

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 976**

51 Int. Cl.:

A21D 8/04	(2006.01)	A23L 33/135	(2006.01)
A61K 9/48	(2006.01)		
A61K 31/20	(2006.01)		
C12R 1/00	(2006.01)		
C12P 7/64	(2006.01)		
A23K 10/18	(2006.01)		
A23P 10/30	(2006.01)		
A23L 29/00	(2006.01)		
A23L 33/115	(2006.01)		
A23L 33/12	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2006 E 17162278 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3238543**

54 Título: **Microorganismos eucariotas para la producción de lípidos y antioxidantes**

30 Prioridad:

07.06.2005 US 688207 P
16.12.2005 US 751401 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 729 976 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Microorganismos eucariotas para la producción de lípidos y antioxidantes

- 5 1. La presente solicitud reivindica el beneficio de y la prioridad para la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 60/688.207, presentada el 7 de junio de 2005, y la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 60/751.401, presentada el 16 de diciembre de 2005.

I. ANTECEDENTES

10

2. Hay una evidencia científica abrumadora de que los ácidos grasos (n-3) altamente insaturados tales como el ácido docosahexaenoico (DHA) tiene un efecto positivo sobre enfermedades cardiovasculares, inflamaciones crónicas y trastornos cerebrales. Los ácidos grasos (n-6), por otro lado, se han observado como metabolitos intermediarios en los esteroides eicosanoides, tales como prostaglandina, leucotrienos o similares.

15

3. En la actualidad, la principal fuente de estos ácidos grasos altamente insaturados es el pescado, con DHA y ácido eicosapentaenoico (EPA) observados en diversos pescados azules (tales como las sardinas y el atún) en cantidades de alrededor del 20 % y del 10 %, respectivamente. Sin embargo, si se pretende utilizar el aceite de pescado como la única fuente de estos lípidos, existen varias desventajas, como problemas de mal sabor, fluctuaciones incontrolables en la disponibilidad, variabilidad natural del contenido de aceite de pescado, así como la posibilidad de acumular contaminantes ambientales nocivos. Además, si se pretende obtener un aceite (n-3) o (n-6) altamente purificado de estas fuentes, es muy difícil separarlo y purificarlo de manera preferente.

20

II. SUMARIO

25

4. Se desvelan composiciones y métodos relacionados con un eucariota del orden Thraustochytriales y de la familia Thraustochytriaceae que, cuando se cultiva, produce cantidades de ácidos grasos insaturados, tales como aceites de omega 3 (n-3) y/u omega 6 (n-6), tales como DHA, EPA y DPA, capaces de ser purificados y de usarlos como se usan todas estas composiciones y más, debido a sus medios de producción.

30

III. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

35

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

7. La Figura 2 muestra gráficamente una comparación de éster metílico de ácidos grasos entre el aislado original de ONC-T18 recolectado en Advocate Harbor y el de *Thraustochytrium sp* ONC-T18 que se presenta con ATCC como PTA-6245. Todos los picos se identificaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas;

40

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

45

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

10. La Figura 5 muestra una tabla de organismos productores de aceite aislados como se describe en otra parte del presente documento;

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

50

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

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

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

55

15. La Figura 10 muestra una comparación de los máximos de producción de ácidos grasos y las composiciones bajo varias alternativas, las fuentes de carbono de bajo costo;

16. La Figura 11 muestra una agrupación de aislamientos recopilados en función de sus perfiles de PUFA C20 y C22. Los resultados se compararon con dos cepas de referencia: ATCC 20891 y MYA-1381;

60

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

18. La Figura 13 muestra el perfil de ácidos grasos de ONC-T18 cultivado en un medio que contiene 2 g l⁻¹ de extracto de levadura, 8 g l⁻¹ de L-glutamato, 6 g l⁻¹ de sal marina y 60 g l⁻¹ de glucosa en 3 tipos diferentes de fermentación: placa agar (1,5 % de agar, a 25 °C, 27 días), matraces (50 ml en matraz de 250 ml, a 120 RPM, 25 °C, 3 días) y biorreactor de 5 litros (4 lpm aire, pO₂ 90 %, 25 °C, 3 días);

65

19. La Figura 14 muestra el cromatograma de HPLC de compuestos de carotenoides aislados de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18. Por ejemplo, astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenona y β -caroteno se aislaron de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18;

5 20. La Figura 15 muestra la biomasa típica, el ácido graso total (AGT), la producción de DHA y la utilización de glucosa de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 mantenida en un biorreactor de 5 l durante 168 h con medio compuesto de 60 g·l⁻¹ de glucosa, 2 g·l⁻¹ de extracto de levadura, 8 g·l⁻¹ de ácido glutámico y 6 g·l⁻¹ de sal (4 l pm aire) pO₂ al 90 %, 25 ° C, pH 7-9);

21. La Figura 16 muestra las rutas postuladas involucradas en la formación de astaxantina en *Thraustochytrium* sp. ONC-T18.

10

IV. DESCRIPCIÓN DETALLADA

22. Antes de que se desvelen y se describan los presentes compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o métodos, debe entenderse que no se limitan a métodos sintéticos específicos o a métodos de la biotecnología recombinante salvo que se especifique lo contrario, o a reactivos particulares salvo que se especifique lo contrario, como tal, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea una limitación.

23. Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de determinar, usando nada más que la experimentación habitual, muchos equivalentes para las realizaciones específicas del método y las composiciones descritas en el presente documento. Dichos equivalentes pretenden estar abarcados por las reivindicaciones a continuación.

A. Definiciones

24. Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un vehículo farmacéutico" incluye las mezclas de dos o más de estos vehículos y similares.

25. Los intervalos se pueden expresar en el presente documento como desde "aproximadamente" un valor particular, y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, otra realización incluye desde el un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando se expresan los valores como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otra realización. Se entenderá adicionalmente que los extremos de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro extremo, como independientemente del otro extremo. También se entiende que hay una serie de valores desvelados en el presente documento, y que cada uno de los valores también se desvela en el presente documento como "aproximadamente" ese valor particular además del valor en sí. Por ejemplo, si se desvela el valor "10", entonces también se desvela "aproximadamente 10". También se entiende que cuando se desvela un valor que es "menor que o igual a" el valor, "mayor que o igual al valor" e intervalos posibles entre valores también se desvelan, tal como entiende apropiadamente el experto en la materia. Por ejemplo, si se desvela el valor "10", entonces también se desvela "menor o igual a 10" así como "mayor o igual a 10". También se entiende que a través de la solicitud, se proporcionan los datos en una serie de formatos diferentes, y que estos datos, representan los puntos finales y los puntos de partida, y los intervalos para cualquier combinación de puntos de datos. Por ejemplo, si se desvela un punto particular de dato "10" y un punto particular de dato "15", se entiende que más de, más de o igual a, menos de, menos de o igual a; e igual a 10 y 15 se consideran desvelados así como entre 10 y 15. También se entiende que también se desvela cada unidad entre dos unidades particulares. Por ejemplo, si se desvelan 10 y 15, entonces también se desvelan 11, 12, 13 y 14.

26. Por "reducir" u otras formas o reducir significa disminuir de un evento o característica. Se entiende que esto está normalmente en relación con algún valor estándar o esperado, en otras palabras, es relativo, pero ese no es siempre necesario para el valor estándar o relativo al que se cita. Por ejemplo, "reduce la fosforilación" significa que disminuye la cantidad de fosforilación que tiene lugar en relación con un estándar o un control. Se entiende que salvo que se indique específicamente lo contrario, se puede reducir un compuesto o composición o condición en relación con otro compuesto o composición o condición.

27. Por "inhibir" u otras formas de medios de inhibir se refiere a obstaculizar o restringir una característica particular. Se entiende que esto está normalmente en relación con algún valor estándar o esperado, en otras palabras, es relativo, pero ese no es siempre necesario para el valor estándar o relativo al que se cita. Por ejemplo, "inhibe la fosforilación" significa que obstaculiza o restringe la cantidad de fosforilación que tiene lugar en relación con un patrón o un control. Se entiende que salvo que se indique específicamente lo contrario, se puede inhibir un compuesto o composición o condición en relación con otro compuesto o composición o condición.

28. Por "prevenir" y otras formas de prevenir se refiere a detener una característica o condición particular. Prevenir no requiere comparación con un control, ya que suele ser más absoluto que, por ejemplo, reducir o inhibir. Tal como se usa en el presente documento, se podría reducir algo pero no inhibir o prevenir, pero algo que se reduce también se podría inhibir o prevenir. Se entiende que cuando se usa reducir, inhibir o prevenir, a menos que se indique

específicamente lo contrario, el uso de las otras dos palabras también se desvela expresamente. Por tanto, si se desvela que se inhibe la fosforilación, entonces también se desvela que se reduce y se previene la fosforilación.

29. La expresión "terapéuticamente eficaz" significa que la cantidad de la composición usada es de cantidad suficiente como para mejorar una o más causas o síntomas de una enfermedad o trastorno. Tal mejora solo requiere una reducción o alteración, no necesariamente la eliminación.

30. El término "vehículo" significa un compuesto, composición, sustancia o estructura que, cuando se combina con un compuesto o composición, ayuda o facilita la preparación, el almacenamiento, la administración, el suministro, la eficacia, la selectividad o cualquier otra característica del compuesto o de la composición para su uso o fin intencionado. Por ejemplo, se puede seleccionar un vehículo para minimizar cualquier degradación del principio activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto.

31. A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones de la presente memoria descriptiva, la palabra "comprender" y variaciones de la palabra, tales como "que comprende" y "comprende", significa "que incluye pero sin limitación"; y no pretende excluir, por ejemplo, otros aditivos, componentes, elementos esenciales o etapas.

32. El término "célula" tal y como se usa en el presente documento también se refiere a células microbianas individuales o cultivos que derivan de dichas células. Un "cultivo" se refiere a una composición que comprende células aisladas del mismo o un tipo diferente.

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

34. Cuando se usa con respecto a composiciones farmacéuticas y nutracéuticas, el término "estable" generalmente se entiende en la materia como que significa menos de una determinada cantidad, normalmente el 10 %, de pérdida del principio activo en las condiciones de almacenamiento especificadas durante un período de tiempo indicado. El tiempo requerido para que una composición se considere estable es relativo al uso de cada producto y está dictado por los aspectos prácticos comerciales de producir el producto, conservarlo para control de calidad e inspección, enviarlo a un mayorista o directamente a un cliente donde se mantiene de nuevo en almacenamiento antes de su uso final. Incluyendo un factor de seguridad de unos pocos meses, la vida útil mínima del producto para los productos farmacéuticos es generalmente de un año, y preferiblemente más de 18 meses. Tal como se usa en el presente documento, el término "estable" se refiere a estas realidades del mercado y a la capacidad para almacenar y transportar el producto en condiciones ambientales fácilmente alcanzables, tales como condiciones de refrigeración, de 2 °C a 8 °C.

35. Las referencias en la memoria descriptiva y las reivindicaciones finales a partes en peso, de un elemento o componente en particular en una composición o artículo, denota la relación de peso entre el elemento o componente y cualquier otro elemento o componente en la composición o artículo para el cual se expresa una parte en peso. Por tanto, en un compuesto que contiene 2 partes en peso de componente X y 5 partes en peso de componente Y, X e Y están presentes en una proporción de peso de 2:5, y están presentes en tal proporción independientemente de si hay componentes adicionales contenidos en el compuesto.

36. Un porcentaje de peso de un componente, salvo que se indique específicamente lo contrario, se basa en el peso total de la formulación o composición en el que se incluye el componente.

37. "Aislamiento" y cualquier forma tal como "aislar" se refiere a una situación en la que algo está en una forma en la que se puede manipular o purificar adicionalmente. Aislado y sus formas indica que algo está en un estado actual que es diferente al del estado previo. Por ejemplo, una molécula de ARN ribosómico puede estar "aislada" si, por ejemplo, se extrae de un organismo, se sintetiza o se produce de manera recombinante. A menudo, el "aislamiento" de una cosa es en relación a algo más. Por ejemplo, un eucariota tal y como se trata en el presente documento se puede aislar, tal y como se trata en el presente documento, mediante, por ejemplo, el cultivo del eucariota, de tal manera que el eucariota sobrevive en ausencia de cantidades apreciables (detectables) de otros organismos. Se entiende que salvo que se indique específicamente lo contrario, cualquiera de las composiciones desveladas se pueden aislar tal y como se desvela en el presente documento.

38. "Purificar" y cualquier forma tal como "purificando" se refiere al estado en el que una sustancia o compuesto o composición está en un estado de mayor homogeneidad del que lo estaba antes. Se entiende que, tal y como se desvela en el presente documento, algo puede ser, a menos que se indique lo contrario, puro a al menos el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 %. Por ejemplo, si una composición A dada fuese pura al 90 %, esto significaría que el 90 % de la composición sería A, y que el 10 % de la composición sería una o más cosas, tal como moléculas, compuestos u otras sustancias. Por ejemplo, si un microorganismo eucariota desvelado, por ejemplo, produce DHA al 35 %, esto se podría "purificar"

adicionalmente de tal manera que la composición lipídica final fuese mayor del 90 % de DHA. A menos que se indique lo contrario, la pureza se determinará mediante los "pesos" relativos de los componentes en la composición. Se entiende que salvo que se indique específicamente lo contrario, cualquiera de las composiciones desveladas se pueden purificar tal como se desvela en el presente documento.

5

39. "Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o la circunstancia posteriormente puede ocurrir o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho evento o circunstancia ocurre y casos en los que no.

40. "Cebadores" es un subconjunto de sondas que son capaces de ayudar en algún tipo de manipulación enzimática y que pueden hibridar con un ácido nucleico diana de tal manera que pueda tener lugar la manipulación enzimática. Un cebador puede estar hecho de cualquier combinación de nucleótidos o derivados o análogos de nucleótidos disponibles en la materia que no interfieren con la manipulación enzimática.

