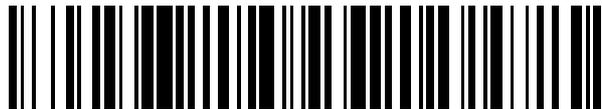


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 452**

51 Int. Cl.:

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2012 PCT/EP2012/068994**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13045510**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2012 E 12766082 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2761005**

54 Título: **Uso de "policétido sintasas" de tipo III (PKS III) recombinantes de algas pardas marinas**

30 Prioridad:

29.09.2011 FR 1158728

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

25.10.2018

73 Titular/es:

**SORBONNE UNIVERSITÉ (50.0%)
21 rue de l'École de Médecine
75006 Paris, FR y
UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**DELAGE, LUDOVIC;
MESLET-CLADIÈRE, LAURENCE;
POTIN, PHILIPPE y
GOULITQUER, SOPHIE**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 687 452 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

Uso de "policétido sintasas" de tipo III (PKS III) recombinantes de algas pardas marinas

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento para producir compuestos polifenólicos, es decir, floroglucinol o uno de sus derivados, con una policétido sintasa de tipo III (PKSIII) de un alga parda marina. La invención también se refiere a ácidos nucleicos recombinantes que codifican una policétido sintasa de tipo III (PKSIII) del alga parda *Ectocarpus siliculosus* (*E. siliculosus*), vectores recombinantes que comprenden estos ácidos nucleicos, así como a células huésped que comprenden estos vectores. Finalmente, la invención se refiere a un
10 procedimiento para preparar diversos compuestos por medio de compuestos polifenólicos producidos según el procedimiento mencionado anteriormente.

[0002] Los metabolitos polifenólicos secundarios forman un amplio grupo de compuestos químicos diversos que existen tanto en plantas terrestres como en macrófitas acuáticas (Waterman et Mole, 1994, Analysis of phenolic
15 plant metabolites, Blackwell Scientific Publications: Oxford, Gran Bretaña). Entre estos compuestos, floroglucinol, así como sus derivados, se utilizan ampliamente en la industria, y particularmente en las industrias farmacéutica, cosmética o agroalimentaria. Más recientemente, el floroglucinol y sus derivados han mostrado actividades potencialmente interesantes para los seres humanos en farmacología (producción de intermedios de reacción para la hemisíntesis de compuestos químicos), en medicina (propiedades antimicrobiana, anti-VIH, anticancerosas,
20 anti diabéticas, anti alérgicas, anti inflamatorias) o cosméticos (efecto antiedad), que los convierte en moléculas naturales con un potencial muy interesante (Singh IP y col., 2009, Expert Opin Ther Pat, 19: 847-66, para reversión). En la actualidad, solo el floroglucinol sintetizado químicamente se comercializa como un medicamento antiespasmódico musculotrópico (con el nombre de Spasfon® en Francia). Además, las mezclas de productos también se comercializan como extractos de *Ascophyllum nodosum* por la empresa Algues & Mer d'Ouessant (29,
25 Francia), productos como Seanol™, extractos de *Ecklonia cava* o HealSea, extractos de *Fucus vesiculosus* por la corporación Diana Naturals (35, Francia) y algunas otras empresas en todo el mundo.

[0003] Una de las principales dificultades actuales es, por lo tanto, proporcionar procedimientos para producir floroglucinol o sus derivados, que sean eficaces y rápidos, y que ofrezcan la posibilidad de obtener estos
30 compuestos en grandes proporciones. Una de las posibilidades consiste en producirlo a través de una ruta de biosíntesis aplicando el uso de enzimas.

[0004] Entre estas enzimas potencialmente capaces de sintetizar floroglucinol, se distinguen particularmente las policétido sintasas de tipo III (PKS III), que son enzimas clave del metabolismo secundario en plantas terrestres
35 (ruta de flavonoides, biosíntesis de fitoalexinas), pero también en bacterias, hongos y algunos protozoos. Las PKS III correspondientes (chalcona sintasas, estilbeno sintasas, pirona sintasas, etc.) comparten el mismo mecanismo de reacción, pero difieren por su especificidad de sustrato para las moléculas "iniciadoras" y por la estereoquímica de la reacción de ciclación que da lugar a un gran panel de metabolitos polifenólicos secundarios que tienen funciones muy diversas.
40

[0005] Por lo tanto, muchas policétido sintasas se aislaron a partir de diversos organismos, tales como el alga parda *Sargassum binderi*, las plantas terrestres *Aloe arborescens* y *Arabidopsis thaliana*, las amebas *Dictyostelium discoideum*, o incluso las bacterias *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor* y *Pseudomonas fluorescens* (Baharum y col., Mar Biotechnol, 2011, 13(5): 845-856 ; Wanibuchi y col., Bioorg Med Chem Lett, 2011,
45 21: 2083-2086; Abe y col., J Am Chem Soc, 2005, 127(5):1362-1363 ; Mizuuchi y col., Biol Pharm Bull, 2008, 31(12): 2205-2210 ; Austin y col., Nat Chem Biol, 2006, 2(9): 494-502 ; Sankaranarayanan y col., Nat Struct Mol Biol, 2004, 11(9): 894-900 ; Izumikawa y col., J Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30: 510-515 ; WO2006/044290). Entre estas policétido sintasas, solo la policétido sintasa PHID procedente de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* es capaz de sintetizar floroglucinol usando malonil-CoA como molécula "iniciadora" (documento WO2006/044290). Las otras
50 policétidos sintasas, aunque también usan malonil-CoA como una molécula "iniciadora", son desafortunadamente incapaces de sintetizar floroglucinol.

[0006] Los inventores han identificado una novedosa policétido sintasa en el alga parda marina *Ectocarpus siliculosus*, que se denominó PKS1. Por primera vez, los inventores han producido una policétido sintasa de tipo III
55 (PKS III) de un alga parda marina de forma recombinante y activa en un sistema heterólogo (la bacteria *Escherichia coli*) con un procedimiento de purificación de homogeneidad establecido que permite la producción de aproximadamente 5 a 10 mg de proteína pura por litro de cultivo. Los inventores también han demostrado que esta PKS1 era capaz de sintetizar floroglucinol *in vitro* a partir de la malonil-coenzima A (malonilCoA). Además, otros productos obtenidos de malonilCoA y de varios acilCoA con cadenas alifáticas más o menos largas (hexanoilCoA,

decanoilCoA, lauroilCoA y palmitoilCoA) están presentes en las reacciones.

[0007] La invención es como se define en el objeto de las reivindicaciones 1 a 14.

5 Ácido nucleico, proteína y procedimiento para producir la enzima

[0008] La presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, o en una secuencia al menos un 85 % idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 2 o al menos un 95 % idéntica a SEQ ID NO: 4, caracterizado por que codifica una policétido sintasa de tipo III (PKSIII), o en una secuencia complementaria de SEQ ID NO: 2 o de SEQ ID NO: 4.

[0009] Preferentemente, dicho ácido nucleico aislado codifica una policétido sintasa de tipo III.

[0010] La presente invención se refiere adicionalmente a un ácido nucleico aislado que codifica una policétido sintasa de tipo III (PKS III) que consiste en:

- a) la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2,
- b) la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 4,
- c) la secuencia complementaria de SEQ ID NO: 2 o de SEQ ID NO: 4,
- d) una secuencia al menos un 85 % idéntica a SEQ ID NO: 2 o al menos un 95 % idéntica a la secuencia en SEQ ID NO: 4,
- e) una secuencia que difiere de las secuencias a) a d) por la degeneración del código,
- f) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones de astringencia específicas con al menos una de las secuencias a) a e).

[0011] Por "aislado", se entiende un compuesto que se ha aislado de un organismo vivo, tal como un alga o un animal, y/o una biblioteca de compuestos. Preferentemente, el ácido nucleico aislado se deriva de un alga parda marina. Aún más preferentemente, el ácido nucleico aislado se deriva del alga parda marina *Ectocarpus siliculosus* (*E. siliculosus*).

[0012] Preferentemente, los ácidos nucleicos según la invención son ácidos nucleicos recombinantes. Por "ácido nucleico recombinante", se entiende un ácido nucleico, es decir, una molécula de ADN o ARN, que ha sido sometida a una manipulación molecular biológica.

[0013] Por "ácido nucleico", se entiende la forma polimérica de éster fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de ARN") o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina o desoxicitidina; "moléculas de ADN") en forma monocatenaria o en forma de una hélice bicatenaria. Son posibles las hélices bicatenarias ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN. El término de ácido nucleico, y en particular molécula de ADN o ARN, solo se refiere a la estructura primaria o secundaria de la molécula, y de ninguna manera se limita a formas terciarias particulares. Por lo tanto, este término comprende ADN bicatenario que, entre otros, se encuentra en las moléculas de ADN lineal o circular (por ejemplo, fragmentos de restricción), virus, plásmidos y cromosomas. Cuando se menciona la estructura de moléculas particulares de ADN bicatenario, las secuencias pueden describirse en el presente documento según la convención normal que solo da la secuencia en la dirección de 5' a 3' a lo largo de la cadena no transcrita del ADN (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga de ARNm).

[0014] Por una secuencia al menos un 85 % idéntica a una secuencia de referencia, se entiende que la secuencia es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia puede incluir hasta quince alteraciones de nucleótidos cada 100 nucleótidos de la secuencia de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia al menos un 85 % idéntica a la secuencia de referencia, hasta el 15 % de los nucleótidos de la secuencia pueden insertarse, eliminarse o sustituirse con otro nucleótido.

[0015] El porcentaje de identidad puede calcularse produciendo un alineamiento global de pares basado en el algoritmo de alineamiento Needleman-Wunsch para encontrar el alineamiento óptico (incluyendo "espacios" o "huecos") entre dos secuencias en toda su longitud, por ejemplo, usando Needle, y usando la matriz BLOSUM62 con una penalización de inserción de "huecos" de 10 y una penalización de extensión de "huecos" de 0,5.

[0016] Preferentemente, la secuencia de nucleótidos de la invención, en particular la secuencia c), es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o un 99 % idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.

[0017] Por "secuencia que difiere de las secuencias a) a c) por degeneración del código", se entiende una secuencia que difiere de la secuencia de referencia por una sustitución conservativa como se indica en la tabla a continuación.

5

Sustituciones conservativas	Tipo de aminoácido
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp	Aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas alifáticas
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	Aminoácidos con cadenas laterales polares no cargadas
Asp, Glu	Aminoácidos con cadenas laterales ácidas
Lys, Arg, His	Aminoácidos con cadenas laterales básicas
Gly	Cadena lateral neutra

[0018] Una molécula de ácido nucleico "puede hibridarse" con otra molécula de ácido nucleico tal como un ADN, un ADN genómico o un ARN, cuando la forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede hibridarse con la otra molécula de ácido nucleico en condiciones de temperatura adecuadas y fuerza iónica de la solución (véase Sambrook y *col.*, anteriormente). Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la "astringencia" de la hibridación. Las condiciones de hibridación de baja rigurosidad corresponden a una T_m de 55 °C, por ejemplo, SSC 5x, SDS al 0,1 %, leche al 0,25 % y sin formamida; o formamida al 30 %, SSC 5x, SDS al 0,5 %). Las condiciones de hibridación de astringencia moderada corresponden a una T_m más alta (aproximadamente 60 °C), por ejemplo, formamida al 40 %, con SSC 5x o 6x. Las condiciones de hibridación de alta astringencia corresponden a una T_m más alta (superior o igual a aproximadamente 65 °C), por ejemplo, formamida al 50 %, SSC 5x o 6x. La hibridación requiere que ambas moléculas de ácido nucleico contengan secuencias complementarias, aunque en función de la astringencia de la hibridación son posibles las discordancias entre las bases. La astringencia apropiada para la hibridación de las moléculas de ácido nucleico depende de la longitud de las moléculas de ácido nucleico y del grado de complementación, variables bien conocidas por los expertos en la técnica. Cuanto mayor es el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor es el valor de la T_m para los híbridos de moléculas de ácido nucleico que tienen estas secuencias. La estabilidad relativa (que corresponde a una T_m superior) de hibridaciones de ácido nucleico disminuye en el siguiente orden: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para híbridos con una longitud de más de 100 nucleótidos, se derivaron las ecuaciones para calcular la T_m (véase Sambrook y *col.*, anteriormente, 9,50-0,51). Para la hibridación con moléculas de ácido nucleico más cortas, es decir, oligonucleótidos, la posición de los desapareamientos se vuelve más significativa, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook y *col.*, anteriormente, 11,7-11,8). Preferentemente, una longitud mínima para una molécula de ácido nucleico que puede hibridarse es de al menos aproximadamente 10 nucleótidos; preferentemente, al menos aproximadamente 10 nucleótidos; y más preferentemente, la longitud es de al menos aproximadamente 50 nucleótidos; aún más preferentemente de al menos 100 nucleótidos; incluso más preferentemente de al menos 1000 nucleótidos.

[0019] El término "condiciones de hibridación específicas" designa una T_m de 55 °C y usa las condiciones descritas anteriormente. En una realización preferida, la T_m es igual a 60 °C, en una realización incluso más preferida, la T_m es igual a 65 °C.

35

[0020] Una "secuencia codificante" de ADN es una secuencia de ADN bicatenario que se transcribe y se traduce en un polipéptido *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Las fronteras de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y por un codón de detención de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia codificante puede incluir, sin limitación, secuencias procariotas, ADNc procedente de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (por ejemplo, de mamíferos) e incluso secuencias de ADN sintéticas. Si la secuencia codificante está destinada a la expresión en una célula eucariota, una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción generalmente se localizarán 3' de la secuencia codificante.

