga 25
 <210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador
 40
 <400> 6
 cgaaccgaaa tactctttgg ctggaaga 28
 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador
 50
 <400> 7
 ccaactcgaac gctttgatac ttgcgact 28
 <210> 8
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador
 60
 <400> 8
 65

ES 2 655 975 T3

cctcatccaa cctttctact gcatccgt 28

<210> 9

<211> 1979

<212> ADN

<213> *Valeriana jatamansi*

<400> 9

acgcggggga ctatcatata attaagagat taattaagtt tgtgaaaatg ttaagcactg 60

agagtcaagt ttttcggtccg ttggcaaatt ttgagaaaag tttatgggga aatcttttca 120

cctcattttc tgtggattat ctgactaaga aaacaaatac agaagaacat gaaggattat 180

tagaaaaagt gagactgatg tttttagatg catocaaatt gaagattcca gaaaagatca 240

atttcataaa tacacttgaa aggttaggtg tatcatatca tatggagaga gagattgaag 300

atcagcttca tcagatgttt gatgctcatt ctaaatttca agatgatatt caacggtttg 360

atttgttcac tttgggaatt tacttcagga ttctcagaca acatggttat aatatctcta 420

5

10

ES 2 655 975 T3

gcgatgtttt caagaagttg aaagatagca atggaaaatt caaggaagaa ctaaaagatg 480
atgtgattgg cattctaagc ttgtatgaag ctacacatgt aagaaccac ggtgacgata 540
ttctagatga agctttcatc tatacaaaaag ctcaactaga atctatgtcc accgcaagtt 600
taagcccgtt tcttggtatg caagttacgc atgctttgat tcagtctctc cacaaagga 660
tccaagaat cgagtcgccc aactatatat ctgtttatga agaagatcca aacaaaaatg 720
atctattatt gaggttctca aagattgatt tcaatctgct gcaaagtctt cacaagcaag 780
aattgtgtga tgcctcaagg tgggtggaatg aatggagtt tgagacgaaa ctatcttatg 840
cgagagatcg agtggtagaa ggctatztat ggacccttag cgcatattac gaaccgaaat 900
actctttggc tcgaagaata ttaatcaaat taatgatatt ggtatctctt acggatgata 960
cgtatgatgc atatggtacg ttagatgaac ttcaactctt tacggatgca gtagaaaggt 1020
tggatgaggg ttccatcaat cagcttctctg attacatgaa gattctctat aaggctctgc 1080
tagatTTTTT cgaggaaaca gaagatatat tatgcaaaca tggaataatt aatggttctc 1140
atcgcgtaa ttatggaaa tatgtgtata aagagattgt gaattgctac aataccgagt 1200
acaaatggtt caacaaaaga tacgtgccgg attttgaaga atatatgcag aaagcagtag 1260
tgacttcagg taacaatttg cttataacgt ggtcttttca aggaatggat caagtccgaa 1320
gtatcaaagc gttcgagtgg gttaaaaatc atccgaaaat ggtagtctcg tcgaataaag 1380
tcctacgact tgttgacgac gtaatgagcc acgaggaaga agatgaaagg ggacatgttg 1440
caacaggcct tgaatgctat cagaaaacat atggtggaaa tagaaaagag atcattccag 1500
aattttataa gaggattgat gatgcttggg aagatgtaa tgaagaattt ttgaaacccg 1560
ataaattacc gctaaaaata ctaatgcgtg ttattaacct cagcagaatt ggcgacgttg 1620
tttacaagta tgacgacggg tatactcatc caacgaaagc attaaaggat cacatcatat 1680
cgttgttcgt gaatcccata atcatatgat tatcatcaat cgttcgacgt gtgtgcgcgt 1740
ggttttggtt aataagtaa taaggtggac tgcacacca tcccaaatct gcatgtttgc 1800
ttctggggtt ctttatttgt gtttgcgtgt ttacttgatt tcttttccgt tgtttgtaat 1860
aataccgagt atttctttc cgttgtttgt aataatacgg agtatgcatt actctctttt 1920
tcacatgcaa ttaataagac gatattattt gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1979