41. A lo largo de la presente solicitud, se han citado diversas publicaciones.

15

42. Se desvelan los componentes que se van a usar para preparar las composiciones desveladas así como las propias composiciones que se van a usar en los métodos desvelados en el presente documento. Estos y otros materiales se desvelan en el presente documento, y se entiende que cuando se desvelan combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales, es posible que la referencia específica de cada una de las diversas combinaciones individuales y colectivas y la permutación de estos compuestos no se desvelen explícitamente, se contemple y describa cada uno de manera específica en el presente documento. Por ejemplo, si se desvela y se trata una especie particular de la familia Thraustochytriaceae y se trata una serie de modificaciones que se pueden hacer a una serie de organismos que incluyen la especie de la familia Thraustochytriaceae, se contempla de manera específica todas y cada una de las combinaciones y permutaciones de esta especie de la familia Thraustochytriaceae y las modificaciones que sean posibles salvo que se indique específicamente lo contrario. Por tanto, si se desvela una clase de moléculas A, B y C así como una clase de moléculas D, E y F y un ejemplo de molécula de combinación, A-D se desvela, entonces incluso si cada una no se cita de manera individual, se contempla de manera individual y colectiva que significa que las combinaciones, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E y C-F se consideran desveladas. De forma análoga, cualquier subconjunto o combinación de estas también se desvela. Por tanto, por ejemplo, el subgrupo de A-E, B-F y C-E se considerarían desvelados. Este concepto se aplica a todos los aspectos de la presente solicitud que incluye, pero sin limitación, etapas en métodos de preparación y uso de las composiciones desveladas. Por tanto, si hay una variedad de etapas adicionales que se pueden realizar, se entiende que cada una de estas etapas adicionales se puede realizar con cualquier realización específica o combinación de realizaciones de los métodos desvelados.

35

B. Composiciones

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

44. También se desvelan condiciones para el aislamiento y el cultivo de los microorganismos eucariotas. Por ejemplo, a continuación se incluyen condiciones de cultivo heterotróficas para la producción de los lípidos y antioxidantes desvelados, por ejemplo, tanto de forma individual como de forma acumulativa.

50 Por consiguiente, mediante el uso de este único eucariota, es posible producir de manera eficaz la serie (n-3) de DHA y/o la serie (n-6) de DPA y/o la serie carotenoide de compuestos antioxidantes y/o la serie de xantofilas de compuestos antioxidantes, que son útiles como o en los nutracéuticos, aditivos alimenticios, productos farmacéuticos o en la industria.

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

46. Se entiende que el microorganismo eucariota y cualquiera de los clones, organismos o genes modificados aislados de dicho organismo tal como se establece en ONC-T18 también se desvelan. Los organismos desvelados tienen la capacidad de producir ácidos grasos insaturados, tales como lípidos que contienen la serie omega-3 de DHA y EPA y la serie omega-6 de DPA y diversos antioxidantes tales como carotenoides, xantofilas y fenólicos.

47. También se desvelan procesos para la producción de biomasa que contiene dichos compuestos. Se desvelan adicionalmente procesos para la preparación de compuestos omega-3, omega-6 y carotenoides utilizando el

65

microorganismo eucariota. También se desvelan procesos para la producción de aceites de origen microbiano (o unicelulares).

48. Además, se desvelan ácidos grasos y carotenoides producidos mediante el microorganismo eucariota desvelado y cualquier progenie (modificada genéticamente o de otro modo), diversos piensos, nutracéuticos, productos farmacéuticos y alimentos suplementados con los lípidos y antioxidantes, así como un proceso para la utilización de estos compuestos como un aditivo para diversos piensos y alimentos.

49. La patente de los Estados Unidos n.º 5.130.242 para Barclay desveló un proceso de recolección y cribado para aislar cepas de microorganismos con las siguientes características para la producción de ácidos grasos omega-3: 1) capaz de cultivo heterotrófico; 2) produce un alto contenido de ácidos grasos omega-3; 3) unicelular; 4) produce un bajo contenido de ácidos grasos convencionales y omega-6; 5) células no pigmentadas, blancas o incoloras; 6) termotolerantes (por ejemplo, capacidad para crecer por encima de los 30 °C); y 7) eurihalina (por ejemplo, capacidad para crecer en un intervalo amplio de salinidades, pero preferentemente a baja salinidad).

50. La divulgación '242 también describe un proceso para la producción heterotrófica de productos microbianos extraídos o con célula completa con una elevada concentración de ácidos grasos omega-3, que se pueden usar más tarde en productos alimenticios para animales o humanos. Este proceso usa microorganismos identificados mediante el proceso de recolección y cribado desvelado de la misma. Este microorganismo, que es del orden *Thaustochytriales*, se cultiva en grano molido. Para mejorar la producción de ácidos grasos omega-3, se usa el estrés a bajas temperaturas y elevado oxígeno disuelto, así como la adición de antioxidantes, factores de crecimiento, vitaminas y fósforos. Los productos extraídos contienen altas concentraciones de ácidos grasos omega-3 (por ejemplo, C20:5w3, C22:5w3; y C22:6w3) y bajas concentraciones de ácidos grasos omega-6 (por ejemplo, C20:4w6 y C22:5w6). En concreto, las proporciones de ácidos grasos de C20:5w3 a C22:6w3 van de 1:1 a 1:30. Las proporciones de ácidos grasos de C22:5w3 a C22:6w3 van de 1:12 a solo cantidades traza de C22:5w3. Asimismo, los microorganismos producen DHA del 0,6 al 0,72 %, DPA del 0 al 5 % y EPA del 0 al 18,9 %, en peso de ácido graso total.

51. La patente de los Estados Unidos n.º 6.451.567 para Barclay desveló un proceso para cultivar *Thraustochytrium* y *Schizochytrium* en un medio sin cloruro (<3 g/l) que contiene sales de sodio (por ejemplo, sulfato de sodio). El medio sin cloruro da como resultado tamaños de agregados celulares de menos de 150 µm. El proceso desvelado produce microorganismos y extractos que son útiles en productos alimenticios para acuicultura. Los componentes adicionales de los productos alimenticios incluyen alimentos de linaza, colza, soja y aguacate. Los microorganismos pueden producir 1,08 g/l de medio por día de ácidos grasos omega-3. La divulgación '567 describe adicionalmente diversos medios de cultivo, que incluyen agua de mar, glucosa (1, 3, 5, o 10 g/l), extracto de levadura (0,01, 0,2, 0,4 y 5 g/l), fuentes de nitrógeno adicionales tales como hidrosilato de proteína (1 g/l), extracto de hígado (1 g/l), glutamato (5 g/l), MSG (3 g/l) y sales adicionales, vitaminas traza y minerales (por ejemplo, KH₂PO₄, MgSO₄ y extracto de gelatina).

52. La patente de Estados Unidos n.º 6.582.941 para Yokochi et al. desvela una especie de *Schizochytrium*, cepa SR21 y otra cepa de *Schizochytrium* que pertenece a la misma especie que tienen la capacidad de producir fracciones de ácido graso que tienen una alta concentración de DHA omega-3 y/o DPA omega-6 y una baja concentración de EPA. Asimismo, se desvelan métodos de cultivo de tales microorganismos y de aislamiento de tales ácidos grasos. El medio usado contiene sal marina, extracto de levadura (0,2, 1,0 o 10 g/l), licor de maíz fermentado (0,5, 1,0 o 10 g/l), glucosa (10-120 g/l), más sales adicionales (por ejemplo, NH₄OAc, fosfatos). Las composiciones de ácidos grasos contienen aproximadamente DHA del 15 al 20 % en peso de biomasa (aproximadamente el 28 % en peso del ácido graso total). Las composiciones se pueden usar en productos alimenticios (por ejemplo, leche para lactantes).

53. La patente de los Estados Unidos n.º 6.607.900 para Bailey desveló un proceso para cultivar microorganismos eucariotas (por ejemplo, *Schizochytrium sp.* ATCC N.º 20888) que son capaces de producir al menos el 20 % de su biomasa como lípidos poliinsaturados (en particular, ácidos grasos omega-3 y omega-6). El proceso implica cultivar el microorganismo en un medio que contiene una fuente de carbono y de nitrógeno. También se desvela el uso de bajos niveles de oxígeno disuelto (menos del 3 %) y bajos niveles de ion cloruro (menos de 3 g/l) para mejorar la producción. Los microorganismos tienen una tasa de producción de lípidos de al menos 0,5 g/l/h. La fracción de lípidos es de DHA del 15 al 20 % en peso de biomasa (aproximadamente el 35 % en peso del total del éster metílico de ácido graso).

54. La publicación de los Estados Unidos n.º 2004/0161831 para Komazawa et al. desvela una cepa de *Thraustochytrium* (LEF1; ATCC N.º FERM BP-08568) que tiene la capacidad de producir DHA. Mediante el cultivo en medio convencional, el microorganismo puede producir aceite con DHA al menos al 50 % en peso. El aceite se puede tratar con una lipasa antes del aislamiento del DHA. El aceite se puede usar en alimentos o bebidas o el DHA se puede hidrolizar para producir ácido behénico.

1. Ácidos grasos

55. Los ácidos grasos son cadenas de hidrocarburos que finalizan en un grupo carboxilo, que se llaman insaturados si contienen al menos un doble enlace carbono-carbono, y poliinsaturados cuando contienen múltiples enlaces de este tipo. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA, del inglés *polyunsaturated fatty acids*) o los ácidos

grasos altamente insaturados (HUFA, del inglés *highly-unsaturated fatty acids*), se pueden dividir en las series (n-3) y (n-6) como resultado de la localización de estos enlaces dobles. Hay una evidencia científica abrumadora de que los ácidos grasos (n-3) altamente insaturados tales como el DHA tienen un efecto positivo sobre las enfermedades cardiovasculares, inflamaciones crónicas y trastornos cerebrales. Los ácidos grasos (n-6), por otro lado, se han observado como metabolitos intermediarios en los esteroides eicosanoides, tales como prostaglandina, leucotrienos o similares.

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

57. En la actualidad, la principal fuente de estos ácidos grasos altamente insaturados es el pescado, con DHA y EPA observados en diversos pescados azules (tales como las sardinas y el atún) en cantidades de alrededor del 20 % y del 10 %, respectivamente. Sin embargo, si se pretende utilizar el aceite de pescado como la única fuente de estos lípidos, existen varias desventajas, como problemas de mal sabor, fluctuaciones incontrolables en la disponibilidad, variabilidad natural del contenido de aceite de pescado, así como la posibilidad de acumular contaminantes ambientales nocivos. Además, si se pretende obtener un aceite (n-3) o (n-6) altamente purificado de dichas fuentes, es muy difícil separarlo y purificarlo de manera preferente. En concreto, hay un gran mercado disponible dentro del mercado de suplementos neonatales para una forma altamente concentrada de DHA. Si el aceite de pescado fuera la fuente de dichos productos, entonces el DHA tendría que aislarse preferentemente en grandes cantidades de la EPA. Claramente, se necesita una fuente alternativa de estos ácidos grasos altamente insaturados altamente purificados y de producción.

58. Además de los aceites de pescado, diversos microorganismos (principalmente marinos) son capaces de producir y/o acumular la serie (n-3) de ácido docosahexaenoico. Es de particular interés el hecho de que la producción microbiana no es objeto de fluctuaciones causadas por variables externas tales como la estacionalidad, el tiempo y el suministro de alimentos. Por ejemplo, se sabe que los siguientes microorganismos tienen la capacidad de producir DHA: la bacteria *Vibrio marinus* (ATCC 15381) de origen de aguas profundas, *Vibrio* sp. T3615, *Photobacterium profundum* SS9, *Mortierella marina* MP-1 y *Psychromonas kaikoae* (ATCC BAA-363T); especies microalgales tales como *Cryptothecodinium cohnii*, *Cyclotella cryptica* y *Mortierella alpina* (IS-4); y los protistas *Thraustochytrium* sp. (ATCC 20892), *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) y *Thraustochytrium roseum*. De acuerdo con un proceso que utiliza estos organismos purificados, sin embargo, la cantidad de ácido docosahexaenoico producida por gramo de biomasa por litro es baja, estando en el intervalo de 10 a 500 mg. Algunos ejemplos representativos de organismos productores de aceites microbianos se muestran en la Figura 5.

59. Los omega 3 han demostrado tener efectos beneficiosos y los aceites y las composiciones desveladas en el presente documento se pueden usar para el efecto antiinflamatorio sobre la fibrosis quística (Cochrane Database Syst Rev. 3), la artritis reumatoide (Drugs 63: 845-53), el asma (Ann Allergy Asthma Immunol 90: 371-7) y el ictus tromبótico (Prev Cardiol 6: 38-1), cardioprotector, así como un efecto directo sobre la arteriosclerosis y la arritmia (Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 63:351-62), la inhibición de la proliferación del cáncer en líneas celulares de cáncer de mama y de próstata en experimentos con animales (Am J Clin Nutr 77: 532-43), efecto antipsicótico sobre la esquizofrenia (J Neural Transm Suppl 64:105-17) y otras enfermedades psiquiátricas (Can J Psychiatry 48: 195-203), suplemento inmunonutritivo usado para el desarrollo normal de los neonatos y en el tratamiento de infecciones neonatales (Eur J Pediatr 162: 122-8), y tratamiento del dolor patológico mediante la atenuación directa de procesos neuronales y ganglionares que subyacen al dolor neuropático e inflamatorio (Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 68: 219-24).

2. Thraustochytriaceae

50 a) ONC-T18

60. El organismo marino ONC-T18, tal como se desvela en el presente documento, se recolectó como parte de un viaje de aislamiento de microbios productores de PUFA, con más de 60 cultivos puros aislados (véase la tabla 7 para detalles). Además, ONC-T18 se aisló de las hojas de los pastizales de las marismas saladas en Advocate Harbor, Bahía de Fundy, Nueva Escocia, Canadá. Mediante exámenes al microscopio y técnicas de purificación de cultivos en serie, se pensó que la cepa era un microorganismo único que pertenecía al género *Thraustochytrium*. Se cultivaron todas las cepas y dos cultivos de comparación de ATCC (ATCC 20891 y MYA-1381) en glucosa al 0,5 %, peptona al 0,2 %, extracto de levadura al 0,2 % en agua de mar (SW, del inglés *sea water*) y se sometieron a análisis de GC (éster metílico del ácido graso, FAME).

61. La Figura 6 muestra un árbol filogenético propuesto de las relaciones entre ONC-T18 y otros organismos estrechamente relacionados.

62. Se aisló originalmente la ONC-t18 como un único microbio usando las técnicas clásicas de cebado con polen de pino, seguido por el cultivo en medio selectivo. En concreto, se preparó un medio de nutrientes que contiene 5 g l⁻¹ de

glucosa, 2 g l⁻¹ de peptona, 2 g l⁻¹ de extracto de levaduras para 1 l de agua de mar filtrada a 0,2 µm. Después se determinó el perfil de ácidos grasos de ONC-T18 usando el método de extracción de Bligh y Dyer y las técnicas de cromatografía de gas de PUFA. Los resultados cromatográficos demostraron la capacidad de esta cepa para producir elevadas cantidades de TFA, DHA, así como cantidades notables de EPA y DPA.