[0021] Las secuencias para controlar la transcripción y la traducción son secuencias reguladoras del ADN, tales como promotores, activadores, terminadores y otras secuencias similares, que permiten la expresión de una secuencia codificante en una célula huésped. En las células eucariotas, las señales de poliadenilación son secuencias de control.

[0022] Una "secuencia promotora" es una región reguladora del ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula y de iniciar la transcripción de una secuencia codificante hacia la porción aguas abajo (dirección 3'). En los objetivos que definen la presente invención, la secuencia promotora está unida a su extremo 3' por el sitio de

inicio de la transcripción y se extiende aguas arriba (dirección 5') mientras incluye el número mínimo de bases o elementos requeridos para iniciar la transcripción a niveles detectables con respecto al ruido de fondo. En la secuencia promotora, se encuentra un sitio de inicio de la transcripción (convenientemente definido, por ejemplo, por mapeo con la nucleasa S1), así como dominios para unirse a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucariotas a menudo contienen, pero no siempre, cajas "TATA" y cajas "CAT".

[0023] Una secuencia codificante está "bajo el control" de secuencias de control de la transcripción y la traducción en una célula, cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante en ARNm que luego se traduce en una proteína codificada por la secuencia codificante.

[0024] Se puede incluir una "secuencia señal" antes de la secuencia codificante. Esta secuencia codifica un péptido señal, en la posición N-terminal de la proteína, que ordena a la célula huésped transportar la proteína sobre la superficie celular o secretar la proteína en el medio, y este péptido señal generalmente se degrada de forma selectiva por la célula después de la exportación. Las secuencias señal se pueden encontrar asociadas con diversas proteínas nativas de procariontes y eucariotas. Preferentemente, la secuencia señal consiste en o comprende la secuencia

5'-

ATGTCTTCTGCTGCGGTTGCTATGCTGGCTGACCCGACTGTCCAGATCGCTCTGGCGTGCCTGGTGGTGTCTCTCTTCGTTGTGCTGCAGTCGGTCAAAAAG-3' (SEQ ID NO:5). Preferentemente, la secuencia señal codifica el péptido señal de la secuencia MSSAAVAMLADPTVQIALACLVVSLFVVLQSVKK (SEQ ID NO: 6).

[0025] También se puede incluir una "secuencia etiqueta" (o "etiqueta") antes o después de la secuencia codificante. Esta secuencia generalmente codifica una repetición de histidina, en la posición N-terminal de la proteína, y permite la purificación de la proteína. Preferentemente, la secuencia etiqueta se coloca antes de la secuencia codificante, y codifica la secuencia de seis histidinas SEQ ID NO: 7 (HHHHHH), la secuencia etiqueta puede tener, por lo tanto, como secuencia nucleotídica, la secuencia SEQ ID NO: 8 (5'-CAYCAYCAYCAYCAYCAY-3'). Todavía más preferentemente, la secuencia etiqueta tiene, para una secuencia de aminoácidos, la secuencia MRGSHHHHHHGS (SEQ ID NO: 9). La secuencia nucleotídica correspondiente a la secuencia etiqueta que codifica la secuencia SEQ ID NO: 9 puede ser la secuencia 5'-ATGCGCGGCAGCCATCATCATCATCATGGCAGC-3' (SEQ ID NO: 10).

[0026] En una realización particularmente preferida, el ácido nucleico según la invención codifica una PKSIII capaz de sintetizar floroglucinol a partir de malonil-CoA solo o en combinación con otros sustratos, por ejemplo, acetil-CoA, hexanoil-CoA, decanoil-CoA, lauroil-CoA, o palmitoil-CoA.

[0027] La invención también se refiere a una proteína codificada por un ácido nucleico aislado según la invención. Preferentemente, dicha proteína está codificada por un ácido nucleico que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. Todavía más preferentemente, dicha proteína consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. Como alternativa, dicha proteína consiste en una secuencia que tiene al menos un 93 % de identidad, preferentemente al menos un 95 % de identidad, o aún más preferentemente un 99 % de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.

[0028] Preferentemente, dicha proteína es una PKSIII capaz de sintetizar floroglucinol a partir de malonil-CoA solo o en combinación con otros sustratos, por ejemplo, acetil-CoA, hexanoil-CoA, decanoil-CoA, lauroil-CoA, o palmitoil-CoA.

[0029] Por una secuencia al menos un 93 % idéntica a una secuencia de referencia, se entiende que la secuencia es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia puede incluir hasta siete alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia al menos un 93 % idéntica a la secuencia de referencia, hasta el 7 % de los aminoácidos de la secuencia pueden insertarse, eliminarse o sustituirse con otro aminoácido. Preferentemente, la secuencia al menos un 93 % idéntica es una secuencia homóloga a la secuencia de referencia, es decir, difiere de la secuencia de referencia en una o más sustituciones conservativas.

[0030] El porcentaje de identidad puede calcularse produciendo un alineamiento global de pares basado en el algoritmo de alineamiento Needleman-Wunsch para encontrar el alineamiento óptico (incluyendo "espacios" o "huecos") entre dos secuencias en toda su longitud, por ejemplo, usando Needle, y usando la matriz BLOSUM62 con una penalización de inserción de "huecos" de 10 y una penalización de extensión de "huecos" de 0,5.

[0031] Por "sustituciones conservativas", se entiende el reemplazo de un aminoácido por otro, sin alterar la conformación y la función de la proteína, incluyendo, pero sin limitación, el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido que tiene las mismas propiedades (tales como, por ejemplo, las mismas polaridades, potenciales de unión a hidrógeno, propiedades ácidas, básicas, hidrófobas, aromáticas, y similares). Los aminoácidos que tienen las mismas propiedades se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, la arginina, la histidina y la lisina son aminoácidos hidrófilos básicos que pueden ser intercambiables. De manera similar, la isoleucina, un aminoácido hidrófilo, puede reemplazarse con leucina, metionina o valina. Los aminoácidos hidrófilos neutros que pueden estar sustituidos entre sí, incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina.

10 **[0032]** Por "sustituido" o "modificado", la presente invención incluye los aminoácidos que se han alterado o modificado a partir de aminoácidos naturales.

[0033] Por lo tanto, debe entenderse que dentro del contexto de la invención se reconoce una sustitución conservativa en el estado de la técnica como una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tenga las mismas propiedades.

[0034] Se proporcionan ejemplos de sustituciones conservativas en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Sustituciones conservativas I

Características de la cadena lateral	Aminoácido
No polar	G A P I L V
Polar no cargado	C S T M N Q
Polar cargado	D E K R
Aromático	H F W Y
Otros	N Q D E

20

[0035] Como alternativa, los aminoácidos pueden agruparse como se describe por Lehninger (1975, Biochemistry, Segunda Edición, Worth Publishers, Inc. Nueva York: NY., págs. 71-77), como se describe en la Tabla 2 a continuación:

25

Tabla 2: Sustituciones conservativas II

Características de la cadena lateral		Aminoácido
No polar	Alifático	A L I V P
	Aromático	F W
	Contiene azufre	M
	Caso especial	G
Polar no cargado	Hidroxilo	S T Y
	Amidas	N Q
	Sulfhidrido	C
	Caso especial	G
Cargado positivamente (básico)		K R H
Cargado negativamente (ácido)		D E

[0036] En otra alternativa, se dan ejemplos de sustituciones conservativas en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3: Sustituciones conservativas III

Residuo original	Ejemplo de sustitución
A	V L I
R	K Q N
N	Q H K R
D	E
C	S
G	N
E	D
H	N Q K R
I	L V M A F
L	I V M A F

K	R Q N
M	L F I
F	L V I A
P	G
S	T
T	S
W	Y
Y	W F T S
V	I L M F A

[0037] La invención también se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico según la invención, en el que dicho ácido nucleico se coloca bajo el control de señales (es decir, un promotor, un terminador y/o un potenciador) que permiten la expresión del ácido nucleico según la invención. El vector puede comprender además un gen para resistencia a un antibiótico, tal como ampicilina o kanamicina.

[0038] El término de "vector" designa un elemento extracromosómico que puede portar un gen no esencial para el metabolismo celular, y que generalmente es un ADN circular bicatenario. El elemento extracromosómico puede ser una secuencia autorreplicante, una secuencia de fago o una secuencia nucleotídica, un ADN o ARN monocatenario o bicatenario, un plásmido, un cósmido. Generalmente, un vector contiene secuencias reguladoras de la transcripción o la traducción, un marcador de selección o una secuencia que permite la autorreplicación o una inserción cromosómica. Un vector adecuado incluye la región 5' de un gen que regula el inicio de la transcripción (es decir, un promotor) y una región 3' que controla la terminación de la transcripción (es decir, un terminador). El promotor puede ser, por ejemplo, CYC1, HIS3, GAL1, GAL10, ADH1, PGK, PHO5, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO, TPI, lac, trp, λ P_L, λ P_R, T7, tac, el bacteriófago T5 o trc. El terminador se puede derivar de muchos genes de una célula huésped preferida y opcionalmente se puede omitir. Preferentemente, el vector es un plásmido pQE-80L (Qiagen) que contiene el promotor del bacteriófago T5 que puede inducirse por isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

[0039] Los ácidos nucleicos y/o el vector según la invención pueden usarse para transformar una célula o un organismo huésped, es decir, para expresar o producir una proteína según la invención.

[0040] Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un huésped o una célula huésped que contiene un ácido nucleico o un vector según la invención, o que expresa (o es capaz de expresar en las condiciones apropiadas) una proteína según la invención. Los expertos en la técnica conocen huéspedes y células huésped adecuados y pueden ser, por ejemplo, cualquier hongo, célula o línea celular eucariota o procariota, organismos eucariotas o procariotas. Por ejemplo, el huésped o la célula huésped puede ser (i) una cepa bacteriana, incluyendo, sin limitación, las líneas de bacterias Gram-negativas tales como líneas de *Escherichia*, por ejemplo, *Escherichia coli*; de *Proteus*, por ejemplo, *Proteus mirabilis*; de *Pseudomonas*, por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens*; y cepas de bacterias gran-positivas tales como las líneas de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus subtilis* o *Bacillus brevis*; de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans*; de *Staphylococcus*, por ejemplo, de *Staphylococcus carnosus*; y *Lactococcus*, por ejemplo, *Lactococcus lactis*; (ii) una célula fúngica, que incluye, sin limitación, células de la especie *Trichoderma*, por ejemplo, *Trichoderma reesei*; *Neurospora*, por ejemplo, *Neurospora crassa*; *Sordaria*, por ejemplo, *Sordaria macrospore*; *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus niger* o *Aspergillus sojae*; u otros hongos filamentosos; (iii) una levadura, incluyendo, sin limitación, células de la especie *Saccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*; *Schizosaccharomyces*, por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe*; *Pichia*, por ejemplo, *Pichia pastoris* o *Pichia methanolica*; *Hansenula*, por ejemplo, *Hansenula polymorpha*; *Kluyveromyces*, por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*; *Arxula*, por ejemplo, *Arxula adenivorans*; *Yarrowia*, por ejemplo, *Yarrowia lipolytica*; (iv) una célula o línea celular de anfibio, tal como ovocitos de *Xenopus*; (v) una célula o línea celular de insecto, tal como las líneas SF9 o Sf21; (vi) una planta o una célula vegetal, por ejemplo, una planta de tabaco; y/o (vii) una célula o línea celular de mamífero, incluyendo, sin limitación, células CHO, BHK, HeLa, COS (es decir, COS-7) y PER.C6. Preferentemente, la célula huésped es una bacteria del tipo *Escherichia coli*, y más preferentemente la célula huésped es la cepa *E. coli* BL21-Codin Plus-RI LP (Stratagene).

[0041] Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para producir una policétido sintasa, que comprende las etapas de:

a) cultivar una célula huésped según la reivindicación 13, en condiciones que permitan la expresión de una policétido sintasa recombinante,

b) extraer y/o purificar dicha policétido sintasa recombinante.

[0042] El procedimiento comprende además una etapa para transformar una célula huésped con la ayuda de un vector recombinante se ha definido anteriormente antes de la etapa a). Por consiguiente, el procedimiento según la invención puede comprender las etapas de:

a0) transformar una célula huésped por medio de un vector como se ha definido anteriormente;

a) cultivar dicha célula transformada en condiciones que permitan la expresión de una policétido sintasa recombinante,

10 b) extraer y/o purificar dicha policétido sintasa recombinante.

[0043] La transformación en la etapa a0) se puede realizar por procedimientos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, mediante transfección, electroporación, electrotransferencia, microinyección, transducción, fusión de células, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato de calcio, lipofección, uso de una pistola de genes, o un vehículo de vector de ADN (véase, por ejemplo, Wu y col., 1992, J. Biol Chem. 267:963-967 ; Wu y col., 1988, J. Biol Chem. 263:14621-14624 ; Hartmut y col., solicitud de patente canadiense N.º 2 012 311, publicada el 15 de marzo de 1990). Preferentemente, la transformación en la etapa a0) se realiza por choque térmico sobre las células hechas químicamente competentes, en un medio de cultivo adecuado. Preferentemente, el choque térmico se realiza entre 35 °C y 50 °C durante 30 segundos a 1 minuto seguido de un retorno al hielo durante 1 a 3 minutos. Aún más preferentemente, el choque térmico se realiza a 42 °C durante 45 segundos seguido de un retorno al hielo durante 2 minutos. Por medio de cultivo adecuado, se entiende un medio de cultivo que permite el crecimiento de células transformadas. Tal medio de cultivo es conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, este es un medio que incluye, sin limitación, un sustrato carbonoso o una fuente de carbono que puede metabolizarse por la célula transformada. El sustrato carbonoso o la fuente de carbono se puede seleccionar de monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, sustratos de carbono simple y una mezcla de estos compuestos. Opcionalmente, el medio de cultivo contiene un antibiótico, tal como ampicilina o kanamicina.