<210> 10
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Cebador

10

<400> 10
caccatgta agcactgaga gtcaagtt 28

<210> 11

ES 2 655 975 T3

<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador

10 <400> 11
gataatcata tgattatggg attcacg 27

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción pachulol y 7-epi-a-selineno que comprende
 - a) poner en contacto pirofosfato de farnesilo (FPP) con al menos un polipéptido que tiene una actividad de pachulol y 7-epi-a-selineno sintasa y que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 % idéntica a SEQ ID NO: 1;
 - en el que dicho poner en contacto es *in vitro*, o *in vivo* en un organismo no humano o célula transformada para expresar dicho polipéptido; y
 - b) opcionalmente, aislar el pachulol y 7-epi-a-selineno producido en la etapa a).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, **caracterizado porque** la etapa a) comprende cultivar un organismo hospedador no humano o célula capaz de producir FPP y transformado para expresar al menos un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 % idéntica a SEQ ID NO: 1 y que tiene una actividad de pachulol y 7-epi-a-selineno sintasa, en condiciones propicias para la producción de pachulol y 7-epi-a-selineno.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, **caracterizado porque** comprende además, antes de la etapa a), transformar un organismo hospedador no humano o célula capaz de producir FPP con al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 % idéntica a SEQ ID NO: 1 y que tiene una actividad de pachulol y 7-epi-a-selineno sintasa, de manera que dicho organismo exprese dicho polipéptido.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, **caracterizado porque** el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos al menos el 50 %, preferentemente al menos el 70 %, preferentemente al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, **caracterizado porque** el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, **caracterizado porque** el ácido nucleico consiste en SEQ ID NO: 2 o el complemento de la misma.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizado porque** el organismo hospedador no humano es una planta, un procarionta o un hongo
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizado porque** el organismo hospedador no humano es un microorganismo, preferentemente una bacteria o levadura.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, **caracterizado porque** las bacterias es *E. coli* y la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizado porque** la célula hospedadora no humana es una célula de planta o una célula fúngica.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 1.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, **caracterizado porque** el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, **caracterizado porque** el polipéptido consiste en SEQ ID NO: 1.