5

63. El microorganismo eucariota desvelado se puede usar en un proceso para la preparación de un lípido o grasa que contiene DHA, EPA y DPA, pero no se limita a la cepa ONC-T18 o PTA-6245 mencionada anteriormente, sino a cualquier derivación de dicha cepa tanto si es mediante modificación genética, mutagénesis química, adaptación fermentativa o cualquier otro medio de producción de mutantes de la cepa, mediante el cual el producto de estas modificaciones tiene características genéticas o morfológicas y funcionales tales como el microorganismo eucariota, tal como se desvela en el presente documento.

64. Se desvela un microorganismo eucariota capaz de producir una composición lipídica que tiene propiedades distintivas de la clase de lípido, y la solución al problema de mantener una fuente estable, segura y económica para dicho lípido que tiene un valor altamente funcional y adicional de acuerdo con la misma. Por lo tanto, en el presente documento se desvelan cepas silvestres que producen la serie (n-3) de DHA y la serie (n-6) de DPA a un mayor grado así como cepas variantes y recombinantes diseñadas para producir estos ácidos grasos poliinsaturados a un mayor grado. Dichos microorganismos variantes o recombinantes incluyen los diseñados para tener un mayor contenido de dichos lípidos que los producidos por la cepa original de tipo silvestre, cuando se cultivan usando las mismas condiciones y los mismos medios. Además, también se incluyen los microorganismos diseñados para producir un lípido que contiene cantidades similares de la serie (n-3) de DHA, EPA y la serie (n-6) de DPA se pueden seleccionar, en comparación con las correspondientes cepas de tipo silvestre, usando de manera eficaz sustratos que tienen un rendimiento del coste superior.

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

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

67. También se desvelan composiciones en donde el lípido comprende un lípido tal como se desvela en el presente documento.

68. También se desvelan composiciones, en donde el eucariota comprende un miembro del orden Thraustochytriales.

69. También se desvelan composiciones, en donde el eucariota tiene una secuencia génica de ARN ribosómico 18S que tiene al menos el 80 % de identidad con la SEQ ID NO:1.

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

50 b) Clasificación

71. El microorganismo eucariota puede ser del filo Labyrinthulomycota. El microorganismo eucariota puede ser de la clase Labyrinthulomycetes. El microorganismo eucariota puede ser de la subclase Thraustochytriade. El microorganismo eucariota puede ser del orden Thraustochytriales. El microorganismo eucariota puede ser de la familia Thraustochytriaceae. El microorganismo eucariota puede ser del género *Thraustochytrium*. El microorganismo eucariota puede ser un *Thraustochytrium* sp. El microorganismo eucariota puede ser *Thraustochytrium aureum*. El microorganismo eucariota puede ser *Thraustochytrium roseum*. El microorganismo eucariota puede ser *Thraustochytrium striatum*. El microorganismo eucariota puede ser del género *Schizochytrium*. El microorganismo eucariota puede ser *Schizochytrium* sp. El microorganismo eucariota puede ser una versión modificada de cualquiera de los microorganismos eucariotas enumerados. El microorganismo eucariota también puede comprender cualquiera de los miembros actualmente desconocidos o aislados de dicha clase, subclase, orden, familia o género de procariontes. Una combinación de microorganismos eucariotas puede ser cualquier combinación de cualquiera de los organismos desvelados en el presente documento, incluyendo, uno o más de *Thraustochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium striatum* y *Thraustochytrium roseum*.

65

72. Los microorganismos eucariotas de la familia Thraustochytriaceae pueden ser cualquiera de los desvelados anteriormente. El microorganismo eucariota puede comprender cualquier organismo que tenga un número de registro ATCC PTA-6245.

5 c) Genética

73. El microorganismo eucariota puede tener la secuencia de ARNr 18S de la SEQ ID NO:1. El microorganismo eucariota puede tener una secuencia de ARNr 18S que, por ejemplo, tiene aproximadamente el 90 % de homología o cualquier otra identidad desvelada en el presente documento, con la SEQ ID NO: 1. El microorganismo eucariota puede tener una secuencia de ARNr 18S que hibrida en condiciones rigurosas o cualquier otras condiciones tales como las desveladas en el presente documento, con la SEQ ID NO:1 o una parte de la SEQ ID NO:1.

74. La similitud/identidad de la secuencia y la hibridación de ácido nucleico de los ácidos nucleicos de los organismos puede ser tal como se describe en el presente documento. En concreto, la comparación de la SEQ ID NO:1 con las secuencias de ácido nucleico halladas en la base de datos genómica, GenBank (National Centre for Biotechnology Information, National Institute of Health, Bethesda, MD, EE.UU.) usando el algoritmo BLAST (del inglés *Basic local alignment search tool* o herramienta básica de búsqueda de alineación local) identificó que la SEQ ID NO:1 estaba relacionada (con similitud del 91 %) con varias especies eucariotas de Traustochytrids, estrechamente relacionadas con *Thraustochytrium* sp. CHN-1 [AB126669] (con similitud del 94,5 %) y *Thraustochytriidae* sp. N1-27 [AB073308] (con el 95,5 % de similitud), y lo más estrechamente relacionadas con *Thraustochytrium striatum* [AF265338] (similitud del 97,5 %).

3. (1) Similitudes de secuencia

75. Se entiende que, tal y como se trata en el presente documento, el uso de los términos homología e identidad se refieren a lo mismo que similitud. Por tanto, por ejemplo, si el uso de la palabra homología se usa entre dos secuencias no naturales se entiende que esto no indica necesariamente una relación evolutiva entre estas dos secuencias, sino que mira la similitud o la relación entre sus secuencias de ácido nucleico. Muchos de los métodos para determinar la homología entre dos moléculas evolutivamente relacionadas se aplican habitualmente a dos o más ácidos nucleicos o proteínas cualquiera con el fin de medir la similitud de secuencia independientemente de si están evolutivamente relacionadas o no.

76. En general, se entiende que una forma de definir cualquiera de las variantes y derivados conocidas o las que podrían surgir, de los genes y proteínas desvelados en el presente documento, es mediante la definición de las variantes y derivados en términos de homología para secuencias específicas conocidas. Esta identidad de secuencias particulares desvelada en el presente documento también se trata en alguna parte del presente documento. En general, las variantes de los ácidos nucleicos y las proteínas desveladas en el presente documento normalmente tienen al menos, un porcentaje de homología de aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99 con la secuencia indicada o la secuencia natural. Los expertos en la materia entienden fácilmente cómo determinar la homología de dos proteínas o ácidos nucleicos, tales como genes. Por ejemplo, la homología se puede calcular tras alinear las dos secuencias para que la homología esté en su máximo nivel.

77. Otro modo de calcular la homología puede ser mediante algoritmos publicados. La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede llevar a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2:482, 1981, mediante el alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:2444, 1988, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

78. Se pueden obtener los mismos tipos de homología para ácidos nucleicos mediante, por ejemplo, los algoritmos desvelados en Zuker, M. Science 244:48-52, 1989, Jaeger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86:7706-7710, 1989, Jaeger et al. Methods Enzymol. 183:281-306, 1989 para al menos material relacionado con la alineación de ácido nucleico. Se entiende que cualquiera de los métodos normalmente se puede usar y que en determinados casos, los resultados de estos diversos métodos puede diferir, pero si el experto en la materia entiende que si se halla identidad con al menos uno de estos métodos, se diría que las secuencias tienen la identidad indicada y se desvelarían en el presente documento.

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

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

(2) Hibridación/hibridación selectiva

80. El término hibridación normalmente se refiere a una interacción dirigida por secuencias entre al menos dos moléculas de ácido nucleico, tales como un cebador o una sonda y un gen. La interacción dirigida por secuencias se refiere a una interacción que tiene lugar entre dos nucleótidos o análogos de nucleótidos o derivados de nucleótidos de manera específica de nucleótidos. Por ejemplo, G interactuando con C o A interactuando con T son interacciones dirigidas por secuencia. Normalmente estas interacciones dirigidas por secuencia tienen lugar sobre la superficie de Watson-Crick o la superficie de Hoogsteen del nucleótido. La hibridación de los dos ácidos nucleicos está afectada por un número de condiciones y parámetros conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las concentraciones de sal, el pH y la temperatura de la reacción afectan si dos moléculas de ácidos nucleicos hibridan.

81. Los parámetros para la hibridación selectiva entre dos moléculas de ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las condiciones de hibridación selectiva se pueden definir como condiciones rigurosas de hibridación. Por ejemplo, la rigurosidad de la hibridación se controla mediante la temperatura y la concentración de sal de cualquiera o ambas etapas de hibridación y de lavado. Por ejemplo, las condiciones de hibridación para lograr la hibridación selectiva pueden implicar la hibridación en una solución de elevada fuerza iónica (SSC a 6x o SSPE a 6x) a una temperatura que está aproximadamente 12-25 °C por debajo de la T_{fus} (la temperatura de fusión a la cual la mitad de las moléculas se disocian de sus miembros de hibridación) seguida por el lavado a una combinación de temperatura y concentración de sal seleccionada para que la temperatura de lavado esté aproximadamente 5-20 °C por debajo de la T_{fus} . Las condiciones de temperatura y de sal se determinan fácilmente de manera empírica en experimentos preliminares en los que las muestras de ADN de referencia inmovilizadas en filtros hibridan con un ácido nucleico marcado de interés y después se lava en condiciones de diferentes rigurosidades. Las temperaturas de hibridación son normalmente mayores para hibridaciones de ADN-ARN y ARN-ARN. Se pueden usar las condiciones tal como se describen anteriormente para lograr la rigurosidad, o tal como se conoce en la materia. (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989; Kunkel et al. Methods Enzymol. 154:367, 1987 para material al menos relacionado con la hibridación de los ácidos nucleicos). Una condición rigurosa de hibridación preferida para una hibridación de ADN:ADN puede ser a aproximadamente 68 °C (en solución acuosa) en SSC a 6x o SSPE a 6x seguido por lavado a 68 °C. La rigurosidad de la hibridación y de lavado, si se desea, se puede reducir en consecuencia a medida que el grado de complementariedad deseado se reduce, y además, dependiendo de la riqueza de G-C o A-T de cualquier área en la que se busque la variabilidad. De forma análoga, la rigurosidad de la hibridación y el lavado, si se desea, se puede aumentar en consecuencia a medida que la homología deseada aumenta, y además, dependiendo de la riqueza de G-C o A-T de cualquier área en la que se desea una elevada homología, todo tal como se conoce en la materia.

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

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

84. Como con la homología, se entiende que hay una variedad de métodos en el presente documento desvelados para la determinación del nivel de hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico. Se entiende que estos métodos y condiciones pueden proporcionar diferentes porcentajes de hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico, pero salvo que se indique lo contrario, sería suficiente cumplir con los parámetros de cualquiera de los métodos. Por ejemplo, si se requiere una hibridación del 80 % y siempre que tenga lugar la hibridación dentro de los parámetros requeridos en cualquiera de estos métodos se considera desvelado en el presente documento.

85. Se entiende que los expertos en la materia entienden que si una composición o método cumple cualquiera de estos criterios para determinar la hibridación bien de manera colectiva o única es una composición o método que se desvela en el presente documento.

d) Composición de moléculas producidas

86. Se entiende que los eucariotas desvelados en el presente documento son capaces de producir una serie de compuestos y de composiciones. Los compuestos y las composiciones se pueden usar como una característica distintiva, una forma de identificar al organismo. Por ejemplo, una forma de caracterizar un organismo es mediante el perfil lipídico que produce el organismo. Tal como se desvela en el presente documento, estos diversos perfiles lipídicos se pueden usar para caracterizar al organismo, así como para purificarlo, manipularlo y recolectarlo por una variedad de razones.

(1) Lípidos

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

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

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

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

91. Se entiende que la composición del lípido producido por el microorganismo eucariota se puede manipular basándose en las condiciones de crecimiento en las que se encuentra el microorganismo. Cambiando diversos parámetros, tal como se desvela en el presente documento, se pueden manipular las composiciones para producir,

por ejemplo, una mejor producción de DHA o de DPA. Por ejemplo, la manipulación puede no producir más gramos reales, pero la manipulación, puede producir una mejor proporción de DHA o DPA frente a EPA y otros PUFA deseados, que pueden ser deseables desde el punto de vista de la purificación. Las condiciones variables se tratan en el presente documento.

5

92. La Figura 10 muestra una posible vía metabólica para las diversas PUFAS producidas por el microorganismo eucariota desvelado, consistente con el seguimiento del metabolito éster metílico del ácido graso. Las proteínas que se pueden identificar en las vías que se describen en el presente documento son policétido sintasa, usando por ejemplo un estudio de cebador degenerativo, (Metz et al. (2001) *Science* 293:290-3 y Kaulmann y Hertweck (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:1866-9). También elongasas y desaturasas, usando por ejemplo un estudio con sonda de hibridación. También se pueden identificar ácido graso sintasas usando, por ejemplo, un estudio con una sonda de hibridación y/o un cebador degenerativo.

4. Crecimiento y cultivo

15

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

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

20

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

25

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

97. La biomasa celular que proviene del microorganismo eucariota desvelado se puede obtener inoculando un medio adecuado de agua de mar natural o artificial, que contiene de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 100 % de agua de mar. Este microorganismo eucariota es capaz de utilizar diversos componentes nutricionales en este medio. Los ejemplos de fuente de carbono usada en el medio son hidratos de carbono tales como glucosa, fructosa, dextrosa, lactulosa, galactosa, maltotriosa, maltosa, lactosa, glucógeno, gelatina, almidón (de maíz o de trigo) así como derivados de azúcar tales como acetato, m-inositol (derivado de licor de maíz fermentado), ácido galacturónico (derivado de pectina), L-fucosa (derivado de galactosa), gentiobiosa, glucosamina, α -D-glucosa-1-fosfato (derivado de glucosa), celobiosa (derivado de celulosa), dextrina (derivado de maíz) y α -ciclodextrina (derivado del almidón) y polioles tales como maltitol, eritritol, adonitol y ácidos oleicos tales como glicerol y tween 80 y amino azúcares tales como N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil- β -D-manosamina. Aunque, son ejemplos de una fuente de nitrógeno fuentes de nitrógeno naturales tales como peptona, extracto de levadura, extracto de malta y harina de pescado o fuentes de nitrógeno orgánico tales como glutamato de sodio, pero sin limitación a estos. Además, si fuese necesario, como nutrientes traza se pueden usar fosfatos tales como fosfato de potasio y fosfato de sodio, sales inorgánicas tales como sulfato de amonio, bicarbonato de sodio, ortovanadato de sodio, cromato de potasio, molibdato de sodio, ácido selenioso, sulfato de níquel, sulfato de cobre, sulfato de cinc, cloruro de cobalto, cloruro de hierro, cloruro de manganeso y cloruro de calcio, junto con el compuesto quelante, ácido etilendiaminotetraacético, solo o en conjunto con vitaminas tales como clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, pantotenato de calcio, ácido p-aminobenzoico, riboflavina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico y vitamina B12. Después de preparar el medio, se ajusta el pH a entre 3,0 y 10,0 usando ácido o base para el ajuste cuando sea apropiado, por ejemplo, a pH entre 4,0 y 6,5, y el medio se esteriliza mediante tratamiento con autoclave, por ejemplo. El cultivo se puede llevar a cabo durante 1 a 30 días, 1 a 21 días, 1 a 15 días, 1 a 12 días, 1 a 9 días o preferentemente 3 a 5 días a temperaturas de entre 4 a 30 °C, preferentemente de 18 a 28 °C, mediante cultivo de aireación-agitación, cultivo de agitación, cultivo estacionario, cultivo por lotes, cultivo continuo, cultivo de lote rodante, o cultivo por ondas o similares.