[0044] Preferentemente, la célula transformada en la etapa a0) es una bacteria del tipo *E. coli* tal como la cepa *E. coli* BL21-CodinPlus-RILP (Stratagene), transformada con un vector y/o un ácido nucleico según el invención, y se cultiva usando un medio adecuado, tal como el medio caldo Luria (LB), que contiene preferentemente al menos 100 µg/ml de ampicilina.

[0045] El cultivo realizado en la etapa a) tiene el propósito de permitir la expresión de la policétido sintasa recombinante. Se puede preparar mediante procedimientos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, por medio de un biorreactor, también llamado fermentador. El biorreactor es un tanque sellado herméticamente dotado de un sistema de agitación, un sistema de ventilación, con sondas utilizadas para medir diversos parámetros (pH, temperatura, oxígeno disuelto) y poros de alimentación que permiten una dosificación precisa de la composición del medio de cultivo durante la fermentación. La fermentación en el biorreactor se realiza en dos fases: una fase I de crecimiento durante la cual las células se dividen a una velocidad acelerada, y después una fase II de acumulación o inducción que conduce a la expresión de la proteína recombinante. Un experto en la técnica es capaz de determinar las condiciones de cultivo adecuadas para permitir la fase I de crecimiento y la fase II de acumulación o inducción. En una realización particular, las fases I y II pueden realizarse como se describe en el ejemplo 1.3.

[0046] La extracción y/o la purificación en la etapa b) se realizar por medio de procedimientos conocidos por un experto en la técnica. Como modo de ejemplo no limitativo, la extracción se puede lograr por lisis de las células por medio de una prensa francesa, mediante sonicación, o mediante una ruta enzimática, o con cualquier otra técnica estándar. La lisis de las células puede ir seguida de una etapa de filtración y/o centrifugación del lisado. A modo de ejemplo no limitativo, la purificación se puede lograr por medio de cromatografía (en una columna de intercambio iónico, de afinidad o de separación por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar. En una realización particular, la extracción y/o la purificación se pueden lograr como se describe en el ejemplo 1.3.

[0047] Preferentemente, dicho procedimiento de producción permite la producción de al menos 1 mg/l a 20 mg/l de proteína pura, y aun preferentemente al menos de 5 a 10 mg/l de proteína pura.

55

Procedimiento para producir compuestos polifenólicos

[0048] Por lo tanto, los inventores han identificado que una policétido sintasa de tipo III (PKSIII) extraída de un alga parda era capaz de sintetizar floroglucinol y/o uno de sus derivados a partir de diversos sustratos

carbonosos, y más particularmente de malonil-CoA.

[0049] Por lo tanto, la presente invención describe un procedimiento para producir al menos un compuesto polifenólico, en el que:

5

- una policétido sintasa de tipo III (PKSIII) de alga parda se pone en contacto con al menos un sustrato carbonoso en condiciones que permitan la producción mayoritaria de al menos un compuesto polifenólico,
- dicho compuesto fenólico producido es floroglucinol y/o uno de sus derivados.

[0050] Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para producir al menos un compuesto polifenólico, en el que:

- una policétido sintasa de tipo III (PKSIII) de alga parda se pone en contacto con al menos un sustrato carbonoso en condiciones que permitan la producción mayoritaria de al menos un compuesto polifenólico, caracterizado por que
- 15 dicha PKSIII comprende o consiste en:

- la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos un 93 % de identidad con SEQ ID NO: 1, o una secuencia que puede codificarse por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos un 85 % de identidad con SEQ ID NO: 2, o
- 20 - la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos un 93 % de identidad con SEQ ID NO: 3, o una secuencia que puede codificarse por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos un 85 % de identidad con SEQ ID NO: 4.

- dicho compuesto fenólico producido es floroglucinol o uno de sus derivados,
- 25 - dicho sustrato se selecciona de malonil-CoA, hexanoil-CoA, decanoil-CoA, lauroil-CoA y/o palmitoil-CoA.

[0051] Preferentemente, el procedimiento incluye una etapa de recuperación de floroglucinol y/o uno de sus derivados. Esta etapa de recuperación puede comprender una etapa de extracción y/o una etapa de purificación.

[0052] Por "compuesto polifenólico", se entiende un compuesto derivado del metabolismo secundario del reino vegetal, es decir, plantas terrestres y macrófitas acuáticas, que tienen al menos un anillo aromático con 6 carbonos (fenol), que lleva una o más funciones hidroxilo (OH). Se distinguen varias familias de moléculas, cuya estructura es relativamente estrecha: flavonoides (pigmentos vegetales de color amarillo anaranjado), antocianos (compuestos de color rojo a violeta responsables del color púrpura de las uvas rojas) y taninos.

35

[0053] Por "polícétido sintasa de tipo III", se entiende una enzima capaz de sintetizar floroglucinol y/o uno de sus derivados a partir de un sustrato carbonoso. Preferentemente, PKSIII se obtiene a partir de un alga parda marina, aun preferentemente, PKSIII se obtiene de un alga parda marina del género *Ectocarpus*, y aún más preferentemente, la PKSIII se deriva del alga parda marina *Ectocarpus siliculosus*.

40

[0054] En una realización preferida, PKSIII se produce mediante el procedimiento según la invención descrito anteriormente.

[0055] Según un aspecto particular de la invención, PKSIII comprende o consiste en una proteína según la invención. Más particularmente, la PKSIII comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos un 93 %, 95 % o un 99 % de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.

45

[0056] La secuencia que tiene al menos un 93 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 puede diferir de la secuencia de referencia (es decir, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3) por una o más sustituciones conservativas. El término "sustituciones conservativas" es como se define anteriormente.

50

[0057] Según un aspecto particularmente preferido, PKSIII consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.

55

[0058] Según otro aspecto particular de la invención, dicha PKSIII comprende o consiste en una secuencia que puede codificarse mediante la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, o un 99 % de identidad con SEQ ID NO: 2.

[0059] Según otro aspecto particular de la invención, dicha PKSIII comprende o consiste en una secuencia que puede codificarse mediante la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, o un 99 % de identidad con SEQ ID NO: 4.

5 **[0060]** La secuencia que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 puede diferir de la secuencia de referencia (es decir, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4) por una o más sustituciones conservativas. El término "sustituciones conservativas" es como se define anteriormente.

10 **[0061]** Por "sustrato carbonoso", se entiende un compuesto utilizado como fuente de carbono. Por ejemplo, el sustrato carbonoso incluye compuestos del tipo metabolito, tales como cadenas de carbono C1 a C18, ácidos grasos, mono-, di-, triglicéridos, polioles, fosfolípidos, fosfoácidos, monosacáridos, aminoácidos, nucleótidos, homo- o hetero-oligómeros o polímeros hidrolizables de estos compuestos, y las formas biológicamente activas de estos compuestos. Dichos metabolitos pueden ser de cualquier origen biológico o sintético. Otros ejemplos de compuestos son compuestos C1-C18 aromáticos, alifáticos y cicloalifáticos.

15 **[0062]** Según la invención, el sustrato carbonoso se selecciona de malonil-CoA, acetil-CoA, hexanoil-CoA, decanoil-CoA, lauroil-CoA y/o palmitoil-CoA.

20 **[0063]** En una realización particularmente preferida, el sustrato carbonoso es malonil-CoA.

[0064] Por "floroglucinol", se entiende benceno-1,3,5-triol, número CAS es 108-73-6.

25 **[0065]** Por "derivado de floroglucinol", se entienden particularmente los siguientes compuestos: acetil-floroglucinol, lauroil-floroglucinol, palmitoil-floroglucinol, hexanoil-floroglucinol, decanoil-floroglucinol.

[0066] En un aspecto particularmente preferido, el sustrato carbonoso es malonil-CoA y el compuesto fenólico producido consiste en o comprende floroglucinol.

30 **[0067]** En otro aspecto particularmente preferido, el sustrato carbonoso es malonil-CoA y acetil-CoA, y el compuesto fenólico producido consiste en o comprende floroglucinol y acetil-floroglucinol.

[0068] En otro aspecto particularmente preferido, el sustrato carbonoso es malonil-CoA y lauroil-CoA, y el compuesto fenólico producido consiste en o comprende floroglucinol y lauroil-floroglucinol.

35 **[0069]** En otro aspecto particularmente preferido, el sustrato carbonoso es malonil-CoA y palmitoil-CoA, y el compuesto fenólico producido consiste en o comprende floroglucinol y palmitoil-floroglucinol.

[0070] En otro aspecto particularmente preferido, el sustrato carbonoso es malonil-CoA y hexanoil-CoA, y el compuesto fenólico producido consiste en o comprende floroglucinol y hexanoil-floroglucinol.

40 **[0071]** En otro aspecto particularmente preferido, el sustrato carbonoso es malonil-CoA y decanoil-CoA, y el compuesto fenólico producido consiste en o comprende floroglucinol y decanoil-floroglucinol.

45 **[0072]** Por producción mayoritaria de floroglucinol o uno de sus derivados, se entiende que el floroglucinol o uno de sus derivados es el producto que se encuentra en la mayor concentración con respecto a los otros compuestos producidos. Preferentemente, la producción de floroglucinol o uno de sus derivados es de al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 100 %.

50 **[0073]** El experto en la técnica conoce la etapa para poner la policétido sintasa en contacto con al menos un sustrato carbonoso. Preferentemente, pero de una manera no limitativa, esta etapa se realiza como se describe en los ejemplos 1.4 o 1.5. Más particularmente, comprende las etapas de (i) poner la policétido sintasa en contacto con la fuente carbonosa en un medio adecuado, (ii) incubar la mezcla obtenida de este modo.

55 **[0074]** El medio adecuado en la etapa (i) puede ser un medio HCl-EDTA, cuyas concentraciones respectivas están comprendidas entre 30 y 70 mM de HCl y 0,5 y 2 mM de EDTA, comprende preferentemente entre 45 y 55 mM de HCl y 0,8 y 1,2 mM de EDTA, incluso más preferentemente, las concentraciones de HCl y EDTA son 50 mM y 1 mM, respectivamente. Preferentemente, el pH del medio está comprendido entre 6 y 8, y aun preferentemente, el pH es de aproximadamente 7,5.

[0075] La incubación (ii) se realiza preferentemente a temperatura ambiente, es decir, a una temperatura comprendida entre 20 °C y 30 °C, y durante una duración comprendida entre 30 minutos y 8 horas. Aun preferentemente, la incubación se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 22 °C y 28 °C, y todavía preferentemente la incubación se lleva a cabo a aproximadamente 25 °C. Preferentemente, la incubación se realiza durante un tiempo comprendido entre 1 hora y 5 horas, y aun preferentemente la incubación se realiza durante aproximadamente 1 h, 2 h, 3 h, 4 h o 5 h. En una realización particularmente preferida, la incubación se lleva a cabo a aproximadamente 25 °C durante aproximadamente 1 h, 2 h, 3 h, 4 h o 5 h.

[0076] La etapa de extracción y/o purificación puede llevarse a cabo con técnicas conocidas por un experto en la técnica. Por ejemplo, la extracción se puede lograr por medio de acetato de etilo. La etapa de purificación puede realizarse, por ejemplo, mediante cromatografía de capa fina (TLC) o por cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS).

[0077] Los compuestos polifenólicos producidos por el procedimiento según la invención, tales como el floroglucinol y sus derivados, se pueden usar en muchas aplicaciones en los campos farmacéutico, nutracéutico, cosmético, agroalimentario o fitosanitario.

[0078] Por lo tanto, la invención también se refiere a un procedimiento para producir un compuesto farmacéutico, nutracéutico, cosmético, agroalimentario o fitosanitario, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) producir al menos un compuesto polifenólico mediante el procedimiento según la invención;
- b) modificar opcionalmente dicho compuesto fenólico obtenido en la etapa a) para producir un compuesto farmacéutico, nutracéutico, cosmético, agroalimentario o fitosanitario,
- c) añadir un soporte, vehículo, excipiente, diluyente y/o adyuvante que son aceptables para la aplicación elegida.

[0079] La invención también describe el uso de los compuestos polifenólicos producidos por el procedimiento según la invención para preparar composiciones farmacéuticas, nutracéuticas, cosméticas, agroalimentarias o fitosanitarias.

[0080] La invención describe también estas composiciones.

[0081] Más particularmente, las composiciones farmacéuticas o nutracéuticas pueden contener soportes o similares (vehículos, excipientes, diluyentes) y/o adyuvantes que son farmacéuticamente aceptables. Utilizado en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa preferentemente aprobado por un órgano regulador del gobierno, en particular recomendado en la Farmacopea Americana o Europea, para un uso en animales, y más particularmente en seres humanos. Los soportes farmacéuticos adecuados, o similares, se describen particularmente en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

[0082] Estos soportes farmacéuticamente aceptables, o similares, pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo líquidos derivados del petróleo, animales, plantas o de origen sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y otros aceites similares. El agua es un soporte preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden usarse como soportes líquidos, en particular para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados comprenden manitol, albúmina sérica humana (HSA), almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y otros excipientes similares. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada u otras formas similares.