Figura 1

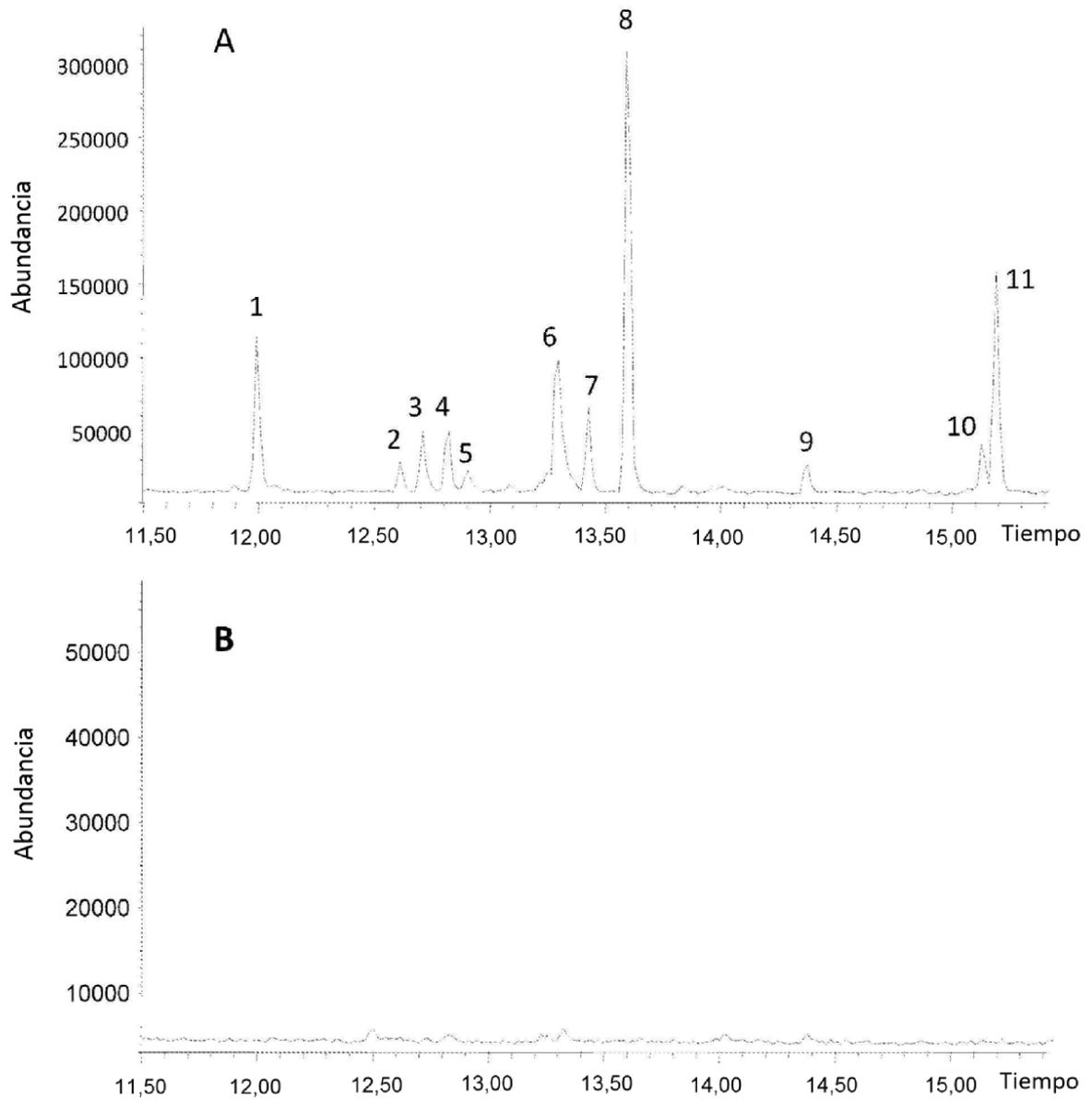


Figura 2

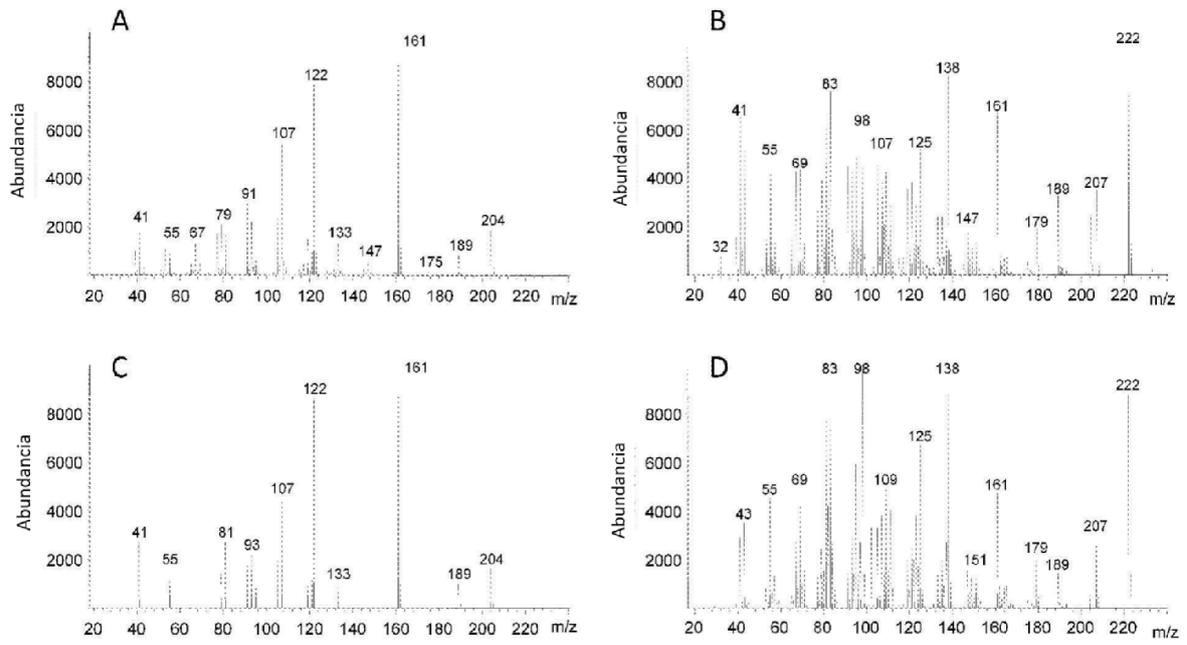


Figura 3