30

35

40

45

50

98. Las siguientes condiciones son un ejemplo de condiciones que pueden permitir la producción de un conjunto de lípidos en rendimientos que permiten su uso como producto. La investigación de las condiciones de cultivo para ONC-T18 revelaron que el microorganismo eucariota desvelado en el presente documento crece bien en agua de mar natural o artificial o en un medio que contiene una concentración de hasta el 5 % de agua de mar natural o artificial. Las fuentes de carbono y de nitrógeno añadidas al medio pueden ser las usadas de manera convencional tal como se describe anteriormente. La fuente de nitrógeno de naturaleza natural u orgánica es relativamente igual y la concentración total de nitrógeno en el medio se mantiene constante. Estas concentraciones se añaden al medio a concentraciones estándar. Si se cumplen estas condiciones, se produce poca influencia sobre el contenido de lípido, las proporciones o la cantidad de DHA, DPA y EPA acumulada, tal como se desvela en el presente documento.

55

60

99. Para la fermentación de ONC-T18 de alta concentración, es posible usar varios métodos para aumentar tanto la tasa de producción de biomasa celular como la de lípidos. Estos incluyen, aumentar la concentración de carbono y de

65

5 nitrógeno en el medio (a una proporción de entre 6:1 y 15:1, preferentemente entre 6:1 y 13:1 y a temperaturas de entre 4 a 30 °C, preferentemente de 18 a 28 °C) desde el intervalo de 5 g l⁻¹ a 60 g l⁻¹ hasta el intervalo de 100 g l⁻¹ y 160 g l⁻¹ y desde el intervalo de 4 g l⁻¹ a 10 g l⁻¹ hasta el intervalo de 40 g l⁻¹ a 60 g l⁻¹, respectivamente. Usando este método, la proporción de biomasa y de lípido producida también aumenta a tasas comparables. Además, es posible
 10 aumentar la producción de lípidos mediante el uso de fuentes de carbono elevadas desde el intervalo de 5 g l⁻¹ a 60 g l⁻¹ hasta el intervalo de 100 g l⁻¹ y 160 g l⁻¹, mientras que la fuente de nitrógeno permanece constante. Además, es posible aumentar la producción de biomasa mientras que se mantiene el contenido en lípidos, mediante el uso de cantidades elevadas de fuentes de nitrógeno desde el intervalo de 10 g l⁻¹ a 60 g l⁻¹ mientras que la fuente de carbono permanece constante. Además, la experimentación ha determinado que la producción de biomasa y de lípidos
 15 aumenta considerablemente con la elevada agitación desde el intervalo de 100 y 1000 rpm, mejor a entre 350 y 600 rpm y óptima a entre 350 y 450 rpm, con solo una reducción marginal en el contenido de lípidos y sin descenso en los perfiles de ácidos grasos, con agitación particularmente relevante en las etapas tempranas de la fermentación heterotrófica. La experimentación también ha determinado que la producción óptima de lípidos se logra cuando el contenido en oxígeno disuelto del medio de cultivo está entre el 1 y el 10 %, óptimamente al 5 %. Finalmente, la adición
 20 aumenta la producción de DHA, EPA y DPA con respecto a otros ácidos grasos sin reducir los valores de lípidos totales.

100. Realizando la fermentación heterotrófica tal como se describe anteriormente, es posible producir de manera
 20 consistente la biomasa celular que produce un lípido que contiene la serie (n-3) de DHA en un cultivo de alta concentración de no menos de 5 g y más preferentemente no menos de 20 g/l de medio. Además, la experimentación ha demostrado que la mayoría de estos lípidos se acumulan durante las etapas exponencial tardía/transición del cultivo, después de que se hayan alcanzado niveles máximos de biomasa. Todavía, durante el proceso de fermentación, el contenido de lípidos normalmente no cae por debajo del 25 % de la biomasa total, aumentando
 25 normalmente a alrededor del 80 %. El cultivo en las condiciones anteriores se puede llevar a cabo usando un fermentador con agitación convencional. También es posible usar un fermentador de columna de burbujas (cultivos por lotes o continuo) o un fermentador por ondas.

101. La recolección de biomasa celular antes del procesamiento para la separación de lípidos se puede realizar usando
 30 diversos métodos convencionales tales como centrifugación (tal como centrifugas de eyección de sólidos) o filtración tal como filtración de flujo cruzado) y también pueden incluir el uso de un agente de precipitación para la recolección acelerada de biomasa celular (tal como fosfato de sodio, cloruro de calcio o poliacrilamida).

5. Aislamiento del lípido

35 102. La Figura 7 muestra los perfiles de lípidos y de DHA en función de una variedad de parámetros. Todos estos datos se pueden usar para extraer características específicas sobre el microorganismo eucariota ONC-T18. La Figura 13 muestra un perfil general de ácidos grasos para el eucariota desvelado.

40 103. La grasa que contiene la serie (n-3) de DHA y la serie (n-6) de DPA se puede obtener mediante rotura o alteración de la biomasa recolectada, por ejemplo, mediante molienda, ultrasonidos y después llevando a cabo la extracción con un disolvente tal como cloroformo, hexano, metanol, etanol o mediante medios de extracción con fluidos supercríticos. El contenido de la grasa resultante que contiene la serie (n-3) de DHA y la serie (n-6) de DPA por grano de biomasa celular seca es preferentemente mayor de 0,25 g y más preferentemente mayor de 0,6 g.

45 104. Los microorganismos eucariotas desvelados tales como ONC-T18; son capaces de producir lípidos obtenidos de este modo, cualquiera de sus variantes y cualquiera de las asociaciones entre los miembros de la misma especie de microorganismos eucariotas mediante las cuales el perfil lipídico es tal como sigue. El porcentaje de lípidos neutros puede ser al menos del 95 % en peso de lípidos totales. Una composición típica de ácidos grasos para el
 50 microorganismo eucariota, tal como ONC-T18, en los lípidos neutros es tal como sigue: 15 % de ácido mirístico, 8 % de ácido pentadecanoico, 35 % de ácido palmítico, 7 % de ácido palmitoleico, 1 % de ácido esteárico, 2 % de ácido oleico, 1 % de ácido eicosapentaenoico, 6 % de ácido decosapentaenoico y 25 % de ácido docosahexaenoico (espectro de GC mostrado en la Figura 1).

55 105. Los microorganismos eucariotas desvelados, tal como ONC-T18, son capaces de producir lípidos obtenidos de este modo, cualquiera de sus variantes y cualquiera de las asociaciones entre los miembros de la misma especie de microorganismos eucariotas mediante las cuales el perfil lipídico es tal como sigue. El porcentaje de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos en la fracción lipídica neutra de ONC-T18 es del 0 % a aproximadamente el 2 %, del 0 a aproximadamente el 2 % y del 96 a aproximadamente el 100 %, respectivamente. Al mismo tiempo, la fracción de
 60 lípidos polares comprende entre el 5 % y aproximadamente el 10 % de la fracción lipídica, comprende fosfatidilcolina, fosfatidilserina y ácido fosfatídico tanto unidos como no unidos a lípidos neutros.

106. Se entiende que estos lípidos se pueden hallar en cualquier combinación o permutación dentro del organismo. También se entiende que las concentraciones de estos lípidos se pueden manipular cambiando las condiciones de
 65 crecimiento y las condiciones de los medios ta como se trata en el presente documento.

(1) Lípidos como concentración

107. El microorganismo eucariota puede producir una fracción lipídica que comprende DHA, EPA n-3 y DPA n-6 mayor o igual a aproximadamente 4,0 g l⁻¹ de medio. El microorganismo eucariota puede producir una composición lipídica que comprende DHA, EPA n-3 y DPA n-6 mayor o igual a aproximadamente 20,0 g l⁻¹ de medio. El microorganismo eucariota puede producir una composición lipídica que comprende DHA, EPA n-3 y DPA n-6 mayor o igual a aproximadamente 14,0 g l⁻¹ de medio. El microorganismo eucariota puede producir de aproximadamente 1,5 g l⁻¹ a aproximadamente 5,0 g l⁻¹ (por ejemplo, aproximadamente 4,6 g l⁻¹) del DHA n-3, de aproximadamente 0,5 g l⁻¹ a aproximadamente 1,5 g l⁻¹ (por ejemplo, aproximadamente 0,22 g l⁻¹) de EPA n-3 y de aproximadamente 0,5 g l⁻¹ a aproximadamente 1,5 g l⁻¹ de DPA n-6. Además, el microorganismo eucariota puede producir una fracción lipídica que comprende los ácidos mirístico, miristoleico, pentadecanoico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, eicosadienoico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexanoico y docosapentaenoico entre 301,2 y 360,3 mg g⁻¹ o incluso hasta 790 mg g⁻¹ de biomasa celular. El microorganismo eucariota también puede producir una fracción que comprende entre 44,3 y 57 mg g⁻¹ de ácido mirístico (igual a 1134,5 a 1458,1 mg l⁻¹), 0,5 a 0,65 de ácido miristoleico (igual a 13,3 a 16,63 mg l⁻¹), 33,5 a 34,6 mg g⁻¹ de ácido pentadecanoico (igual a 856,9 a 885,1 mg l⁻¹), 121,9 y 165,1 mg g⁻¹ de ácido palmítico (igual a 3118,2 a 4223,3 mg l⁻¹), 7,9 a 28,5-mg g⁻¹ de ácido palmitoleico (igual a 202,1 a 729 mg l⁻¹), 4,38 a 5,9 mg g⁻¹ de ácido esteárico (igual a 112 a 151 mg l⁻¹), 6,94 a 9,9 mg g⁻¹ de ácido oleico (igual a 177,5 a 253,2 mg l⁻¹), 0,4 a 1,3 mg g⁻¹ de ácido linoleico (igual a 11,26 a 33,3 mg l⁻¹), 0,5 a 1,0 mg g⁻¹ de ácido eicosadienoico (igual a 12,8 a 25,6 mg l⁻¹), 0,4 a 0,5 mg g⁻¹ de ácido araquidónico (igual a 10,2 a 13 mg l⁻¹), 75 a 100 mg g⁻¹ de ácido docosahexanoico (igual a 1918 a 2560 mg l⁻¹), 1,9 a 6 mg g⁻¹ de ácido eicosapentaenoico (igual a 48,6 a 153,5 mg l⁻¹) y 17,1 a 33,7 mg g⁻¹ de ácido docosapentaenoico (igual a 437,4 a 862,1 mg l⁻¹), que tiene un contenido total en ácidos grasos dentro de la biomasa celular de entre 301 a 790 mg g (igual a 7700 a 20,209 mg l⁻¹).

(2) Otras moléculas

108. El microorganismo eucariota puede producir adicionalmente carotenoides y xantofilas. Los ejemplos de tales carotenoides y xantofilas incluyen beta-caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, fenicoxantina, zeaxantina, equinenona, beta-criptoxantina, capsantina, luteína, annatto, beta-apo-8-carotenal y éster de beta-apo-8-carotenal.

109. Las xantofilas producidas por los microorganismos eucariotas desvelados se pueden conjugar con los diversos PUFA también producidos por los microorganismos eucariotas desvelados.

(a) Antioxidantes

110. En general, los antioxidantes son compuestos que reaccionan con y que normalmente se consumen por el oxígeno. Dado que los antioxidantes normalmente reaccionan con oxígeno, los antioxidantes normalmente también reaccionan con los generadores de radicales libres y los radicales libres. ("The Antioxidants - The Nutrients that Guard Your Body" por Richard A. Passwater, Ph. D., 1985, Keats Publishing Inc.). Las composiciones pueden contener cualquier antioxidante, y un listado no limitante incluiría pero no se limitaría a, antioxidantes no flavonoides y nutrientes que pueden eliminar directamente los radicales libres incluyendo multicarotenos, beta-carotenos, alfa-carotenos, gamma-carotenos, licopeno, luteína y zeaxantinas, selenio, Vitamina E, incluyendo alfa-, beta- y gamma- (tocoferol, en particular alfa-tocoferol, etc., succinato de vitamina E y trolox (un análogo soluble de vitamina E), Vitamina C (ácido ascórbico) y Niacina (Vitamina B₃, ácido nicotínico y nicotinamida), Vitamina A, ácido 13-cis retinoico, N-acetil-L-cisteína (NAC), ascorbato sódico, pirrolidín-edtio-carbamato y coenzima Q₁₀; enzimas que catalizan la destrucción de radicales libres incluyendo peroxidasas tales como glutathion peroxidasa (GSHPX) que actúa sobre H₂O₂ y tales como peróxidos orgánicos, incluyendo catalasa (CAT) que actúa sobre H₂O₂, superóxido dismutasa (SOD) que desproporciona O₂H₂O₂, glutathion transferasa (GSHTx), glutathion reductasa (GR), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), y miméticos, análogos y polímeros de los mismos (análogos y polímeros de enzimas antioxidantes tales como SOD, tal como se describe en, por ejemplo, la patente de EE.UU. de N.º de serie 5.171.68); glutathion; ceruloplasmina; cisteína y cisteamina (beta-mercaptoetilamina) y flavonoides y moléculas de tipo flavonoide como ácido fólico y folato. Una revisión de las enzimas antioxidantes y miméticos de la misma y nutrientes antioxidantes se puede encontrar en Kumar et al., Pharmac. Ther. 39: 301, 1988 y Machlin L. J. y Bendich, FASEB Journal 1:441-445, 1987.