[0083] Estas composiciones contendrán una cantidad de diagnóstico o terapéuticamente eficaz del compuesto activo con una cantidad adecuada del soporte o similar a fin de proporcionar una forma para una administración adecuada al paciente. Aunque la inyección intravenosa es una forma de administración altamente eficiente, se pueden emplear otros modos, tal como una inyección, o administración oral, nasal o parenteral.

[0084] Más particularmente, las composiciones cosméticas pueden contener un vehículo cosméticamente aceptable. Por "vehículo cosméticamente aceptable", se entiende un vehículo adecuado para su uso en contacto con células humanas y animales, en particular las células de la epidermis, sin ninguna toxicidad, irritación, respuesta

alérgica inducida o similar, y en proporción con una relación beneficio/riesgo razonable. Como ejemplo de un vehículo cosméticamente aceptable, se puede mencionar especialmente agua, en particular agua destilada.

5 **[0085]** Las composiciones cosméticas descritas pueden comprender adicionalmente cualquier aditivo usado habitualmente en el campo cosmético, tal como agentes secuestrantes, antioxidantes, conservantes, cargas, electrolitos, humectantes, agentes colorantes, bases o ácidos habituales, minerales u orgánicos, perfumes, aceites esenciales, activos cosméticos, humectantes, vitaminas, ácidos grasos esenciales, esfingolípidos, compuestos autobronceadores, agentes suavizantes y protectores de la piel. Por supuesto, un experto en la técnica se asegurará de seleccionar este o estos compuestos complementarios opcionales y/o su cantidad, de manera que las
10 propiedades ventajosas de la composición descrita no se alteren, o sustancialmente no se alteren. Estos aditivos pueden estar presentes en la composición en una razón del 0,001 % al 20 % en peso con respecto al peso total de la composición.

15 **[0086]** De forma conocida, las composiciones cosméticas descritas pueden contener adyuvantes habituales en el campo cosmético o dermatológico, tales como emulsionantes, gelificantes hidrófilos o lipófilos, activos hidrófilos o lipófilos, conservantes, antioxidantes, perfumes, cargas, filtros y materiales colorantes. Las cantidades de estos diferentes adyuvantes son las utilizadas convencionalmente en los campos cosmético y/o dermatológico y, por ejemplo, son del 0,01 % al 20 % del peso total de la composición. Estos adyuvantes, dependiendo de su naturaleza, pueden introducirse en la fase grasa, en la fase acuosa y/o en las vesículas lipídicas.
20

[0087] La aplicación de una composición cosmética se lleva a cabo a través de una ruta tópica sobre la piel, que comprende las mucosas, especialmente los labios o faneras. La aplicación de una composición cosmética también se puede llevar a cabo mediante inyección intradérmica.

25 **[0088]** Las composiciones cosméticas pueden aparecer en todas las formas galénicas normalmente usadas para aplicación tópica, en forma de ungüento, crema, aceite, leche, pomada, polvo, hisopo, solución, gel, aerosol, loción, suspensión, jabón.

30 **[0089]** Las composiciones pueden ser composiciones cosméticas en forma de una emulsión de aceite en agua o agua en aceite, o una emulsión múltiple, una microemulsión, un gel de hidroalcohol, una crema, un aceite, una loción hidroalcohólica.

35 **[0090]** Las composiciones cosméticas son particularmente útiles para humedecer, suavizar, reparar y/o proteger la piel.

[0091] Estas composiciones cosméticas también son particularmente ventajosas para controlar el envejecimiento de la piel, es decir, particularmente el fenómeno de arrugas, pérdida de tonicidad y elasticidad debido a modificaciones estructurales de la piel debidas al envejecimiento.

40 **[0092]** Las composiciones cosméticas descritas también son útiles para proteger la piel de las agresiones exteriores, tales como, particularmente, los rayos ultravioleta o la contaminación del aire.

[0093] Las composiciones fitosanitarias descritas pueden comprender además uno o más tensioactivos, conservantes, dispersantes, humectantes, emulsionantes, antiespumantes, agua.

45 **[0094]** Las composiciones fitosanitarias descritas pueden formularse en diferentes formas, por ejemplo, en forma de polvos humectables, gránulos dispersables, suspensiones concentradas, polvos para pulverización.

50 **[0095]** La invención describe también el uso de floriglucinol y/o uno o más de sus derivados producidos por el procedimiento según la invención para tratar trastornos espasmódicos, enfermedades virales, enfermedades parasitarias, enfermedades microbianas, enfermedades fúngicas, trastornos dermatológicos, hipertensión, osteoporosis, enfermedades inflamatorias, enfermedades vasculares, trastornos sexuales, cánceres, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, depresión y alergia.

55 **[0096]** La invención también describe procedimientos para tratar trastornos espasmódicos, enfermedades virales, enfermedades parasitarias, enfermedades microbianas, enfermedades fúngicas, trastornos dermatológicos, hipertensión, osteoporosis, enfermedades inflamatorias, enfermedades vasculares, trastornos sexuales, cánceres, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, depresión y alergia, que comprenden la administración de floriglucinol y/o uno o más de sus derivados a un paciente que lo necesita.

- 5 [0097] Los trastornos espasmódicos pueden comprender particularmente problemas funcionales del tracto digestivo (colitis) y de los conductos biliares, cólicos renales o hepáticos, dolores ginecológicos y contracciones durante el embarazo.
- [0098] Las enfermedades virales pueden comprender, en particular, infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH) y por el virus del herpes.
- 10 [0099] Las enfermedades parasitarias pueden comprender particularmente malaria.
- [0100] Las enfermedades microbianas pueden comprender particularmente infecciones debidas a bacterias Gram-negativas o Gram-positivas, y más particularmente a bacterias de los tipos *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.
- 15 [0101] Las enfermedades fúngicas pueden comprender notablemente infecciones debidas a *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Mucor* y *Cladosporium*.
- [0102] Los trastornos dermatológicos pueden comprender particularmente psoriasis, alopecia cutánea, problemas de curación de cicatrización y el envejecimiento de la piel, es decir, particularmente el fenómeno de arrugas, pérdida de tonicidad y elasticidad debido a modificaciones estructurales de la piel debidas al envejecimiento.
- 20 [0103] Las enfermedades vasculares pueden comprender particularmente la enfermedad de Raynaud y la acrocianosis.
- 25 [0104] Las enfermedades neurodegenerativas pueden comprender particularmente enfermedad de Alzheimer, síndrome de Killoh Nevin, el síndrome del túnel carpiano, parálisis de Tardy Ulnar, síndrome del canal de Guyon.
- 30 [0105] Los trastornos sexuales pueden comprender particularmente trastornos de la erección.
- [0106] El floroglucinol o sus derivados se pueden usar en solitario o junto con otros compuestos que tengan una actividad terapéutica para tratar los trastornos mencionados anteriormente.
- 35 [0107] La invención se explicará con más detalle por los siguientes ejemplos, sin limitar el alcance de los mismos.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 40 [0108]
- Figura 1.** La Figura 1 representa el vector de expresión pQE-80L (Qiagen) que contiene el promotor del bacteriófago T5 inducible por isopropil-b-D-tiogalactopiranosido (IPTG) utilizado para la expresión de la proteína PKS1.
- Figura 2.** La Figura 2 representa el análisis de espectrometría de masas de la proteína PKS1 recombinante purificada de *E. siliculosus*.
- 45 **Figura 3.** La Figura 3 representa el análisis de cromatografía en capa fina de los productos formados durante la reacción enzimática utilizando los diferentes sustratos a continuación: malonilCoA en solitario, malonilCoA + acetil-CoA, malonilCoA + hexanoil-CoA, malonilCoA + lauroil-CoA, malonilCoA + palmitoil-CoA y malonilCoA + decanoil-CoA.
- 50 **Figura 4.** La Figura 4 representa el análisis de espectrometría de masas GC-MS de los productos formados durante la reacción enzimática utilizando los diferentes sustratos a continuación: malonilCoA en solitario, malonilCoA + acetil-CoA, malonilCoA + hexanoil-CoA, malonilCoA + lauroil-CoA, malonilCoA + palmitoil-CoA y malonilCoA + decanoil-CoA.
- Figura 5.** La Figura 5 representa el análisis de espectrometría de masas GC-MS de los productos formados durante la reacción enzimática utilizando los diferentes sustratos a continuación: malonilCoA en solitario, malonilCoA + acetil-CoA, malonilCoA + hexanoil-CoA, malonilCoA + lauroil-CoA, malonilCoA + palmitoil-CoA y malonilCoA + decanoil-CoA.
- 55 **Figura 6.** La Figura 6 representa el análisis de espectrometría de masas LC-MS de los productos formados durante la reacción enzimática utilizando malonilCoA en solitario o malonilCoA + acetil-CoA. 1: Control negativo, 2: Proteína

desnaturalizada, 3: Malonil-CoA, 4: Acetil-CoA, 5: Lauroil-CoA, 6: Palmitoil-CoA, 7: Hexanoil-CoA, 8: Decanoil-CoA. Parámetros NL: 2.10^E4 , m/z: 307.1877-307.1939, MS bl.

Figura 7. La Figura 7 representa el análisis de espectrometría de masas LC-MS de los productos formados durante la reacción enzimática utilizando como sustrato malonilCoA y lauroil-CoA. 1: Control negativo, 2: Proteína desnaturalizada, 3: Malonil-CoA, 4: Acetil-CoA, 5: Lauroil-CoA, 6: Palmitoil-CoA, 7: Hexanoil-CoA, 8: Decanoil-CoA.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Material, métodos y procedimientos experimentales

10

1.1. Productos químicos

[0109] Los compuestos malonil-CoA, acetyl-CoA, hexanoil-CoA, lauroil-CoA, palmitoil-CoA y decanoil-CoA son de Sigma. [^{2-14}C] Malonil-CoA (55 mCi/mmol) es de Perkin Elmer (Estados Unidos).

15

1.2. Cepa bacteriana

[0110] La cepa *Escherichia coli* DH5a [*fhuA2* *_(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80* *_(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*] (Stratagene) se usó como cepa huésped para el mantenimiento de plásmidos. Para la expresión de proteínas, los derivados pQE-80L "reprimidos en cis" se transformaron en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) codon Plus RILP [*E. coli* B F- *ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal I* (DE3) *endA Hte [argU ileY leuW Camr]*] (Stratagene) que contenía las copias complementarias de ARNt arginina, isoleucina, prolina y leucina.

1.3. Expresión y purificación de la policétido sintasa de tipo III recombinante de *Ectocarpus siliculosus*

25

[0111] El gen codificante de la PKS1 de *E. siliculosus* se amplificó por PCR (30 ciclos de amplificación) a partir del ADNc descrito en Cock y col., 2010, Nature 465(7298): 617-621. El vector de expresión pQE-80L (Qiagen) que contenía el promotor del bacteriófago T5 inducible por isopropil-b-D-tiogalactopiranosido (IPTG) se usó para la expresión de la proteína (Figura 1). La PKS1 *E. siliculosus* se clonó en el vector en los sitios de restricción *SphI* y *HindIII* utilizando los oligonucleótidos PQECHSFowBis (5'-GGCGGATCCGCATGCATGTCCAAGGACGAGCAGACGGTATACCCGGTCATCGCC-3'(SEQ ID NO: 11)) y PQECHSRev (5'-GGCTAAGCTTTTACTAGATCTGCCTGAGAAGGATGCCCTCTGCC-3' (SEQ ID NO: 12)). Las condiciones de PCR utilizadas para la clonación son las siguientes: 50 ng de ADNc PKS1, 0,4 μ M de cada oligonucleótido, mezcla de dNTP 0,4 mM en un medio de reacción de 50 μ l con la enzima Phusion (Finnzyme) con su tampón HF según las recomendaciones del proveedor. La reacción se realizó en 3 etapas: desnaturalización del ADN y de los cebadores a 98 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de PCR a 98 °C durante 30 s, 52 °C durante 30 s, 72 °C durante 2 min y luego finalmente una etapa del fin de la elongación a 72 °C durante 7 minutos. Se llevó a cabo una etapa complementaria que consistía en añadir dA a los extremos del fragmento de la PCR durante 10 min a 72 °C con la adición de 0,5 μ l de la enzima GoTaq (Promega). El fragmento de ADN amplificado se purifica directamente en una columna MinElute (Qiagen). La ligación se realiza en una primera fase en pGEM-Teasy (Promega) según condiciones estándar (una noche a temperatura ambiente en un medio de reacción de 12 μ l que contiene una relación 10/1 del producto clonar/vector con la ADN ligasa T4 del kit Promega). El producto de ligación se introduce mediante un choque térmico en las células competentes DHSalpha preparadas en el laboratorio, y se selecciona un transformante para la producción en masa de un vector recombinante que contiene el inserto PKS1. El plásmido se purifica con el kit Miniprep SV (Promega). Después de verificar la secuencia nucleotídica de PKS1, el inserto es digerido por *SphI* y *HindIII*, y luego se purifica en gel de agarosa con el kit MinElute (Qiagen) antes de ligarse al vector pQE80L (Qiagen) doblemente digerido con las mismas enzimas de restricción y desfosforilado por SAP (NE Biolabs). Las condiciones de ligación en pQE80L son las mismas que las descritas anteriormente.