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

112. Los carotenoides son pigmentos naturales importantes producidos por muchos microorganismos y plantas, normalmente de color rojo, naranja o amarillo. De manera tradicional, los carotenoides se han usado en industrias de piensos, de alimentos y de nutraceuticos. Se sabe que son esenciales para el crecimiento y la fotosíntesis de las plantas y que son la principal fuente dietética de vitamina A en los seres humanos. Los antioxidantes dietéticos, tales

como carotenoides (beta-caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, zeaxantina, capsantina, luteína, annatto, beta-apo-8-carotenal y éster de beta-apo-8-carotenal), presentan actividades antineoplásicas significativas y desempeñan un papel importante en la prevención de enfermedades crónicas. Los carotenoides son potentes antioxidantes biológicos que pueden absorber la energía de excitación del oxígeno de singlete en la cadena del carotenoide, lo que
5 lleva a la degradación de la molécula de carotenoide pero evita que se dañen otras moléculas o tejidos.

113. El oxígeno se requiere para las funciones metabólicas, pero también presenta desafíos a las células. El organismo humano tiene una amplia variedad de enzimas metabólicas y antioxidantes para liberar a sus células de las moléculas derivadas del oxígeno. Se supone que este estrés oxidativo es un factor que contribuye a afecciones tales como artritis
10 reumatoide, cardiopatía isquémica e ictus, demencia asociada con la enfermedad de Alzheimer, cáncer y al envejecimiento. Por lo tanto, los antioxidantes tienen la capacidad de proteger frente a un amplio espectro de enfermedades. Se han aislado varios compuestos antioxidantes de fuentes microbianas marinas; estos incluyen astaxantina, beta-caroteno y otros carotenoides.

15 114. Los carotenoides son un grupo de pigmentos de origen natural ampliamente distribuido, con más de 700 pigmentos naturales solubles en lípidos producidos principalmente por especies microalgales, macroalgales, bacterianas y fúngicas, siendo la astaxantina y sus derivados de particular interés comercial. La astaxantina es un protector antioxidante extremadamente eficaz. Todavía, a diferencia del beta-caroteno, la astaxantina cruza fácilmente la barrera hematoencefálica/barrera hematorretiniana y, por lo tanto, también tiene la capacidad para proteger frente
20 a enfermedades cerebrales y de los ojos. Los estudios preclínicos sugieren diversos efectos beneficiosos del consumo de astaxantina tales como: (i) inhibe la formación y el crecimiento de cáncer en la vejiga, de colon, hígado, las mamas y la cavidad oral; (ii) protege a la retina del ojo del daño oxidativo y, por lo tanto, tiene un efecto frente a la degeneración macular asociada a la edad; (iii) promueve una elevada actividad inmunitaria, (iv) proporciona protección frente a daño por luz ultravioleta, (v) proporciona un elevado endurecimiento de los músculos.

25

b) Aislamiento de los microorganismos

115. Se desvelan microorganismos de la familia Thraustochytriaceae obtenidos mediante un método que comprende
30 cebar una muestra vegetal en agua salada (natural del mar o artificial) con granos de polen e incubar; separar y transferir los granos a un medio heterotrófico e incubar; identificar un aislado que produce ácidos grasos, aislar del aislado identificado el microorganismo de la familia Thraustochytriaceae. Las formas de aislamiento adicionales incluyen medios suplementados con antibióticos apropiados y la identificación a través de cualquiera de los medios microscópicos tal como se menciona anteriormente o mediante el uso de cebadores o sondas del gen de ARNr 18S. El medio heterotrófico puede ser tal como se describe a continuación.

35

6. Lípidos y otras moléculas producidas por el microorganismo eucariota

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

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

50

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

119. La composición lipídica puede comprender adicionalmente carotenoides. Los ejemplos de tales carotenoides
55 incluyen beta-caroteno, licopeno, astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenona, fenicoxantina, capsantina, luteína, annatto, beta-apo-8-carotenal y éster de beta-apo-8-carotenal.

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

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

121. Un alimento, suplemento o composición farmacéutica para uso tanto humano como para animales (incluyendo
65 los marinos) puede comprender la composición (lípidos, lípidos con antioxidante y antioxidante solo).

122. También se desvela una fórmula para lactantes que comprende la composición (lípidos, lípidos con antioxidante y antioxidante solo).

C. Métodos

5

1. Procedimientos para preparar los lípidos

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

10

124. Se pueden emplear una variedad de procedimientos en la recuperación de la biomasa celular resultante de la fermentación en diversos medios de cultivo, tales como mediante filtración y centrifugación. Las células después se pueden lavar, congelar, liofilizar o secar por pulverización y almacenar en una atmósfera no oxidante para eliminar la presencia de oxígeno, antes de la incorporación a un producto alimenticio o de pienso procesado.

15

125. Los lípidos celulares que contienen los PUFA de DHA, EPA (n-3) y DPA (n-6) también se pueden extraer de métodos de biomasa celular tales como extracción con fluidos supercríticos o mediante extracción con disolventes tales como cloroformo, hexano, cloruro de metileno o metanol, y el extracto resultante se puede evaporar bajo presión negativa para producir una muestra de material lipídico concentrado. Los PUFA de omega-3 y de omega-6 se pueden concentrar adicionalmente mediante hidrólisis de los lípidos y concentración de la fracción altamente insaturada empleando métodos tradicionales tales como la aducción de urea o la destilación fraccionada, la cromatografía en columna o mediante el fraccionamiento por fluido supercrítico. Las células también se pueden romper o lisar y se pueden extraer los lípidos en aceites vegetales o animales (por ejemplo, aceites de pescado). Los aceites extraídos se pueden refinar mediante procesos habituales bien conocidos empleados para refinar aceites vegetales (por ejemplo, mediante refinamiento químico o físico). Estos procesos de refinamiento eliminan las impurezas de los aceites extraídos antes de que se usen o se comercialicen como aceites comestibles. Tras el refinamiento, los aceites se pueden usar directamente como aditivo de piensos o de alimentos para producir productos enriquecidos en omega-3 y/u omega-6. Como alternativa, el aceite se puede procesar y purificar adicionalmente tal y como se describe a continuación y después usarlo en las aplicaciones anteriores y también en aplicaciones farmacéuticas.

20

25

30

126. En otro proceso para la producción de aceites enriquecidos (concentrados) en omega-3 u omega-6, la biomasa celular recolectada (fresca o seca) se puede romper o permeabilizar mediante técnicas bien conocidas tales como ultrasonidos, métodos de rotura con líquido cortante, molienda con perlas, presión bajo alta presión, congelación-descongelación o digestión enzimática de la pared celular. Los lípidos de las células rotas se extraen mediante el uso de un disolvente o una mezcla de disolventes tales como hexano, cloroformo, éter o metanol. El disolvente se elimina y los lípidos se hidrolizan mediante el uso de cualquiera de los métodos bien conocidos para convertir triglicéridos a ácidos grasos libres o ésteres de ácidos grasos que incluyen la hidrólisis básica, ácida o enzimática. Después de que se complete la hidrólisis, se extraen los compuestos no saponificables en un disolvente tal como éter, hexano o cloroformo y se eliminan. Después se acidifica la solución restante mediante la adición de un ácido, y los ácidos grasos libres se extraen en un disolvente tal como hexano, éter o cloroformo. Después, la solución del disolvente que contiene los ácidos grasos libres se puede enfriar hasta una temperatura lo suficientemente baja como para cristalizar los compuestos no de PUFA, que después se pueden eliminar mediante filtración, centrifugación o decantación. Lo que da como resultado la concentración de los compuestos de PUFA restantes y se usan como suplemento nutritivo para seres humanos, como aditivo alimenticio o como aplicaciones farmacéuticas.

35

40

45

127. Asimismo, se desvela una composición de lípidos reparada mediante el método desvelado anteriormente.

128. Los microorganismos de la familia Thraustochytriaceae pueden ser cualquiera de los microorganismos desvelados anteriormente.

50

a) Medio

129. El medio heterotrófico puede comprender sal del mar (artificial o natural), una o más fuentes de carbono y una o más fuentes de nitrógeno. La sal del mar puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 40,0 g l⁻¹. La concentración de la fuente de carbono y de nitrógeno usada en condiciones de cultivo estándar (no para una alta concentración, sino para una fermentación rentable) está en el intervalo de 5 g l⁻¹ a 0 g l⁻¹ y 4 g l⁻¹ a 10 g l⁻¹, respectivamente. Para la fermentación de alta concentración, la concentración de la fuente de carbono y de nitrógeno usada en condiciones de cultivo estándar está en el intervalo de 100 g l⁻¹ y 160 g l⁻¹ y 40 g l⁻¹ a 60 g l⁻¹, respectivamente. La tendencia es que para la acumulación de aceite, el microorganismo eucariota crece en un medio de cultivo (como los descritos anteriormente) en el que el suministro de nitrógeno es limitado después de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas, mientras que el suministro de carbono permanece en abundancia. Este microorganismo eucariota continúa asimilando el carbono (en la forma de azúcares sencillos) pero no puede someterse a la división celular debido a la ausencia de nitrógeno para la generación de proteínas y ácidos nucleicos relevantes. Siendo el resultado que estos azúcares se convierten en aceites de almacenamiento, muchos de la misma

60

65

forma que describe Ratledge C. (Lipid Tech. 16:34-39, 2004) y la figura 9 representa este fenómeno específico para este organismo.

130. La fuente de nitrógeno puede ser uno o más de peptona, extracto de levadura, extracto de malta y glutamato de sodio. La fuente de nitrógeno también puede ser licor de maíz fermentado o extracto de semilla de algodón. La fuente de nitrógeno puede comprender extracto de levadura y/o peptona o glutamato monosódico. Por ejemplo, la fuente de nitrógeno puede incluir, pero sin limitación, YE-MSG de EMD™, YE de EMD™, Peptona-MSG de EMD™, YE-MSG de Sigma™, YE de Sigma™, YE-MSG de Fermtech™, YE de Fermtech™ o harina de pescado (62 % de proteína). El extracto de levadura puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 2 g l⁻¹. El glutamato monosódico puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 8 g l⁻¹.

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

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

133. El medio puede comprender adicionalmente fosfatos (por ejemplo, fosfato de potasio y fosfatos de sodio). El medio puede comprender adicionalmente sales inorgánicas (por ejemplo, sulfato de amonio, bicarbonato de sodio, ortovanadato de sodio, cromato de potasio, molibdato de sodio, ácido selenioso, sulfato de níquel, sulfato de cobre, sulfato de cinc, cloruro de cobalto, cloruro de hierro, cloruro de manganeso). El medio puede comprender adicionalmente un compuesto quelante (por ejemplo, EDTA). El medio puede comprender adicionalmente vitaminas (por ejemplo, clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, pantotenato de calcio, ácido p-aminobenzoico, riboflavina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico y vitamina B₁₂). El medio puede estar a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,5.

134. La incubación puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 9 días (por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 días). La incubación puede ser de aproximadamente 18 a aproximadamente 30 °C (por ejemplo, de aproximadamente 18-25 °C). La incubación puede comprender adicionalmente la agitación o la aireación.

135. El aislamiento del lípido puede comprender poner en contacto los microorganismos con un disolvente de extracción. El disolvente puede comprender uno o más disolventes seleccionados de cloroformo, hexano, metanol o etanol o CO₂ superficial.

136. El método puede producir cualquiera de las composiciones tal como se desvela anteriormente.

137. El microorganismo eucariota puede producir una composición de lípidos que comprende DHA n-3 a mayor o igual a aproximadamente 20 g l⁻¹ del medio. El microorganismo eucariota puede producir una composición de lípidos que comprende DHA n-3 a mayor o igual a aproximadamente 40 g l⁻¹ del medio. El microorganismo eucariota puede producir una composición de lípidos que comprende DHA n-3 a mayor o igual a aproximadamente 80 g l⁻¹ del medio.

2. Métodos de cribado e identificación

138. El microorganismo eucariota tal como se desvela en el presente documento puede producir un lípido que contiene la serie (n-3) de ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico y la serie (n-6) de DPA. Este microorganismo eucariota se puede seleccionar, por ejemplo, con el siguiente método de cribado. Las muestras vegetales se pueden colocar (y se colocaron) en frascos de 20 ml que contienen 10 ml de agua de mar natural estéril filtrada a 0,2 μ m que contiene penicilina y estreptomycin a 300 y 500 mg·l⁻¹, respectivamente. Los frascos se cebaron después con granos de polen estériles y se incubaron durante 48 horas de 18 a 25 °C. Después se transfirieron los granos de polen a placas de agar que contienen antibióticos (como los anteriores) y se incubaron en las mismas condiciones. Las colonias simples, irregulares, hialinas hechas de células esféricas o limaciformes y atípicas de colonias de levadura o bacterianas se seleccionaron y se subcultivaron en el mismo medio y en las mismas condiciones que antes. Después se cribaron estos aislados para el crecimiento y los ácidos grasos usando un medio líquido de nutrientes, preparado con agua de mar natural filtrada a 0,2 μ m que contiene 5 g l⁻¹ de glucosa, 2 g l⁻¹ de peptona y 2 g l⁻¹ de extracto de

levadura, con la biomasa celular resultante recolectada mediante centrifugación o sedimentación en un medio líquido. Los ácidos grasos se transesterificaron directamente usando métodos convencionales, con la composición de éster metílico del ácido graso analizada a través de cromatografía de gases, con cepas que producen cantidades apropiadas de la serie n-3 de DHA y la serie n-6 de DPA seleccionadas para el trabajo posterior.

5 139. Se desvelan métodos de identificación de un microorganismo eucariota, comprendiendo el método: cebar una muestra vegetal en agua salada (natural del mar o artificial) con granos de polen e incubar; transferir los granos a un medio heterotrófico e incubar; e identificar aislados que producen ácidos grasos.

10 140. También se desvelan composiciones de lípidos producidas por los microorganismos eucariotas identificados anteriormente.

141. También se desvelan composiciones de lípidos producidas mediante los métodos que usan los microorganismos eucariotas y los métodos desvelados en el presente documento.

15 142. También se desvelan microorganismos eucariotas (ONC-T18) que tienen el número de registro de la American Type Culture Collection PTA-6245.

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

144. También se desvela un microorganismo eucariota, *Thraustochytrium* sp. capaz de producir DGA y DPA en concentraciones en exceso de 400 mg l⁻¹ y 100 mg l⁻¹, respectivamente.

25 145. También se desvela un microorganismo eucariota, *Thraustochytrium* sp. capaz de producir carotenoides a través de la fermentación heterotrófica tal como se menciona anteriormente en el intervalo de 50 a 1250 mg kg⁻¹ y astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenina y beta-caroteno en el intervalo de 1 a 20 mg kg⁻¹, 0,25 a 10 mg kg⁻¹, 1 a 20 mg kg⁻¹ 1 a 20 mg kg⁻¹ y 1 a 200 mg kg⁻¹, respectivamente.