[0112] Las construcciones codifican una proteína total a la que se añadió una etiqueta de seis histidinas (etiqueta His) en su extremo N-terminal. Las construcciones se transformaron en la cepa *E. coli* BL21-CodonPlus-RILP (Stratagene) utilizando un medio LB sólido que contenía 100 μ g/ml de ampicilina. La expresión de la proteína recombinante se logró cultivando las bacterias en un medio ZYP a 20 °C usando un lote de fermentador de 5 l. Después de 48 horas de cultivo, la inducción de la expresión de la proteína se continúa añadiendo 0,5 mM de IPTG. Después de esta última inducción, las células se recogen por centrifugación y se congelan a -80 °C.

[0113] Las células se vuelven a suspender en el medio A (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 300 mM e Imidazol 50 mM) complementado con una mezcla de inhibidor de proteasa, de lisozima (1 mg/ml) y DNasa (10 mg/ml). La lisis de las células se lleva a cabo luego con dos pases en una prensa francesa para reducir la viscosidad del

sobrenadante. Los desechos celulares se eliminan por centrifugación a 20.000 rpm a 4 °C durante 1 h y 30 min. El sobrenadante se transfiere entonces a una columna de Ni-Sepharose (GE Healthcare). El extracto celular se fracciona luego mediante cromatografía de afinidad, denominada "IMAC" (cromatografía de afinidad de metal inmovilizado) en un aparato ÄKTA™-Avant (GE Healthcare). Después de una etapa de lavado con un tampón A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM, imidazol 50 mM), las proteínas se eluyen según un protocolo de gradiente de 50 mM a 500 mM de imidazol mezclando el tampón A con el tampón B (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM). Las fracciones C12 a E10 se concentraron entonces a 5 ml mediante ultrafiltración en CentriPrep de 10 kDa (Millipore) y se intercambiaron simultáneamente en un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 NaCl 100 mM.

[0114] Las proteínas se transfirieron después a una columna de filtración sobre gel Superdex S-200 HR 16/60 (GE Healthcare) y se purificaron mediante cromatografía de exclusión estérica usando un aparato ÄKTA-Avant (GE Healthcare). La pureza y la integridad de todas las muestras de proteínas se analizaron mediante electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 12 % y mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

1.4. Ensayos enzimáticos (cromatografía de capa fina (TLC))

[0115] Las pruebas enzimáticas se realizaron usando:

- 20 - a) malonil-CoA en solitario: Se añadieron 200 µM de malonil-CoA a la mezcla de ensayo que contenía 20 µM de malonil-CoA radiomarcada con [²⁻¹⁴C] (55 mCi/mmol), 50 µg de la enzima recombinante purificada PKS1 de *E. siliculosus*, en un volumen final de 500 µl de Tris HCl 50 mM pH 7,5 y 1 mM de EDTA, o
- b) los cinco sustratos siguientes: acetil-CoA, hexanoil-CoA, lauroil-CoA, palmitoil-CoA y decanoil-CoA. Se añadieron 200 µM de cada sustrato a la mezcla de ensayo que contenía 20 µM de malonil-CoA radiomarcada con [²⁻¹⁴C] (55 mCi/mmol), 50 µg de la enzima recombinante purificada PKS1 de *E. siliculosus*, en un volumen final de 500 µl de Tris HCl 50 mM pH 7,5 y 1 mM de EDTA.

[0116] La incubación de las mezclas en a) y b) se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 h o 3 h y se detuvo mediante la adición de HCl al 37 %. Los productos de las reacciones se extrajeron después con 1 ml de acetato de etilo y se separaron por cromatografía en capa fina (Merck Art. 1.11798 Gel de sílice 60 F254; acetato de etilo/hexano/AcOH, 65: 25: 5, v/v/v).

[0117] Las señales radiactivas se detectaron y se cuantificaron por medio de un sistema de formación de imágenes Typhoon (Molecular Dynamics-GE Healthcare).

1.5. Ensayos enzimáticos (espectrometría de masas combinada con cromatografía de gases (GC-MS))

[0118] Las pruebas enzimáticas se realizaron usando:

- 40 - a) malonil-CoA en solitario: Se añadieron 200 µM de malonil-CoA a la mezcla de ensayo que contenía 50 µg de enzima recombinante purificada PKS1 de *E. siliculosus*, en un volumen final de 500 µl de Tris HCl 50 mM pH 7,5 y 1 mM de EDTA, o
- b) los cinco sustratos siguientes: acetil-CoA, hexanoil-CoA, lauroil-CoA, palmitoil-CoA y decanoil-CoA. Se añadieron 200 µM de cada sustrato a la mezcla de ensayo que contenía 20 µM de malonil-CoA, 50 µg de la enzima recombinante purificada PKS1 de *E. siliculosus*, en un volumen final de 500 µl de Tris HCl 50 mM pH 7,5 y 1 mM de EDTA.

[0119] La incubación de las mezclas en a) y b) se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1, 2, 3, 4, o 5 h y se detuvo mediante la adición de HCl al 37 %. Los productos de las reacciones se extrajeron a continuación con 1 ml de acetato de etilo. Se añadieron 2,50 µg de vainillina como patrón interno. Las muestras se agitaron vorticialmente durante 5 min y se centrifugaron durante 5 min a 1.000 g. La fase orgánica se transfirió a un matraz de vidrio y se evaporó bajo un flujo de nitrógeno. Se formaron trimetilsilil-éteres (TMS-éter) añadiendo 100 µl de acetoneitrilo y 100 µl de Sylon-BFT durante 60 min a 60 °C y se evaporaron bajo un flujo de nitrógeno. Los metabolitos se resuspendieron en 100 µl de hexano y se analizaron mediante GC-MS en modo EI en un Agilent GC 50 6890 acoplado con un detector "5973 MS Detector" (Agilent, Les Ulis, Francia) y equipado con una columna DB-5MS (30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 µm de espesor de película (J y W Scientific, Agilent)). Las temperaturas del orificio de inyección y de la interfaz son de 250 y 280 °C respectivamente; la de la fuente de iones y el analizador MS se fijaron respectivamente a 230 y 150 °C. Las muestras se inyectaron en un modo "inyección sin división" o en un modo "sin división". La temperatura del horno se ajustó primero a 60 °C durante 5 minutos, y luego se aumentó

en 10 °C/min hasta 100 °C, se elevó en 1 °C/min hasta 150 °C, y finalmente se elevó en 8 °C/min hasta 290 °C; luego se mantuvo durante 5 min. Los compuestos se ionizaron por impacto de electrones con una energía de 70 eV. Los analitos se detectaron por una corriente iónica total de 50 a 850 m/z. Todos los datos se procesaron con el software MSDchem (EMBL-EBI).

5

1.6. Ensayos enzimáticos (espectrometría de masas acoplada a cromatografía de fase líquida LC-MS)

[0120] Las pruebas enzimáticas se realizaron usando:

- 10 - a) malonil-CoA en solitario: Se añadieron 200 µM de malonil-CoA a la mezcla de ensayo que contenía 50 µg de enzima recombinante purificada PKS1 de *E. siliculosus*, en un volumen final de 500 µl de Tris HCl 50 mM pH 7,5 y 1 mM de EDTA, o
- b) los cinco sustratos siguientes: acetil-CoA, hexanoil-CoA, lauroil-CoA, palmitoil-CoA y decanoil-CoA. Se añadieron 200 µM de cada sustrato a la mezcla de ensayo que contenía 20 µM de malonil-CoA, 50 µg de la enzima
- 15 recombinante purificada PKS1 de *E. siliculosus*, en un volumen final de 500 µl de Tris HCl 50 mM pH 7,5 y 1 mM de EDTA.

[0121] La incubación de las mezclas en a) y b) se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1, 2, 3, 4, o 5 h y se detuvo mediante la adición de HCl al 37 %. Los productos de las reacciones se extrajeron a continuación con 20 1 ml de acetato de etilo. Se añadieron 2,50 µg de vainillina como patrón interno. Las muestras se agitaron vorticialmente durante 5 min y se centrifugaron durante 5 min a 1.000 g. La fase orgánica se transfirió a un matraz de vidrio y se evaporó bajo un flujo de nitrógeno. Los metabolitos se resuspendieron en 100 µl de hexano. Para el análisis por LC-MS, se acopla un sistema de cromatografía líquida DionexUltiMate 3000 Rapid Separation LC (RSLC, Dionex) con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific). Todos los

25 disolventes y reactivos utilizados son de calidad analítica o calidad HPLC (Carlo Erba). La separación cromatográfica se logró en una columna Acclaim RSLC 120, C18, tamaño de partículas de 2 µm, columna de 2,1 x 100 mm (Dionex) mantenida a 20 °C. La fase móvil es agua que contenía ácido acético al 0,1 % (A) y acetonitrilo que contenía ácido acético al 0,1 % (B). El flujo se ajustó a 0,25 ml.min⁻¹. El gradiente de elución (A:B, v/v) se realizó como se describe a continuación: 80:20 de 0 a 1 min; y después 0:100 de 1 a 10 min; después 20:100 durante 10 min y de 20,1

30 minutos a 80:20 durante 10 minutos. El volumen inyectado es de 50 µl. La columna de HPLC se conectó sin desacoplamiento con la interfaz operativa de electronebulización en modo negativo. La tensión de la pulverización fue de 3,5 kV y la temperatura del capilar de transferencia se mantuvo a 350 °C. El "líquido de la vaina" y el gas nitrógeno auxiliar se aplicaron para ayudar a la evaporación del disolvente en un flujo de 25 y 5 unidades arbitrarias respectivamente. La totalidad de las exploraciones de los espectros de masas se obtuvo para m/z de 50 a 2.000

35 utilizando una resolución de masa de 30.000 FWHM a 400 m/z en un modo de perfil.

EJEMPLO 2: Resultados

2.1. Secuencias nucleotídicas y proteicas de PKS1

40

[0122] El gen *PKS1* presente en el genoma de *E. siliculosus* está disponible en las bases de datos públicas desde junio de 2010 y corresponde a una secuencia de 1.245 nucleótidos, que codifica una proteína de 415 aminoácidos. Se predijo un péptido señal de direccionamiento según el uso del software SIGNALP v.2.0 que usa los dos modelos de redes neuronales y ocultos de Markov (Nielsen y col., Protein Eng, 1999, 12: 3-9) y esta secuencia

45 de 102 nucleótidos, correspondiente a los primeros 34 aminoácidos, se eliminó para obtener una proteína recombinante madura expresada en el citoplasma bacteriano.

2.2. Sobreexpresión en *E. Coli* y purificación de la PKS1 recombinante

50

[0123] Según los procedimientos de sobreexpresión y purificación de PKS1 en *E. coli*, el gel de electroforesis de las fracciones de elución de la columna de afinidad "IMAC" teñidas con azul de Coomassie permite la detección de la producción de una proteína recombinante al tamaño esperado de aproximadamente 50 kDa. Para aumentar el nivel de pureza de la proteína recombinante y eliminar las formas inactivas de la enzima (por ejemplo, agregados solubles), una segunda purificación en una columna de exclusión por tamaño permite obtener la proteína

55 recombinante con una homogeneidad de más del 99 % según al análisis de DLS (dispersión de luz dinámica). Este análisis coincide con el volumen de elución de la proteína en un gel de filtración y sugiere que la forma activa de la enzima es en realidad un dímero como la mayoría de las PKSIII conocidas hasta el momento. La pureza de la enzima también se validó mediante análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF de la banda recortada sobre gel y se digirió con tripsina. Las masas de los fragmentos obtenidos corresponden realmente a la secuencia de

PKS1 con 32 péptidos identificados que corresponden al 47 % de cobertura de la secuencia (Figura 2).

[0124] Se estimó que el rendimiento de producción para un cultivo en un fermentador de 5 l era de aproximadamente 5 a 10 mg de proteína recombinante activa por litro de cultivo y, por lo tanto, puede soportar un nivel de producción industrial. Además, la enzima demostró ser estable durante uno o dos meses a 4 °C y soportó la congelación a -80 °C.

2.3. Actividad enzimática: análisis de espectrometría de masas de los compuestos formados

10 **[0125]** El análisis de los productos formados por TLC indica que hay formación de floroglucinol con o sin iniciadores (malonilCoA en solitario, malonilCoA + acetil-CoA, malonilCoA + hexanoil-CoA, malonilCoA + lauroil-CoA, malonilCoA + palmitoil-CoA y malonilCoA + decanoil-CoA) y que los principales compuestos de la reacción obtenidos son floroglucinol en el caso de malonilCoA en solitario o malonilCoA + acetil-CoA y un acil-floroglucinol en el caso de malonilCoA con los demás iniciadores (acetil-CoA, hexanoil-CoA, lauroil-CoA, palmitoil-CoA y decanoil-CoA) (Figura 15 3).

[0126] Estos resultados se confirmaron por análisis de espectrometría de masas GC-MS que permitió la identificación clara de la producción de floroglucinol a partir de malonil-CoA con una producción óptima situada entre 3 h y 5 h de reacción (Figuras 4 y 5 y Tabla 5).

20

Tabla 5: Cantidad de floroglucinol producido por la PKS1 a partir de Malonil-CoA.