30 146. También se desvelan procesos para cultivar un microorganismo eucariota que comprenden, cultivar el microorganismo eucariota en condiciones, en las que las condiciones comprenden un medio que comprende cloruro de sodio en la forma de sal de mar artificial (marina trófica) entre 2,0 y 15,0 g l⁻¹; una fuente de nitrógeno en la forma de extracto de levadura y glutamato monosódico a 2,0 y 8,0 g l⁻¹, respectivamente; y carbono en la forma de glucosa hasta 130 g l⁻¹.

35 147. Los procesos cultivados pueden, por ejemplo, cultivar ONC-T18, mediante lo cual, al menos el 24 % del peso es DHA, al menos el 6 % en peso es DPA y al menos el 1 % es EPA de los ácidos grasos totales.

148. Los procesos desvelados para el crecimiento también pueden, por ejemplo, cultivar ONC-T18 de manera que al menos el 1 % en peso es material carotenoide, con del 1 al 2 % y al menos el 1,2 % de este siendo astaxantina, con del 0,25 al 1 % y al menos el 0,45 % siendo zeaxantina, con del 5 al 16 % y al menos el 9 % siendo cantaxantina, con del 1 al 2 % y al menos el 1,2 % de este siendo equinenona y del 12 al 16 % y al menos el 14 % en peso siendo beta-caroteno.

45 3. Ácidos nucleicos

149. Hay una variedad de moléculas desveladas en el presente documento que se basan en el ácido nucleico, incluyendo, por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, ARNr, así como cualquier otra proteína desvelada en el presente documento, así como diversos ácidos nucleicos funcionales. Los ácidos nucleicos desvelados están hechos de, por ejemplo, nucleótidos, análogos de nucleótidos o sustitutos de nucleótidos. Los ejemplos de estas y otras moléculas se tratan en el presente documento. Se entiende que, por ejemplo, cuando se expresa un vector en una célula, el ARNm expresado típicamente estará hecho de A, C, G y U/T. De forma análoga, se entiende que si, por ejemplo, se introduce una molécula antisentido en una célula o ambiente celular a través de, por ejemplo, la administración exógena, es ventajoso que la molécula antisentido esté hecha de análogos de nucleótidos que reducen la degradación de la molécula antisentido en el ambiente celular.

a) Nucleótidos y moléculas relacionadas

150. Un nucleótido es una molécula que contiene un resto de base, un resto de azúcar y un resto de fosfato. Los nucleótidos pueden estar unidos juntos a través de sus restos de fosfato y de sus restos de azúcar creando un enlace internucleósido. El resto de base de un nucleótido puede ser adenin-9-il (A), citosin-1-il (C), guanin-9-il (G), uracil-1-il (U) y timin-1-il (T). El resto de azúcar de un nucleótido es una ribosa o una desoxirribosa. El resto de fosfato de un nucleótido es un fosfato pentavalente. Un ejemplo no limitante de un nucleótido sería 3'-AMP (3'-adenosina monofosfato) o 5'-GMP (5'-guanosina monofosfato).

65

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

5

152. Los sustitutos de nucleótidos son moléculas que tienen propiedades funcionales similares a los nucleótidos, pero que no contienen un resto de fosfato, tal como un ácido peptidonucleico (PNA). Los sustitutos de nucleótidos son moléculas que reconocerán ácidos nucleicos de la forma de Watson-Crick o Hoogsteen, pero que están unidos juntos a través de un resto que no es el resto de fosfato. Los sustitutos de nucleótidos son capaces de conformar una estructura de tipo doble hélice cuando interactúan con el ácido nucleico diana apropiado.

10

153. También es posible unir otros tipos de moléculas (conjugados) a los nucleótidos o a los análogos de nucleótidos para mejorar, por ejemplo, la absorción celular. Los conjugados pueden estar unidos químicamente a los nucleótidos o análogos de nucleótidos. Tales conjugados incluyen, pero sin limitación, restos de lípidos tales como un resto de colesterol. (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 86:6553-6556, 1989).

15

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

20

155. Una interacción de Hoogsteen es la interacción que tiene lugar sobre la superficie de Hoogsteen de un nucleótido o análogo de nucleótido, que está expuesto en el surco principal del ADN dúplex. La superficie de Hoogsteen incluye la posición N7 y los grupos reactivos (NH₂ u O) en la posición C6 de los nucleótidos de purina.

25

b) Secuencias

156. Hay una variedad de secuencias relacionadas con, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1, así como cualquier otro ácido nucleico y proteínas desvelados en el presente documento que se pueden desvelar en Genbank, y estas secuencias y otras.

30

157. En el presente documento se proporcionan una variedad de secuencias, y éstas y otras se pueden encontrar en Genbank, en www.pubmed.gov. Los expertos en la materia entienden cómo solucionar las discrepancias y diferencias en las secuencias y ajustar las composiciones y los métodos que se refieren a una secuencia particular a otras secuencias relacionadas. Se pueden diseñar cebadores y/o sondas para cualquier secuencia, dada la información desvelada en el presente documento y conocida en la materia.

35

c) Cebadores y sondas

40

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

50

55

60

d) Administración de ácido nucleico

159. En los métodos descritos anteriormente que incluyen la administración y absorción de ADN exógeno en las células de un sujeto (es decir, transducción o transfección génica), los ácidos nucleicos desvelados pueden estar en la forma de ADN o ARN desnudo, o los ácidos nucleicos pueden estar en un vector para administrar los ácidos nucleicos a las

65

células, mediante lo cual, el fragmento de ADN que codifica el anticuerpo está bajo la regulación transcripcional de un promotor, tal como entendería bien un experto en la materia. El vector puede ser una preparación comercialmente disponible, tal como un vector de adenovirus (Quantum Biotechnologies, Inc. (Laval, Quebec, Canadá). La administración del ácido nucleico o del vector a las células puede ser a través de una variedad de mecanismos. Como ejemplo, la administración puede ser a través de un liposoma, usando preparaciones de liposomas comercialmente disponibles tales como LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), así como otros liposomas desarrollados de acuerdo con los procedimientos estándar en la materia. Además, el ácido nucleico o el vector desvelado se puede administrar *in vivo* mediante electroporación, cuya tecnología está disponible de Genetronics, Inc. (San Diego, CA) así como por medio de una máquina SONOPORATION (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, AZ).

160. Como ejemplo, la administración del vector puede ser a través de un sistema vírico, tal como un sistema de vector de retrovirus que puede empaquetar un genoma recombinante de retrovirus (véase, por ejemplo, Pastan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:4486, 1988; Miller et al., Mol. Cell. Biol. 6:2895, 1986). El retrovirus recombinante se puede usar después para infectar y, de este modo, administrar a las células infectadas el ácido nucleico que codifica un anticuerpo ampliamente neutralizante (o un fragmento activo del mismo). El método exacto de introducir el ácido nucleico alterado en células de mamífero, por supuesto, no se limita al uso de vectores de retrovirus. Hay otras técnicas ampliamente disponibles para este procedimiento, incluyendo el uso de vectores de adenovirus (Mitani et al., Hum. Gene Ther. 5:941-948, 1994), vectores de virus adenoasociados (AAV) (Goodman et al., Blood 84:1492-1500, 1994), vectores de lentivirus (Naidini et al., Science 272:263-267, 1996), vectores de retrovirus pseudotipados (Agrawal et al., Exper. Hematol. 24:738-747, 1996). También se pueden usar técnicas físicas de transducción, tales como la administración del liposoma y mediada por receptor y otros mecanismos de endocitosis (véase, por ejemplo, Schwartzenberger et al., Blood 87:472-478, 1996). Estas composiciones y métodos desvelados se pueden usar en conjunto con cualquiera de estos u otros métodos de transferencia génica comúnmente usados.

4. Sistemas de expresión

161. Los ácidos nucleicos que se administran a las células normalmente contienen sistemas de control de la expresión. Por ejemplo, los genes insertados en sistemas víricos y retrovíricos normalmente contienen promotores y/o potenciadores para ayudar a controlar la expresión del producto génico deseado. Un promotor generalmente es una secuencia o secuencias de ADN que funcionan cuando se encuentran en una localización relativamente fija con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Un promotor contiene elementos centrales requeridos para la interacción básica de la ARN polimerasa y los factores de transcripción, y puede contener elementos y elementos de respuesta aguas arriba.

162. Se entiende que hay una variedad de sistemas de control de la transcripción que se pueden usar en los organismos desvelados en el presente documento, además de los sistemas generales tratados a continuación. Se entiende que a los organismos desvelados en el presente documento se les puede transferir y transformar con una variedad de genes, tales como marcadores génicos, tal como se trata en el presente documento, o genes que tienen otros atributos deseables, tales como características de crecimiento mejoradas o únicas.

a) Promotores y potenciadores víricos

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

164. El potenciador generalmente se refiere a una secuencia de ADN que funciona como una distancia no fijada del sitio de comienzo de la transcripción y puede ser bien 5' (Laimins, L. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 78:993, 1981) o 3' (Lusky, M.L., et al., Mol. Cell Bio. 3:1108, 1983) para la unidad de transcripción. Además, los potenciadores pueden estar dentro de un intrón (Banerji, J.L. et al., Cell 33:729, 1983) así como dentro de la propia secuencia codificante (Osborne, T.F., et al., Mol. Cell Bio. 4:1293, 1984). Normalmente hay entre 10 y 300 en longitud y funcionan en *cis*. Los potenciadores sirven para aumentar la transcripción de los promotores cercanos. Los potenciadores también contienen a menudo elementos de respuesta que median la regulación de la transcripción. Los promotores también pueden contener elementos de respuesta que median la regulación de la transcripción. Los potenciadores a menudo determinan la regulación de la expresión de un gen. Aunque actualmente se conocen muchas secuencias de potenciador de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina), normalmente se usará un potenciador de un virus de célula eucariota para la expresión general. Los ejemplos preferidos son el potenciador de SV40 sobre el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de

citomegalovirus, el potenciador de polioma sobre el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

165. El promotor y/o el potenciador se puede activar de manera específica bien mediante la luz o por fenómenos químicos específicos que desencadenan su función. Los sistemas pueden estar regulados por reactivos tales como tetraciclina y dexametasona. También hay modos de potenciar la expresión génica del vector vírico mediante la exposición a la irradiación, tal como la irradiación gamma o fármacos de alquilación en quimioterapia.

166. En determinadas realizaciones, la región del promotor y/o del potenciador pueden actuar como un promotor y/o potenciador constitutivo para maximizar la expresión de la región de la unidad de transcripción que se va a transcribir. En determinadas construcciones, la región del promotor y/o del potenciador está activa en todos los tipos de células eucariotas, incluso si solo se expresa en un tipo de célula particular en un momento particular. Un promotor preferido de este tipo es el promotor de CMV (650 pb). Otros promotores preferidos son los promotores de SV40, citomegalovirus (promotor de longitud completa) y de vector de retrovirus LTF.

167. Se ha demostrado que todos los elementos reguladores específicos se pueden clonar y usar para construir vectores de expresión que se expresan de manera selectiva en tipos celulares específicos tales como células de melanoma. El promotor de la proteína acética fibrilar de la glía (GFAP) se ha usado para expresar genes de manera selectiva en células de origen glial.

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

b) Marcadores

169. Los vectores víricos pueden incluir secuencias de ácido nucleico que codifican un producto de marcador. Este producto de marcador se usa para determinar si el gen se ha administrado a la célula y si una vez administrado se está expresando. Los genes de marcadores preferidos son el gen *lacZ* de *E. coli*, que codifica la β -galactosidasa y la proteína fluorescente verde.

170. En algunas realizaciones, el marcador puede ser un marcador seleccionable. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para las células de mamífero son dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina cinasa, neomicina, análogo de neomicina G418, hidromicina y puromicina. Cuando dichos marcadores seleccionables se transfieren de manera exitosa a una célula hospedadora de mamífero, la célula hospedadora de mamífero transformada puede sobrevivir si se coloca bajo presión selectiva. Hay dos categorías distintas de regímenes selectivos ampliamente usadas. La primera categoría se basa en el metabolismo de una célula y en el uso de una línea celular mutante que carece de la capacidad para crecer independientemente de un medio suplementado. Dos ejemplos son: células CHO-DHFR y las células LTK de ratón. Estas células carecen de la capacidad para crecer sin la adición de tales nutrientes como timidina o hipoxantina. Dado que estas células carecen de determinados genes necesarios para una vía completa de síntesis de nucleótidos, no pueden sobrevivir salvo que se les proporcionen los nucleótidos que les faltan en un medio suplementado. Una alternativa a suplementar el medio es introducir un gen DHFR o TK intacto en células que carecen de los respectivos genes, alterando de este modo sus requisitos de crecimiento. Las células individuales que no se transformen con los genes DHFR o TK no serán capaces de sobrevivir en medio no suplementado.

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

5. Péptidos

a) Variantes de proteína

5 172. Tal como se trata en el presente documento hay numerosas variantes de las proteínas del organismo desvelado que son conocidas y que se contemplan en el presente documento. Además, para la cepa funcional de Thraustochytriales existen derivados de las proteínas de Thraustochytriales que también sirven en los métodos y composiciones desvelados. Las variantes y derivados de proteína se entienden bien por los expertos en la materia y pueden implicar modificaciones en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones en la secuencia de aminoácidos normalmente caen en una o más de tres clases: variantes sustitucionales, insercionales o delecionales.

10 Las inserciones incluyen fusiones de amino y/o carboxilo terminal así como inserciones intrasecuencia de uno o múltiples aminoácidos. Las inserciones normalmente serán inserciones más pequeñas que las de fusiones de amino o carboxilo terminal, por ejemplo, del orden de uno a cuatro restos. Los derivados de proteína de fusión inmunogénica, tales como los descritos en los ejemplos, se hacen fusionando un polipéptido lo suficientemente largo como para conferir inmunogenicidad a la secuencia diana mediante reticulación *in vitro* o mediante cultivo de células recombinantes transformadas con ADN que codifica la fusión. Las deleciones se caracterizan por la eliminación de uno o más restos de aminoácidos de la secuencia proteica. Por lo general, no se delecionan más de aproximadamente 2 a 6 restos en un sitio cualquiera en la molécula de proteína. Estas variantes normalmente se preparan mediante mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína, produciendo de este modo ADN

15 que codifica la variante y que por lo tanto expresa el ADN en cultivo de células recombinantes. Las técnicas para hacer mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en ADN que tiene una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo, mutagénesis con cebador M13 y mutagénesis por PCR. Las sustituciones de aminoácidos normalmente son de un solo resto, pero pueden tener lugar a la vez en una serie de localizaciones diferentes; las inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente 1 a 10 restos de aminoácidos; y las deleciones variarán

20 aproximadamente de 1 a 30 restos. Las deleciones o inserciones preferentemente se hacen en partes adyacentes, es decir, una deleción de 2 restos o una inserción de 2 restos. Las sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas se pueden combinar para llegar a una construcción final. Las mutaciones no deben colocar la secuencia fuera del marco de lectura y preferentemente no crearán regiones complementarias que podrían producir estructuras secundarias de ARNm. Las variantes sustitucionales son aquellas en las que se ha eliminado al menos un

25 resto y se ha insertado un resto diferente en su lugar. Tales sustituciones generalmente están hechas de acuerdo con las siguientes Tablas 1 y 2 y se citan como sustituciones conservativas.