Tiempo (h)	Área m/z 194	Área m/z 342	Relación 342/194	Floroglucinol/muestra (µg)
CB	6232490	0	0	0,00
1	5968432	955510	0,16009397	1,70
2	6169748	5641093	0,91431498	9,08
3	5847716	39184281	6,70078386	65,64
4	4159877	9789969	2,35342752	23,15
5	4452610	12232641	2,74729675	27,00

[0127] El análisis de espectrometría de masas LC-MS también permitió la identificación clara de la producción de floroglucinol a partir de malonil-CoA y acetil-CoA (Figura 6).

25

[0128] La formación de los acil-floroglucinos se detectó extrayendo específicamente los compuestos presentes por TLC y analizándolos con espectrometría de masas LC-MS. Por lo tanto, por ejemplo, en presencia de malonilCoA y lauroil-CoA, la enzima PKS1 produce lauroil-floroglucinol (Figura 7).

30 **[0129]** Otros resultados del análisis por GC-MS para los productos formados en presencia de diferentes acil-CoA también sugieren la formación de compuestos del tipo tetracétido pironas como con *Mycobacterium tuberculosis*.

2.4. Cristalización y obtención de la estructura de la enzima PKS1

35

[0130] Después de obtener las condiciones de cristalización, varios cristales de la enzima PKS1 dieron la posibilidad de obtener conjuntos de datos de difracción de rayos X que permitían la resolución de la estructura a 2,85 Å mediante la técnica de reemplazo molecular (Tabla 6).

40

Tabla 6. Datos recopilados y estadísticas de pureza de la PKS a una resolución de 2,85 Å.

Recopilación de datos	PKS de alta resolución
Línea del haz ESRF	ID23-1
Longitud de onda (Å)	0,979239
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parámetros de la malla (Å)	A = 61,99, b = 83,92, c = 154,91
Resolución (Å)	83,920-2,85 (3,02-2,85)
Número de observaciones (F>0)	93096 (12976)
Número de reflexiones únicas	22949 (3105)
Finalización (%)	100 (100)
Promedio I/ (I)	3,8 (1,4)
R _{pim} (%)	13,3 (58,7)

Redundancia	4,1 (4,2)
Refinamiento	
Resolución	56,917-2,85
Número de reflexiones únicas	21715
Factor R (R _{free} en 5 %)	30,17 (41,31)
Número de átomos/proteína (promedio del factor B en Å ²)	5768 (45,86)
Número de átomos de disolvente (promedio del factor B en Å ²)	4 (34,20)
Desviación estándar en las uniones (Å)	0,013
Desviación estándar en los ángulos (°)	1,736
Promedio de Bfact (Å ²)	45,769

[0131] Estos datos confirman la formación de un dímero de PKS1 para la enzima en su forma recombinante activa.

- 5 **[0132]** La estructura global de un monómero de PKS1 revela una composición con hélices α y láminas β organizadas en un pliegue canónico del tipo de $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ -tiolasa. La tríada catalítica se representa por los residuos Cys194, His331 y Asn364. Al igual que la PKSIII de *Mycobacterium tuberculosis*, denominada PKS18, PKS1 parece tener un túnel de acceso al sitio catalítico donde las acil-CoA con cadenas más o menos largas pueden intervenir. También se identificó el sitio de unión potencial de malonil-CoA.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

[0133]

15 <110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S) UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (UPMC)

<120> USO DE POLICÉTIDO SINTASAS DE TIPO III (PKS III) RECOMBINANTES DE ALGAS PARDAS MARINAS

20 <130> BET12P2509

<150> FR 1158728

<151> 29-09-2011

25 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

30 <211> 290

<212> PRT

<213> Ectocarpus siliculosus

<400> 1

35

ES 2 687 452 T3

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

ES 2 687 452 T3

Ile Leu His Ala Ile Phe Ala Asp Gly Cys Ala Ala Ala Val Leu Lys
 165 170 175

Gly Ala Arg Lys Ser Glu Cys Pro Lys Gly Thr Leu Ala Ile Val Asp
 180 185 190

Asn His Ala Trp Leu Met Glu Gly Thr Glu Asp Gly Ile Thr Leu Ala
 195 200 205

Ile Lys Pro Asn Gly Ile Thr Cys Thr Leu Ser Lys Phe Leu Pro Gln
 210 215 220

Tyr Ile Ala Lys Asn Ile Ala Phe Phe Ala Asp Gly Phe Leu Lys Lys
 225 230 235 240

His Lys Leu Gly Arg Asp Asp Val Asp Phe Trp Cys Val His Pro Gly
 245 250 255

Gly Arg Arg Ile Ile Glu Glu Ala Gln Asn Gly Leu Gly Leu Ser Glu
 260 265 270

Glu Gln Thr Ala Asp Ser Trp Ala Val Leu Gly Glu Tyr Gly Asn Met
 275 280 285

Leu Ser
 290

<210> 2

<211> 870

5 <212> ADN

<213> Ectocarpus siliculosus

<400> 2

gttctcgagc gcatctacgg caactcgcg c atcggcagcc gctacttcgc cgtgccggac 60

ttcaccocccg gcagggcggc caagggcgac cccctcttct acccggccga cggcagctac 120

caggtgcccg tggacgtccg gctggacaag ttcaaggaga aggccgtccc gctggtgtcc 180

gacgtcgccc gccgcgccat caaggaggcc ggctgaacg tcgaggacat ctccaagctc 240

gtcgtggtct cctccaccgg attcctcggc cccggcctcg actgcgagct gatcaagaac 300

ctcggcctga cccgctccgt cgaccgcacc ctcatcgggt tcatgggctg cgccgccgcc 360

atgaacggtt tccgtaacgc gaacgactac gtcaccgcca accccgaaa gtacgcgctg 420

atgatctgcy tcgagctttc ctcggtgcac acgaccttg acgacaacat caacgacgcy 480

atcttgcaag ctatcttcgc cgacggatgc gccgctgccg tgctcaagg agccaggaag 540

tcggagtgcc ccaaggaac cctcgctatc gtcgacaacc acgcgtggct catggagga 600

10

ES 2 687 452 T3

accgaggacg gaatcaccct tgctatcaag ccaaacggca tcacctgcac cctgtccaag	660
ttcctgcccc agtacatcgc caagaacatc gccttcttcg cggacggctt cctcaagaag	720
cacaagctcg gacgcgacga cgttgacttc tggcggtgc acccgggagg ccgacgtatc	780
atcgaggagg cgcagaacgg ccttggcctc tcggaggagc agaccgcgga ctcgtgggcg	840
gtgctcgggg agtacggaaa catgctctcg	870

<210> 3

<211> 380

5 <212> PRT

<213> Ectocarpus siliculosus

<400> 3

ES 2 687 452 T3

Ser Lys Asp Glu Gln Thr Val Tyr Pro Val Ile Ala Gly Met Ala Ile
 1 5 10 15

Gly Asn Pro Gln Tyr Arg Cys Thr Gln Asn Glu Ala Leu Ala Val Ala
 20 25 30

Ser Lys Cys Pro Gly Leu Glu Ser Ile Lys Pro Val Leu Glu Arg Ile
 35 40 45

Tyr Gly Asn Ser Arg Ile Gly Ser Arg Tyr Phe Ala Val Pro Asp Phe
 50 55 60

Thr Pro Gly Arg Ala Ala Lys Gly Asp Pro Leu Phe Tyr Pro Ala Asp
 65 70 75 80

Gly Ser Tyr Gln Val Pro Val Asp Val Arg Leu Asp Lys Phe Lys Glu
 85 90 95

Lys Ala Val Pro Leu Val Ser Asp Val Ala Arg Arg Ala Ile Lys Glu
 100 105 110

Ala Gly Leu Asn Val Glu Asp Ile Ser Lys Leu Val Val Val Ser Ser
 115 120 125

Thr Gly Phe Leu Gly Pro Gly Leu Asp Cys Glu Leu Ile Lys Asn Leu
 130 135 140

Gly Leu Thr Arg Ser Val Asp Arg Thr Leu Ile Gly Phe Met Gly Cys
 145 150 155 160

Ala Ala Ala Met Asn Gly Phe Arg Asn Ala Asn Asp Tyr Val Thr Ala
 165 170 175

Asn Pro Gly Lys Tyr Ala Leu Met Ile Cys Val Glu Leu Ser Ser Val

ES 2 687 452 T3

tccaaggacg agcagacggt ataccocggtc atcgcocgga tggccatcgg caaccocgag 60
taccgctgca cgcagaacga ggcctcgcgc gtcgcctcca agtgcccggg cctcagatcc 120
atcaagcccg ttctcgagcg catctacggc aactcgcgca tcggcagccg ctacttcgcc 180
gtgcccggact tcacccccgg cagggcggcc aagggcgacc ccctcttcta cccggccgac 240
ggcagctacc aggtgcccgt ggacgtccgg ctggacaagt tcaaggagaa ggccgtcccg 300
ctgggtgtccg acgtcgcocg ccgcgcctac aaggaggccg gcctgaacgt cgaggacatc 360
tccaagctcg tcgtgggtctc ctccaccgga ttcctcggcc ccggcctcga ctgcgagctg 420
atcaagaacc tcggcctgac ccgctcgcgc gaccgcaccc tcatcggggtt catgggctgc 480
gccgcocgca tgaacgggtt ccgtaacgcg aacgactacg tcaccoccaa cccocgaaag 540
tacgcgctga tgatctgcgt cgagctttcc tcgggtgcaca cgacctttga cgacaacatc 600
aacgaocgca tcttgcacgc tatcttcgcc gacggatgcg ccgctgcccgt gctcaagggg 660
gccaggaagt cggagtgcgc caagggaaacc ctgcctatcg tcgacaacca cgcgtggctc 720
atggagggaa ccgaggacgg aatcacccctt gctatcaagc caaacggcat cacctgcacc 780
ctgtccaagt tcctgccccca gtacatcgcgc aagaacatcg cctctctcgc ggacggcttc 840
ctcaagaagc acaagctcgg acgcgacgac gttgacttct ggtgcggtgca cccocggaggc 900
cgacgtatca tcgaggaggc gcagaacggc cttggcctct cggaggagca gaccgcggac 960
tcgtggggcg tgctcgggga gtacggaaac atgctctcgc cctcogttat gttcgttctg 1020
tctagggttt tcaagcgcga caacgcocgc ctgcacaggg gcaagcccgg ctaccagacg 1080
ggtatggcgt tctccttctc gccgggtgtc ggggcagagg gcatccttct caggcagatc 1140
tag 1143

5 <210> 5
<211> 102
<212> ADN
<213> Ectocarpus siliculosus

10 <400> 5

atgtcttctg ctgcggttgc tatgctggct gaccocactg tccagatcgc tctggcgtgc 60
ctgggtgggt ctctcttctg tgtgctgcag tcggtcacaaa ag 102

<210> 6
15 <211> 34
<212> PRT
<213> Ectocarpus siliculosus

<400> 6

20

ES 2 687 452 T3

Met Ser Ser Ala Ala Val Ala Met Leu Ala Asp Pro Thr Val Gln Ile
1 5 10 15

Ala Leu Ala Cys Leu Val Val Ser Leu Phe Val Val Leu Gln Ser Val
20 25 30

Lys Lys

<210> 7
<211> 6
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia etiqueta
10
<400> 7

His His His His His His
1 5

15 <210> 8
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia etiqueta

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (3)..(3)
<223> y = c o t

<220>
<221> misc_feature
30 <222> (6)..(6)
<223> y = c o t

<220>
<221> misc_feature
35 <222> (9)..(9)
<223> y = c o t

<220>
<221> misc_feature
40 <222> (12)..(12)
<223> y = c o t

<220>
<221> misc_feature
45 <222> (15)..(15)
<223> y = c o t

<220>
<221> misc_feature
50 <222> (18)..(18)

<223> y = c o t

<400> 8
caycaycayc aycaycay 18

5 <210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia etiqueta

<400> 9

15 **Met Arg Gly Ser His His His His His His His Gly Ser**
1 5 10

<210> 10
<211> 36

20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia etiqueta

25 <400> 10
atgcgcgga gccatcatca tcatcatcat ggcagc 36

<210> 11

30 <211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Cebador de clonación

<400> 11
ggcggatccg catgcatgtc caaggacgag cagacggat acccggatc cgcc 54

40 <210> 12
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador de clonación

<400> 12
ggctaagctt ttactagatc tgctgagaa ggatgcctc tgcccc 46

50

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir al menos un compuesto polifenólico, en el que:
- 5 - una poliketido sintasa de tipo III (PKSIII) de alga parda se pone en contacto con al menos un sustrato carbonoso en condiciones que permitan la producción mayoritaria de al menos un compuesto polifenólico, **caracterizado por que** dicha PKSIII comprende o consiste en:
- la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos un 93 % de identidad con SEQ ID NO: 1, o una secuencia que puede codificarse por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 o una secuencia
 - 10 que tiene al menos un 85 % de identidad con SEQ ID NO: 2, o
 - la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos un 93 % de identidad con SEQ ID NO: 3, o una secuencia que puede codificarse por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos un 85 % de identidad con SEQ ID NO: 4.
 - dicho compuesto fenólico producido es floroglucinol o uno de sus derivados,
 - 15 - dicho sustrato se selecciona de malonil-CoA, hexanoil-CoA, decanoil-CoA, lauroil-CoA y/o palmitoil-CoA.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicho sustrato es malonil-CoA y dicho compuesto fenólico producido es floroglucinol.
- 20 3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** dicho sustrato es malonil-CoA y lauroil-CoA y dicho compuesto de fenol producido es lauroil-floroglucinol.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha PKSIII se obtiene después de las etapas de:
- 25
- cultivar una célula huésped recombinante que comprende un vector recombinante que codifica una PKSIII que comprende o consiste en (i) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos un 93 % de identidad con SEQ ID NO: 1, o un vector recombinante que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos un 85 % de identidad con SEQ ID NO: 2, o (ii) la secuencia de aminoácidos
 - 30 SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos un 93 % de identidad con SEQ ID NO: 3, o un vector recombinante que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos un 85 % de identidad con SEQ ID NO: 4 en condiciones que permiten la expresión de dicha PKSIII, y
 - extraer y/o purificar dicha PKSIII.
- 35 5. Ácido nucleico aislado que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.
6. Ácido nucleico aislado que consiste en una secuencia al menos un 85 % idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 2 o al menos un 95 % idéntica a SEQ ID NO: 4, **caracterizada por que** codifica una poliketido sintasa de tipo III (PKSIII).
- 40 7. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 5 que codifica una poliketido sintasa de tipo III (PKSIII).
8. Ácido nucleico aislado que comprende o que consiste en la secuencia complementaria de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.
- 45 9. Ácido nucleico aislado que codifica una poliketido sintasa de tipo III (PKSIII) que consiste en:
- a) la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2,
 - b) la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 4,
 - 50 c) la secuencia complementaria de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4,
 - d) una secuencia al menos un 85 % idéntica a SEQ ID NO: 2 o al menos un 95 % idéntica a SEQ ID NO: 4,
 - e) una secuencia que difiere de las secuencias a) a d) por la degeneración del código,
 - f) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones de astringencia específicas con al menos una de las secuencias a) a e).
- 55 10. Poliketido sintasa aislada **caracterizada por que** está codificada por un ácido nucleico aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.
11. Poliketido sintasa aislada **caracterizada por que** dicha proteína consiste en:

- la secuencia SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos un 93 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, o
- la secuencia SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos un 93 % de identidad con la SEQ ID NO: 3.