173. Los cambios sustanciales en la función o en la identidad inmunológica se hacen seleccionando sustituciones que son menos conservativas que las de la Tabla 2, es decir, seleccionando restos que difieren de manera más significativa

35 en su efecto de mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o una conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) la carga de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades de la proteína serán aquellas en las que (a) se sustituye un resto hidrófobo, por ejemplo, leucil, isoleucil, fenilalanil, valil o alanil por un resto hidrófilo, por ejemplo, seril o treonil (o al revés); (b) se sustituye cualquier

40 otro resto por una cisteína o prolina (o al revés); (c) un resto electronegativo, por ejemplo, glutamil o aspartil se sustituye por un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisil, arginil o histidil (o al revés); o (d) un resto que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina, se sustituye por un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, en este caso, (e) aumentando el número de sitios para la sulfatación y/o la glucosilación.

45

TABLA 1: Abreviaturas de aminoácidos

Aminoácido	Abreviaturas
Alanina	Ala A
Arginina	Arg R
Asparagina	Asn N
Ácido aspártico	Asp D
Cisteína	Cys C
Glutamina	Gln Q
Ácido glutámico	Glu E
Glicina	Gly G
Histidina	His H
Isoleucina	Ile I
Leucina	Leu L
Lisina	Lys K
Metionina	Met M
Fenilalanina	Phe F

(continuación)

Aminoácido	Abreviaturas	
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

TABLA 2: Sustituciones de aminoácidos

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

* Se conocen otras en la materia

5 174. Por ejemplo, la sustitución de un resto de aminoácido por otro que es biológicamente y/o químicamente similar se conoce por los expertos en la materia como una sustitución conservativa. Por ejemplo, una sustitución conservativa sustituiría un resto hidrófobo por otro, o un resto polar por otro. Las sustituciones incluyen combinaciones tales como, por ejemplo, Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. Tales variaciones sustituidas de manera conservativa de cada secuencia desvelada de manera explícita se incluyen dentro de los polipéptidos
10 mosaicos proporcionados en el presente documento.

175. Se puede emplear la mutagénesis sustitucional o delecional para insertar sitios para la N-glucosilación (Asn-X-Thr/Ser) u O-glucosilación (Ser o Thr). También pueden ser deseables las delecciones de cisteína u otros restos lábiles. Las delecciones o sustituciones de posibles sitios de proteólisis, por ejemplo, Arg, se realizan por ejemplo delecionando
15 uno de los restos básicos o sustituyendo uno mediante restos de glutaminil o histidil.

176. Determinadas derivatizaciones postraduccionales son el resultado de la acción de células hospedadoras recombinantes sobre el polipéptido expresado. Los restos glutaminil y asparaginil con frecuencia se desamidán postraduccionalmente a los correspondientes restos glutamil y asparil. Como alternativa, estos restos se desamidán
20 bajo condiciones ligeramente ácidas. Otras modificaciones postraduccionales incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos de seril o trenil, la metilación de los grupos o-amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, Proteínas: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco pp 79-86, 1983), la acetilación del amino de N-terminal y, en algunos casos, la amidación del carboxilo de C-terminal.

25

177. Se entiende que un modo de definir las variantes y los derivados de las proteínas desveladas en el presente

documento es definiendo las variantes y derivados en términos de homología/identidad para secuencias específicas conocidas. De manera específica, en el presente documento se desvelan variantes de proteína que tienen, al menos, 60 %, el 70 % o el 75 % o el 80 % o el 85 % o el 90 % o el 95 % de homología con la secuencia indicada. Los expertos en la materia entienden fácilmente cómo determinar la homología de dos proteínas. Por ejemplo, la homología se puede calcular tras alinear las dos secuencias para que la homología esté en su máximo nivel.

178. Otro modo de calcular la homología puede ser mediante algoritmos publicados. La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede llevar a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981, mediante el alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85: 2444, 1988, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

179. Se pueden obtener los mismos tipos de homología para ácidos nucleicos mediante, por ejemplo, los algoritmos desvelados en Zuker, *M. Science* 244:48-52, 1989, Jaeger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 86:7706-7710, 1989, Jaeger et al. *Methods Enzymol.* 183:281-306, 1989.

180. Se entiende que las descripciones de mutaciones conservativas y de homología se pueden combinar juntas en cualquier combinación, tal como realizaciones que tienen al menos el 70 % de homología con una secuencia particular en donde las variantes son mutaciones conservativas.

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

182. Se entiende que hay numerosos aminoácidos y análogos de péptidos que se pueden incorporar en las composiciones desveladas. Por ejemplo, hay numerosos D aminoácidos o aminoácidos que tiene un sustituyente funcional diferente a los aminoácidos mostrados 41 en la Tabla 1 y en la Tabla 2. Se desvelan estereoisómeros opuestos de origen natural, así como estereoisómeros de análogos de péptidos. Estos aminoácidos se pueden incorporar fácilmente en cadenas de polipéptidos cargando moléculas de ARNt con el aminoácido de elección y diseñando construcciones genéticas que utilizan, por ejemplo, codones ámbar, para insertar el aminoácido análogo en una cadena de péptido de una forma específica de sitio (Thorson et al., *Methods in Mol. Biol.* 77:43-73, 1991, Zoller, *Curr. Opin. Biotech.*, 3:348-354, 1992; Ibba, *Biotechnol. Genet. Eng.* 13:197-216, 1995, Cahill et al., *Trends Biochem. Sci.*, 14:400-403, 1989; Benner, *Trends. Biotechnol.*, 12:158-163, 1994).

183. Se pueden producir moléculas que se asemejan a péptidos, pero que no se conectan a través de un enlace peptídico natural. Por ejemplo, los enlaces para los aminoácidos o los análogos de aminoácidos pueden incluir $\text{CH}_2\text{NH-}$, $-\text{CH}_2\text{S-}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH-}$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, y $-\text{CHH}_2\text{SO-}$. (Éstos y otros se pueden encontrar en Spatola, A. F. en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York p. 267, 1983; Spatola, A.F., *Vega Data* (marzo de 1983), Vol. 1, tomo 3, *Peptide Backbone Modifications* (general review); Morley, *Trends Pharm. Sci.* 463-468, 1980; Hudson, D. et al., *Int. J. Pept. Prot. Res.* 14:177-185, 1979 ($-\text{CH}_2\text{NH-}$, CH_2CH_2-); Spatola et al. *Life Sci.* 38:1243-1249, 1986 ($-\text{CHH}_2-\text{S}$); Hann *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1307-314, 1982 ($-\text{CH-CH-}$, cis y trans); Almquist et al. *J. Med. Chem.* 23:1392-1398, 1980 ($-\text{COCH}_2-$); Jennings-White et al. *Tetrahedron Lett.*, 23:2533, 1982 ($-\text{COCH}_2-$); Szelke et al. *European Appln.*, EP 45665 CA: 97:39405, 1982 ($-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$); Holladay et al. *Tetrahedron Lett.* 24:4401-4404, 1983 ($-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$); y Hruby *Life Sci.* 31:189-199, 1982 ($-\text{CH}_2-\text{S-}$). Un enlace peptídico particularmente preferido es $-\text{CH}_2\text{NH-}$. Se entiende que los análogos de péptido pueden tener más de un átomo entre los átomos unidos, tal como b-alanina, ácido g-aminobutírico y similares.

184. Los análogos de aminoácidos y los análogos y los análogos de péptido a menudo tienen propiedades mejoradas o deseadas, tal como, más producción económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas mejoradas (semivida, absorción, potencia, eficacia, etc.), especificidad alterada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas), antigenicidad reducida y otras.

185. Se pueden usar D-aminoácidos para generar péptidos más estables, debido a que los D-aminoácidos no son

reconocidos por las peptidasas y similares. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) se puede usar para generar péptidos más estables. Se pueden usar restos de cisteína para ciclar o unir dos o más péptidos juntos. Esto puede ser beneficioso para constreñir péptidos en conformaciones particulares. (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387, 5 1992).

6. Suplementos

186. También se desvelan en el presente documento suplementos nutricionales. Un suplemento nutricional es cualquier compuesto o composición que se puede administrar a o tomar por un sujeto para proporcionar, suministrar o aumentar un nutriente (o nutrientes) (por ejemplo, vitamina, mineral, elemento traza esencial, aminoácido, péptido, ácido nucleico, oligonucleótido, lípido, colesterol, esteroide, carbohidrato y similares). En un aspecto, en el presente documento se desvelan suplementos nutricionales que comprenden cualquiera de los compuestos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, un suplemento nutricional puede comprender cualquiera de los lípidos desvelados en el presente documento. Los restos de ácidos grasos de esos lípidos pueden ser cualquier ácido graso tal como se desvela en el presente documento (por ejemplo, restos de ácidos grasos insaturados o saturados).

187. El suplemento nutricional puede comprender cualquier cantidad de los compuestos desvelados en el presente documento, pero normalmente contendrá una cantidad determinada para suministrar una un sujeto una dosis deseada de un derivado de bencenodiol (por ejemplo, CoQ₁₀) y/o ácidos grasos. La cantidad exacta de compuesto requerida en el suplemento nutricional variará de un sujeto a otro, en función de la especie, de la edad, del peso y de la condición general del sujeto, de la gravedad de la deficiencia dietética que se está tratando, del modo particular de administración y similares. Por lo tanto; no es posible especificar una cantidad exacta para cada suplemento nutricional. Sin embargo, un experto en la materia puede determinar la cantidad apropiada usando solo la experimentación habitual dadas las enseñanzas del presente documento. En un ejemplo específico, un suplemento nutricional puede comprender de aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 20 %, de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 7,5 %, o de aproximadamente el 3 a aproximadamente el 5 % en peso del compuesto. En otro ejemplo, el suplemento nutricional puede comprender de aproximadamente el 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 15,5, 16,0, 16,5, 17,0, 17,5, 18,0, 18,5, 19,0, 19,5, o 20,0 % en peso del compuesto, en donde cualquiera de los valores indicados puede formar un extremo superior o inferior cuando sea apropiado. En otro aspecto, cuando haya suplemento nutricional, el suplemento puede estar compuesto de hasta el 100 % del suplemento.

188. El suplemento nutricional también puede comprender otro(s) nutriente(s) tales como vitaminas, elementos traza, minerales y similares. Además, el suplemento nutricional puede comprender otros componentes tales como conservantes, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, dispersantes y/o aglutinantes.

189. Los suplementos nutricionales generalmente se toman por vía oral y pueden estar en cualquier forma adecuada para la administración oral. Por ejemplo, un suplemento nutricional puede estar normalmente en forma de comprimido, cápsula de gel, cápsula, líquido, sobrecito o jarabe.

7. Dispositivos de administración

190. Cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento se puede incorporar en un dispositivo de administración. Los ejemplos de dispositivos de administración incluyen, pero sin limitación, microcápsulas, microesferas, nanoesferas o nanopartículas, liposomas, noisoma, nanoeritrosoma, nanopartículas de sólido-líquido, geles, capsulas de gel, comprimidos, lociones, cremas, pulverizadores o emulsiones. Otros ejemplos de dispositivos de administración que son adecuados para la administración no oral incluyen pulmoesferas. Los ejemplos de administración particulares útiles en el presente documento se describen a continuación.

191. Los compuestos desvelados se pueden incorporar en liposomas. Tal como se sabe en la materia, los liposomas generalmente provienen de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos monolamelares o multilamelares hidratados que se dispersan en un medio acuoso. Se puede usar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las composiciones desveladas en forma de liposoma pueden contener, además de un compuesto desvelado en el presente documento, estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los ejemplos de lípidos adecuados son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. Los métodos de formación de liposomas se conocen en la materia. Véanse, por ejemplo, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, p. 33 et seq.; 1976.

192. En otros ejemplos, los liposomas pueden ser liposomas catiónicos (por ejemplo, DOTMA, DOPE, DC colesterol) o liposomas aniónicos. Los liposomas pueden comprender adicionalmente proteínas para facilitar el direccionamiento a una célula particular, si se desea. La administración de una composición que comprende un compuesto y un liposoma

catiónico se puede administrar a la sangre aferente a un órgano diana o se puede inhalar en el tracto respiratorio a las células diana del tracto respiratorio. En relación con los liposomas, véase, por ejemplo, Brigham, et al., *Am J Resp Cell Mol Biol* 1:95-100, 1989; Feigner, et al., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 84:7413-7, 1987; y la patente de Estados Unidos N.º 4.897.355. Como ejemplo, la administración se puede hacer a través de un liposoma usando las preparaciones de liposoma comercialmente disponibles tales como LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), así como otros liposomas desarrollados de acuerdo con los procedimientos estándar en la materia. También se pueden usar liposomas en donde la difusión del compuesto o la administración del compuesto del liposoma se diseña para una tasa o dosificación específica.

10

193. Tal como se describe en el presente documento, los noisomas son dispositivos de administración que se pueden usar para administrar las composiciones desveladas en el presente documento. Los noisomas son vesículas multilamelares o unilamelares que implican tensioactivos no iónicos. Una solución acuosa de soluto está encerrada por una bicapa que es resultante de la organización de las macromoléculas de tensioactivo. De forma similar a los liposomas, los noisomas se usan en la administración dirigida de, por ejemplo, fármacos antineoplásicos, incluyendo metotrexato, doxorubicina e inmunoadyuvantes. Generalmente se entiende que son diferentes de los transferosomas, vesículas preparadas a partir de polímeros que contienen carbohidratos anfífilos y grupos amino, por ejemplo, quitosán.

15

194. Tal como se describe en el presente documento, los nanoeritrosomas son dispositivos de administración que se pueden usar para administrar las composiciones desveladas en el presente documento. Los nanoeritrosomas son nanovesículas hechas de glóbulos rojos mediante la diálisis a través de filtros de tamaño de poro definido. Estas vesículas se pueden cargar con una gran variedad de moléculas biológicamente activas, incluyendo proteínas y las composiciones desveladas en el presente documento. Generalmente funcionan como vehículos ideales para agentes antineoplásicos como bleomicina, actinomicina D, pero se pueden usar para esteroides, otros lípidos, etc.