- 5 12. Vector recombinante, que comprende el ácido nucleico aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.
13. Célula huésped recombinante, **caracterizada por que** la célula se ha transformado por un vector recombinante según la reivindicación 12.
- 10 14. Procedimiento para producir una policétido sintasa, que comprende las etapas de:
- a) cultivar una célula según la reivindicación 13, en condiciones que permitan la expresión de una policétido sintasa recombinante,
- 15 b) extraer y/o purificar dicha policétido sintasa recombinante.

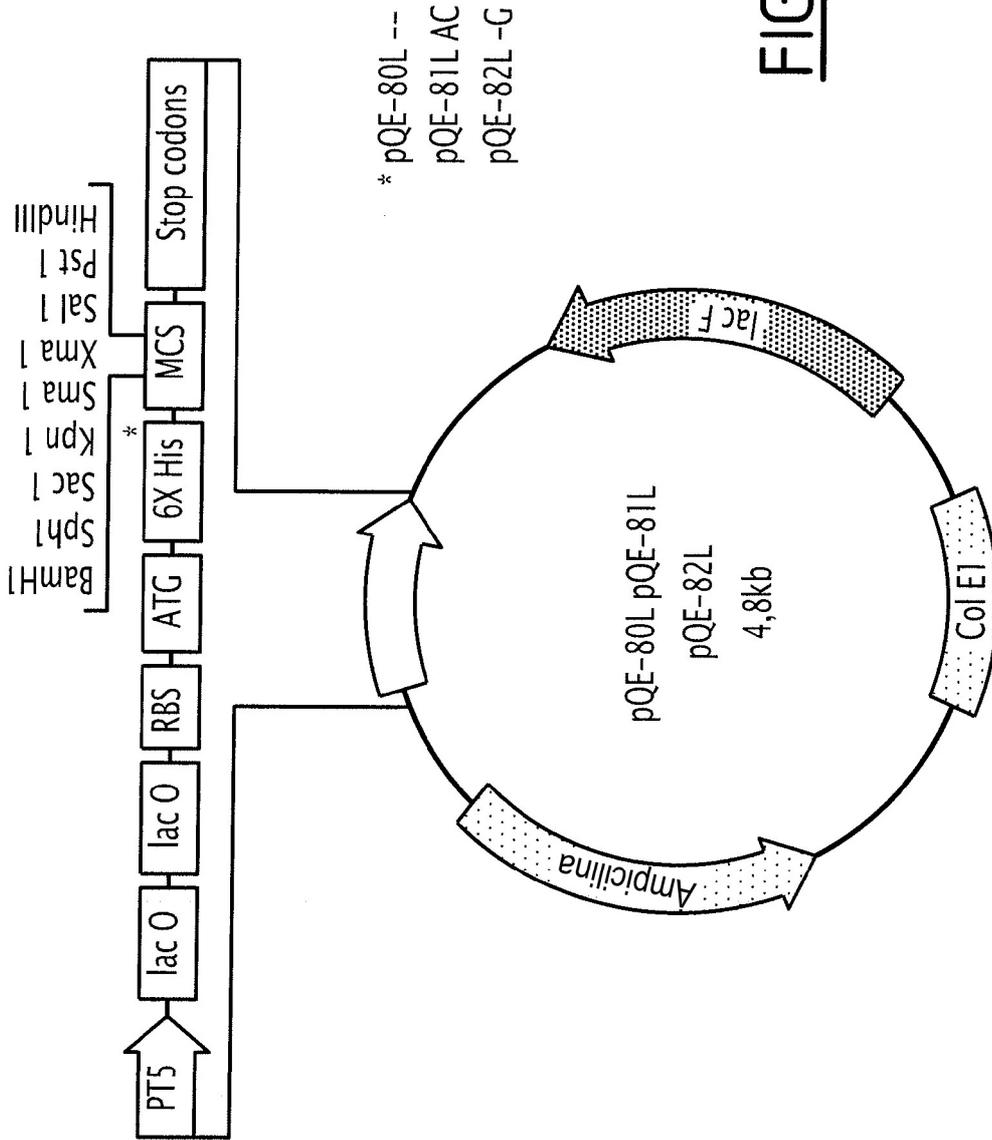


FIG.1

Lista de picos (masa de los péptidos m/z)

- 709,3434
- 804,2637
- 808,2713
- 832,2990
- 918,4548
- 1026,5706
- 1182,6604
- 1269,5841
- 1273,6055
- 1480,7358
- 1497,7590
- 1559,6200
- 1886,8108
- 1891,7970
- 2095,9417
- 2223,0097
- 2366,0989
- 2356,0971
- 2771,3205
- 2785,3423
- 3246,5380

Cobertura de la secuencia de PKS1:

SKDEQTVYPIAGMAIGNPQYRCTONEALAVASKCPGLESIKPVLER
 IYGNRSRIGSRIFAPEFTPGRAAKGDPPLFYPADGSYQVPEVDVRIKDF
 KEKAVPLVSDVARRAIKEAGLNVEDISKLVVVSSTGFLGPGLDCELI
 KNLGLTRSVDRFLIGFMGCAAMNGFRNANDYVTANPGKYALMICVE
 LSSVHTTFDDNINDAILHAIFADGCCAAAVLKARKSECPKGF LAI VD
 NHAWLMEGTEDGITLAIKPNGITCTLSKFLPOXIANKNIAPFADGFLK
 KHKLGRDDVDFWCVHPGRRRIIEEAQNGIGLSEEQTFADSWAVLGEYG
 NMLSPSVMFVLSRVFKRHNAALAQCKPGYQTCMAFSPSPGVGAEGIL
 LRQI

Identificación:

Masa: 44433, Puntuación: 163, Expectativa: 6e-10, Coincidencias: 32
 gi|299471698 Pollicétido sintasa III [Ectocarpus siliculosus]

FIG.2

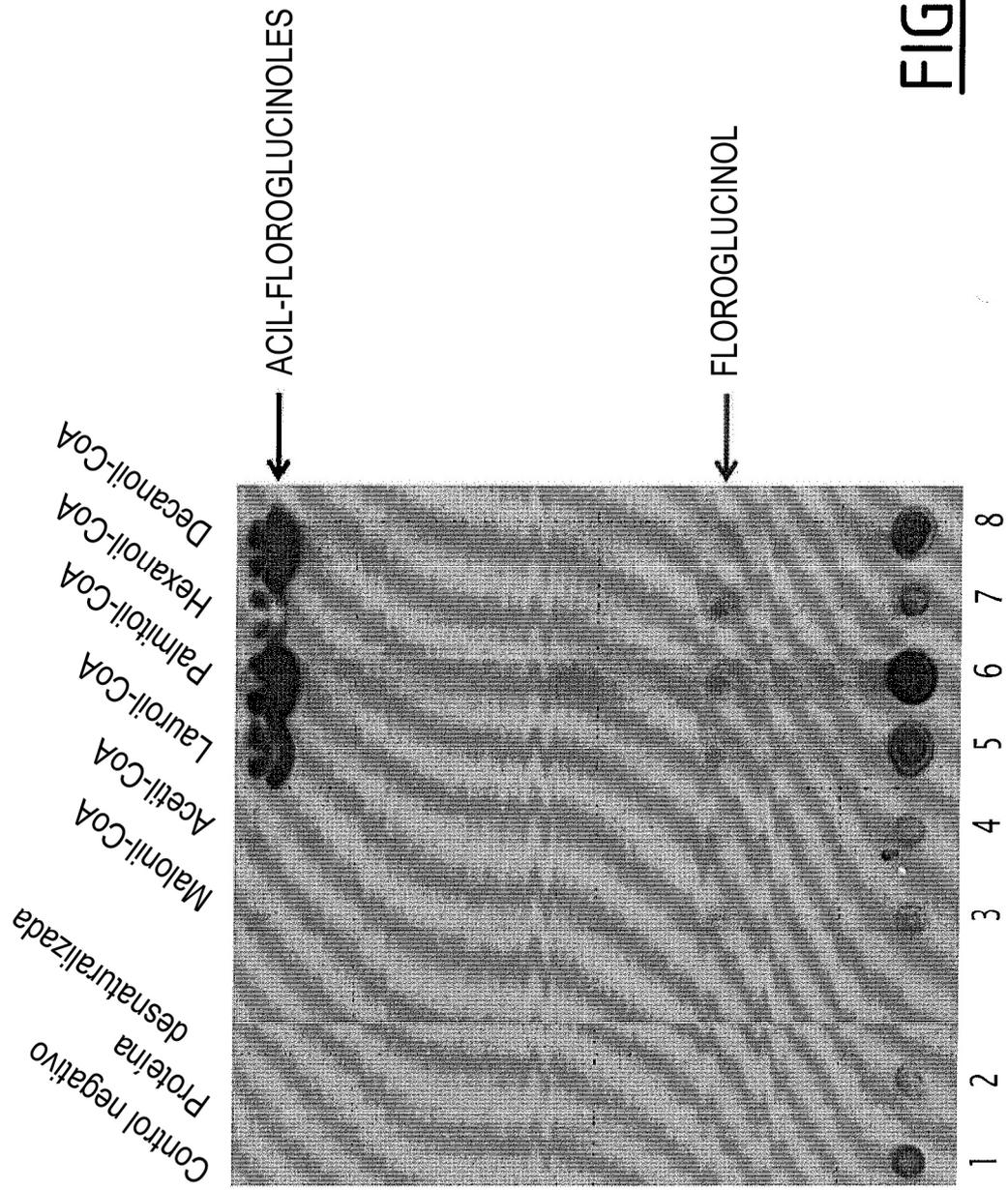


FIG.3

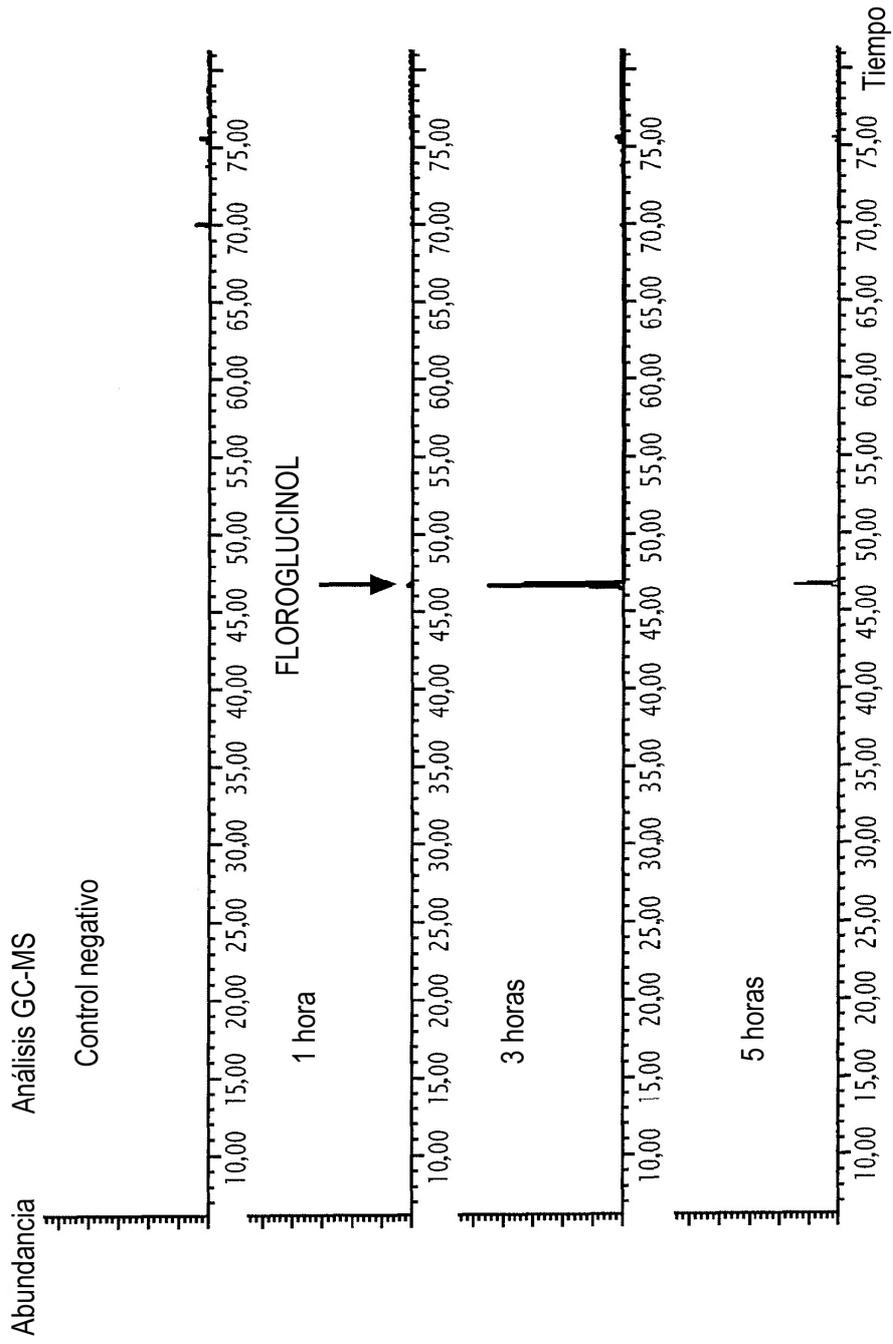


FIG.4

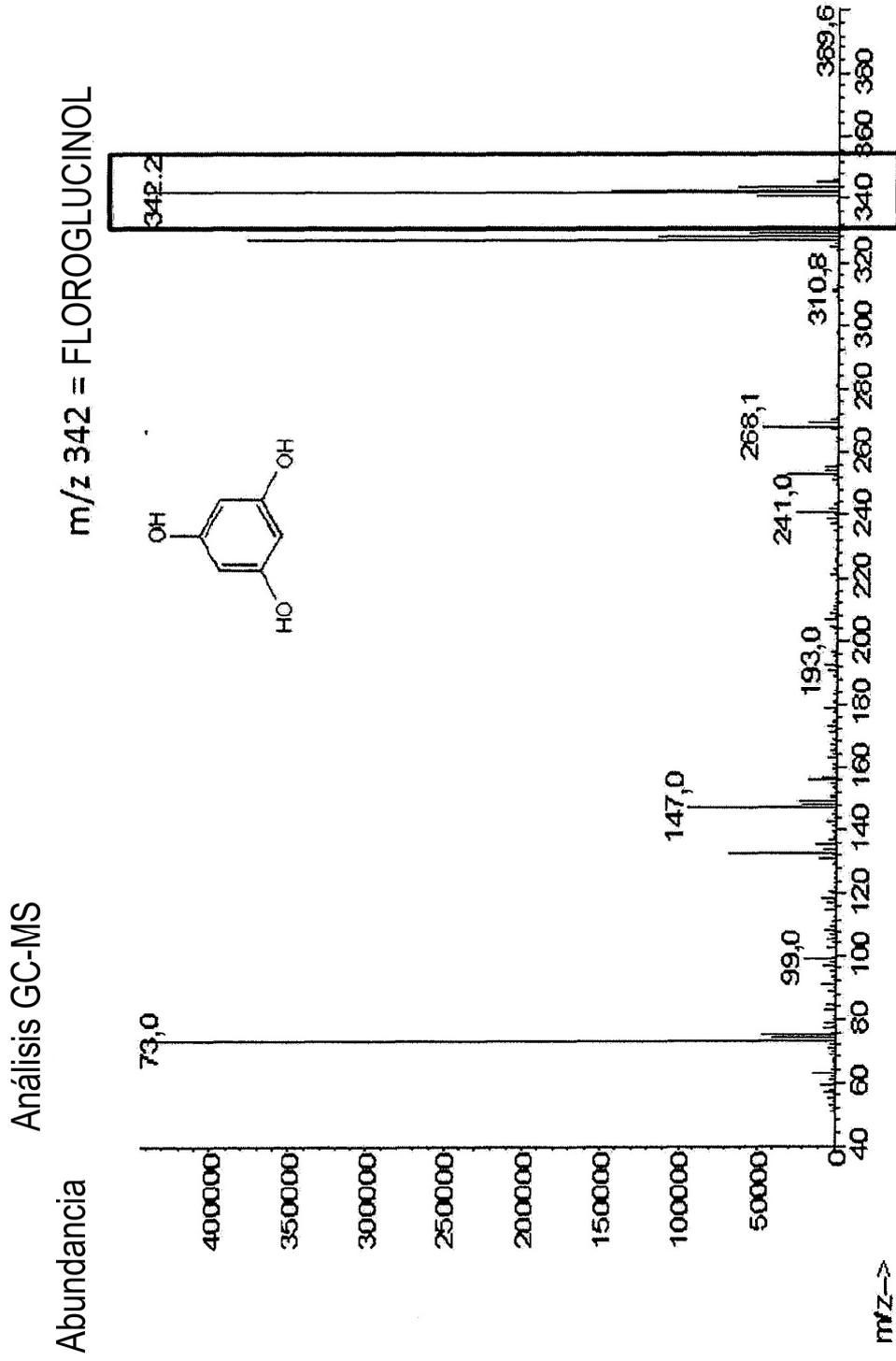


FIG.5

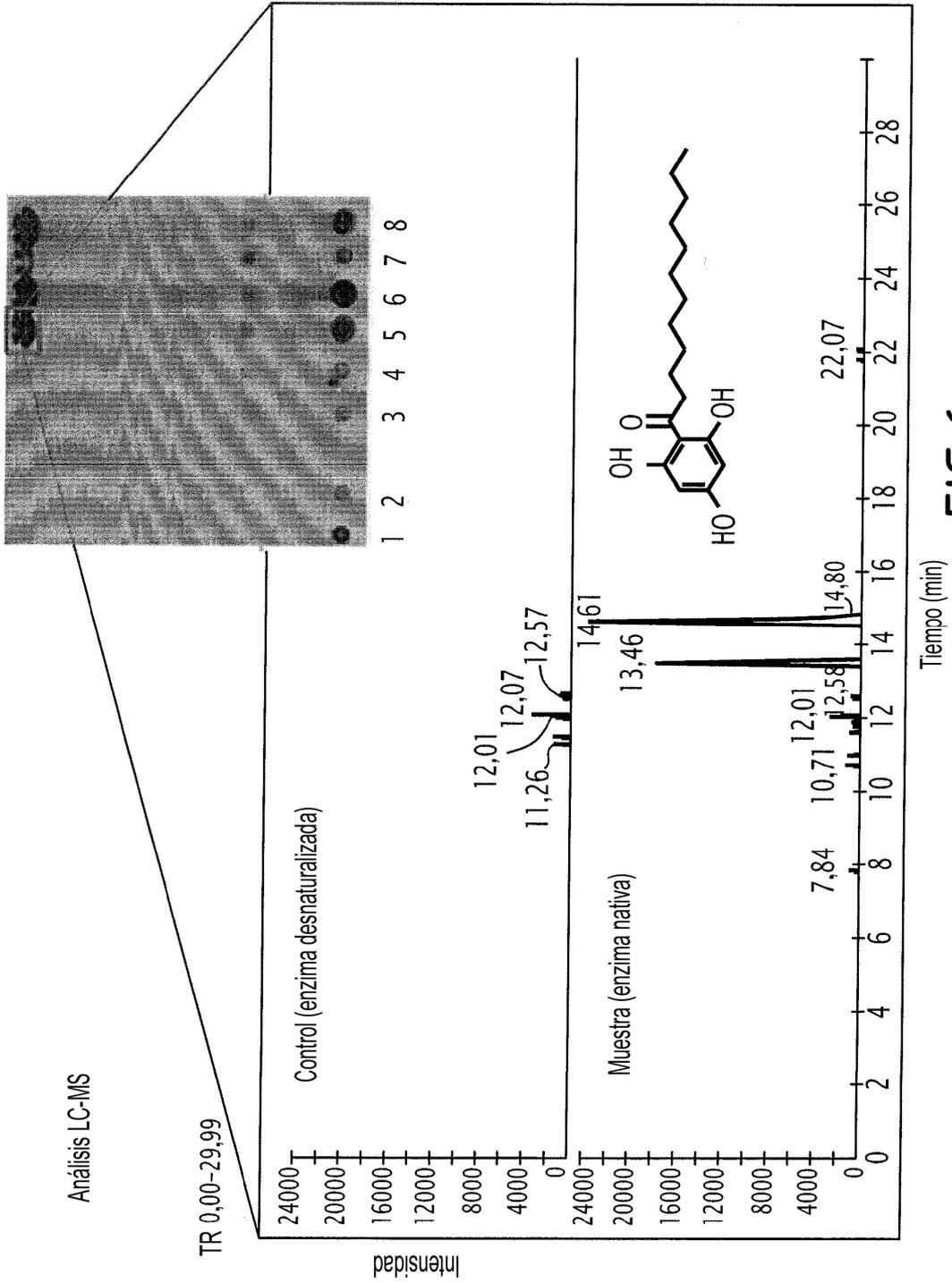


FIG.6

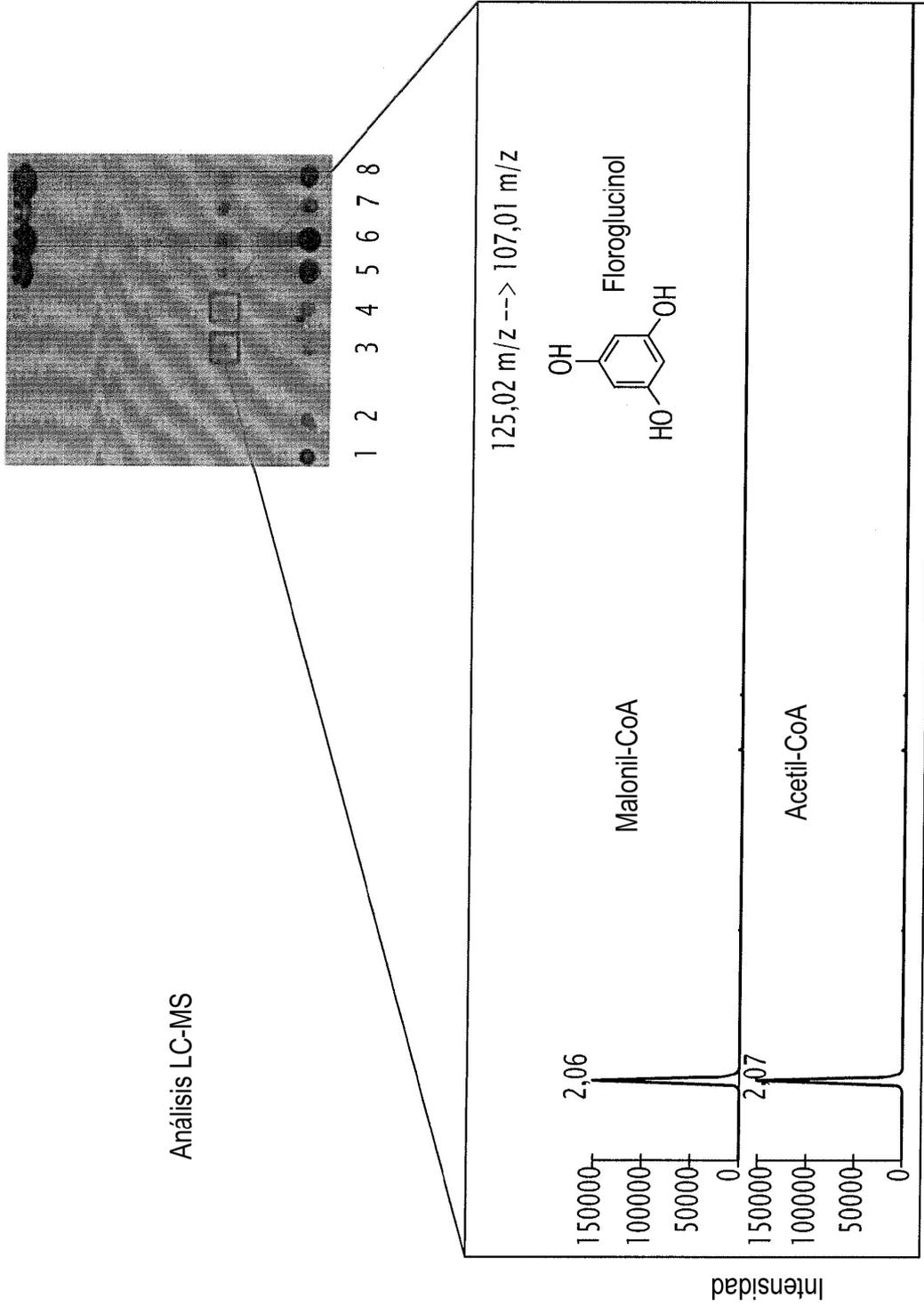


FIG.7