20

195. Los glóbulos rojos artificiales, como se describen en el presente documento, son dispositivos de administración adicionales que se pueden usar para administrar las composiciones desveladas en el presente documento. Los glóbulos rojos artificiales se pueden generar por métodos de emulsión de polimerización interfacial. En general, la pared "celular" está hecha de polímero/poliestireno de polifitaloil L-lisina y el núcleo está hecho de una solución de hemoglobina de hemolisado de oveja. Las microesferas cargadas con hemoglobina normalmente tienen tamaños de partícula de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 μm . Su tamaño, flexibilidad y capacidad de transportar de oxígeno es similar a los glóbulos rojos.

30

196. Las nanopartículas de sólido-lípido, como se describen en el presente documento, son otros dispositivos de administración que se pueden usar para administrar las composiciones desveladas en el presente documento. Las nanopartículas de sólido-lípido son nanopartículas, que se dispersan en una solución acuosa de tensioactivo. Están comprendidos de un núcleo hidrófobo que tiene una monocapa de un recubrimiento de fosfolípido y normalmente se preparan mediante técnicas de homogeneización a alta presión. Los complejos inmunomoduladores (ISCOM) son ejemplos de nanopartículas de sólido-lípido. Son ensamblajes supramoleculares de 40 nm tipo jaula que comprenden fosfolípidos, colesterol y antígenos hidrófobos y se usan principalmente como inmunoadyuvantes. Por ejemplo, los ISCOM se usan para prolongar los niveles en plasma sanguíneo de ciclosporina inyectada por vía subcutánea.

35

197. Las microesferas y las microcápsulas, como se describen en el presente documento, son otros dispositivos más que se pueden usar para administrar las composiciones desveladas en el presente documento. Al contrario de los sistemas de administración liposomales, las microesferas y las microcápsulas normalmente no tienen un núcleo acuoso, sino una matriz o membrana polimérica. Estos dispositivos de administración se obtienen mediante la precipitación controlada de los polímeros, la reticulación química de los polímeros solubles y la polimerización interfacial de dos monómeros o técnicas de homogeneización de alta presión. El compuesto encapsulado se libera de forma gradual desde el depósito por erosión o difusión desde las partículas. Las formulaciones exitosas de péptidos de acción a corto plazo, tales como agonistas de LHRH como leuprorelina y triptorelina, se han desarrollado. Las microesferas de poli(láctido co-glucólido) (PLGA) se usan actualmente como formas de dosificación mensuales y trimensuales en el tratamiento de cáncer de próstata avanzado, endometriosis y otras afecciones sensibles a hormonas. La leuprolida, un superagonista de LHRH, se incorporó a una variedad de matrices de PLGA usando un método de extracción/evaporación de disolvente. Tal como se indica, todos estos dispositivos de administración se pueden usar en los métodos desvelados en el presente documento.

50

198. Las pulmoesferas son otro ejemplo más de dispositivos de administración que se pueden usar en el presente documento. Las pulmoesferas son partículas porosas huevas con una baja densidad (menos de aproximadamente 0,1 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Las pulmoesferas normalmente tienen una excelente redispersibilidad y normalmente se preparan mediante la tecnología de la condensación con fluidos supercríticos. El co-secado por pulverización con determinadas matrices, tales como carbohidratos, albúmina sérica humana, etc., puede mejorar la estabilidad de las proteínas y los péptidos (por ejemplo, insulina) y otras biomoléculas para la administración pulmonar. Este tipo de administración también podría realizarse sin microemulsiones, que son emulsiones ultrafinas, finas, transparentes de aceite en agua (ac/ag) formadas de manera espontánea sin entrada significativa de energía mecánica. En esta técnica, se puede preparar

60

- una emulsión a una temperatura, que debe ser mayor que la temperatura de inversión de fase del sistema. A temperatura elevada, la emulsión es de tipo agua en aceite (ag/ac) y a medida que se enfría a la temperatura de inversión de fase, esta emulsión se invierte para llegar a ser ac/ag. Debido a su fase interna muy pequeña, son extremadamente estables y se usan para la liberación sostenida de esteroides y de vacunas. Las emulsiones de lípidos comprenden una parte central neutra del lípido (es decir, los triglicéridos) estabilizada por una monocapa de lípido anfifílico (es decir, fosfolípido) usando tensioactivos como los triglicéridos de la lecitina del huevo y migliol. Son adecuados para el direccionamiento pasivo y activo.
199. Existen otros sistemas de administración oral en investigación que se basan en la modulación de la presión osmótica, la modulación del pH, la modulación de la hinchazón, la densidad alterada y los sistemas de flotación, la mucoadhesividad, etc. Estas formulaciones y las formulaciones de tiempo retardado para la administración de fármacos de acuerdo con el ritmo circadiano de la enfermedad que actualmente están en uso o en investigación se pueden aplicar para administrar las composiciones desveladas en el presente documento.
200. En un aspecto particular desvelado en el presente documento, los compuestos desvelados, incluyendo el suplemento nutricional y las formulaciones farmacéuticas del mismo, se pueden incorporar en microcápsulas, tal como se describe en el presente documento.
201. En un aspecto desvelado en el presente documento, los compuestos desvelados se pueden incorporar en microcápsulas. En un aspecto, las microcápsulas comprenden una aglomeración de microcápsulas primarias y los compuestos de cromo descritos en el presente documento, teniendo cada una de las microcápsulas individuales primarias un almacén primario, en el que el compuesto de cromo está encapsulado por el almacén primario, en el que la aglomeración se encapsula por un almacén externo. Estas microcápsulas se citan en el presente documento como "microcápsulas multinucleadas".
202. En otro aspecto, en el presente documento se describen microcápsulas que comprenden un compuesto de cromo, un almacén primario y un almacén secundario, en donde el almacén primario encapsula el compuesto de cromo y el almacén secundario encapsula la sustancia de carga y el almacén primario. Estas microcápsulas se citan en el presente documento como "microcápsulas mononucleadas".
203. Opcionalmente, se pueden encapsular otras sustancias con el compuesto de cromo. La sustancia de carga puede ser cualquier sustancia que no sea totalmente soluble en la mezcla acuosa. En un aspecto, la sustancia de carga es un sólido, un líquido hidrófobo o una mezcla de un sólido y un líquido hidrófobo. En otro aspecto, la sustancia de carga comprende una grasa, un aceite, un lípido, un fármaco (por ejemplo, de molécula pequeña), una sustancia biológicamente activa, un suplemento nutricional (por ejemplo, vitaminas), un compuesto aromatizante o una mezcla de los mismos. Los ejemplos de aceites incluyen, pero sin limitación, aceites animales (por ejemplo, aceite de pescado, aceite de mamífero marino, etc.), aceites vegetales (por ejemplo, colza), aceites minerales, derivados de los mismos o mezclas de los mismos. La sustancia de carga puede ser una sustancia oleosa purificada o parcialmente purificada tal como un ácido graso, un triglicérido o éster del mismo, o una mezcla del mismo. En otro aspecto, la sustancia de carga puede ser un carotenoide (por ejemplo, licopeno), un agente de saciedad, un compuesto aromatizante, un fármaco (por ejemplo, un fármaco insoluble en agua), un material particulado, un compuesto químico agrícola (por ejemplo, herbicidas, insecticidas, fertilizantes) o un ingrediente de acuicultura (por ejemplo, pienso, pigmento).
204. En un aspecto, la sustancia de carga puede ser un ácido graso omega-3. Los ejemplos de ácidos grasos omega-3 incluyen, pero sin limitación, ácido α -linolénico (18:3n3), ácido octadecatetraenoico (18:4n3), ácido eicosapentaenoico (20:5n3) (EPA), ácido docosahexaenoico (22:6n3) (DHA), ácido docosapentaenoico (22:5n3) (DPA), ácido eicosatetraenoico (20:4n3), ácido uncosapentaenoico (21:5n3), ácido docosapentaenoico (22:5n3) y derivados de los mismos y mezclas de los mismos. En la materia se conocen muchos tipos de derivados de ácidos grasos omega-3. Los ejemplos de derivados adecuados incluyen, pero sin limitación, ésteres, tales como ésteres de fitoesterol, ésteres de alquilo C₁-C₃₀ ramificado o no ramificado, ésteres de alquenilo C₂-C₃₀ ramificado o no ramificado, o ésteres de cicloalquilo C₃-C₃₀ ramificado o no ramificado tales como ésteres de fitoesterol y ésteres de alquilo C₁-C₆. Las fuentes de aceites pueden provenir de organismos acuáticos (por ejemplo, anchoas, capelín, bacalao del Atlántico, arenque del Atlántico, caballa del Atlántico, menhaden del Atlántico, salmones, sardinas, tiburones, atunes, etc.) y de plantas (por ejemplo, linaza, hortalizas, etc.) y microorganismos (por ejemplo, hongos y algas).
205. En un aspecto, la sustancia de carga puede contener un antioxidante. Los ejemplos de antioxidantes incluyen, pero sin limitación, vitamina E, CoQ₁₀, tocoferoles, derivados solubles en lípidos de antioxidantes más polares, como los ésteres de ácido graso de ascorbilo (por ejemplo, palmitato de ascorbilo), extractos de plantas (por ejemplo, aceites de romero, salvia y orégano), extractos de algas y antioxidantes sintéticos (por ejemplo, BHT, TBHQ, etoiquina, galatos de alquilo, hidroquinonas, tocotrienoles).
206. Se puede usar una serie de polímeros diferentes para producir las capas del almacén de las microcápsulas mononucleadas y multinucleadas. Los ejemplos de tales polímeros incluyen, pero sin limitación, una proteína, un polifosfato, un polisacárido o una mezcla de los mismos. En otro aspecto, el material del almacén usado para preparar las microcápsulas mononucleadas y multinucleadas comprende adicionalmente. En otro aspecto, el material del

- almazón usado para preparar las microcápsulas mononucleadas y multinucleadas comprende adicionalmente gelatina de tipo A, gelatina de tipo B, polifosfato, goma arábica, alginato, quitosán, carragenano, pectina, almidón, almidón modificado, alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina, ovalbúmina, polisorbitón, maltodextrinas, ciclodextrinas, celulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, proteína láctea, proteína del trigo, proteína de la soja, proteína de la colza, albúmina, quitina, polilactidas, poli-lactida-co-glucólidos, quitina derivatizada, quitosán, polilisina, varios compuestos inorgánicos-orgánicos o cualquier mezcla de los mismos. También se contempla que los derivados de estos polímeros se puedan usar. En otro aspecto, el polímero puede ser gelatina de kósher, gelatina no de kósher, gelatina Halal o gelatina no Halal.
- 10 207. En un aspecto, una o más de las capas del almacén en las microcápsulas mononucleadas y multinucleadas comprende gelatina que tiene un número de Bloom de menos de 50. Esta gelatina se cita en el presente documento como "gelatina de bajo Bloom". El número de Bloom describe la fuerza del gel formado a 10 °C con una solución del 6,67 % gelificada durante 18 horas. En un aspecto, la gelatina de bajo Bloom tiene un número de Bloom de menos de 40, menos de 30, menos de 20 o menos de 10. En otro aspecto, la gelatina tiene un número de Bloom de 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, o 0, en donde se puede usar cualquiera de los dos valores para producir un intervalo. En otro aspecto, la gelatina de bajo Bloom está tanto en el almacén primario como en el almacén secundario de la microcápsula multinucleada. En un aspecto, la gelatina de bajo Bloom es gelatina de tipo A. En otro aspecto, la gelatina de bajo Bloom es gelatina de tipo A producida por Kenney & Ross Ltd., R.R. n.º 3 Shelburne, NS Canadá. En otro aspecto, la gelatina que tiene un número de Bloom de cero está tanto en el almacén primario como en el almacén secundario de la microcápsula multinucleada.
- 15 208. En un aspecto, el material usado para crear los almacenes de las microcápsulas mononucleadas o multinucleadas es un sistema de dos componentes hecho de una mezcla de dos tipos de polímeros diferentes. En un aspecto, el material es un coacervado complejo entre componentes poliméricos. La coacervación del complejo se genera por la interacción entre dos polímeros cargados de forma opuesta. En un aspecto, el material del almacén usado para producir las microcápsulas mononucleadas y multinucleadas está compuesto de (1) gelatina de bajo Bloom y (2) gelatina de tipo B, polifosfato, goma arábica, alginato, quitosán, carragenano, pectina, carboximetilcelulosa, proteína del trigo, proteína de la soja, proteína de la colza, albúmina o una mezcla de los mismos. La proporción molar de los diferentes polímeros puede variar. Por ejemplo, la proporción molar de la gelatina de bajo Bloom frente al otro componente polimérico es de 1:5 a 15:1. Por ejemplo, cuando se usa la gelatina de bajo Bloom y el polisorbato, la proporción molar de la gelatina de bajo Bloom frente a polisorbato es de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 12:1; cuando se usa la gelatina de bajo Bloom y la gelatina de tipo B, la proporción molar es de 2:1 a 1:2; y cuando se usa la gelatina de bajo Bloom y el alginato, la proporción molar es de 3:1 a 8:1.
- 20 209. Se pueden incluir ayudantes del procesamiento en el material del almacén (por ejemplo, en los almacenes primarios o externos). Los ayudantes del procesamiento se pueden usar por una variedad de motivos. Por ejemplo, se pueden usar para promover la aglomeración de las microcápsulas primarias, estabilizar el sistema de emulsión, mejorar las propiedades de los almacenes externos, controlar el tamaño de la microcápsula y/o para actuar como un antioxidante. En un aspecto, el ayudante del procesamiento puede ser un emulsionante, un ácido graso, un lípido, una cera, una célula microbiana (por ejemplo, líneas de células de levadura), una arcilla o un compuesto inorgánico (por ejemplo, carbonato de calcio). Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, estos ayudantes de procesamiento pueden mejorar las propiedades de barrera de las microcápsulas. En un aspecto, se pueden añadir uno o más antioxidantes al material del almacén. Las propiedades antioxidantes son útiles tanto durante el proceso (por ejemplo, durante la coacervación y/o el secado por pulverización) como en las microcápsulas una vez que se han formado (es decir, para prolongar la semivida, etc.). Preferentemente, se puede usar un pequeño número de ayudantes de procesamiento que realizan un gran número de funciones. En un aspecto, el antioxidante puede ser un compuesto fenólico, un extracto vegetal o un aminoácido que contiene sulfuro. En un aspecto, se puede usar ácido ascórbico (o una sal del mismo tal como ascorbato de sodio o de potasio) para promover la aglomeración de las microcápsulas primarias, para controlar el tamaño de la microcápsula y para actuar como un antioxidante. El antioxidante se puede usar en una cantidad de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 12.000 ppm o de aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 5.000 ppm. Otros ayudantes del procesamiento tales como, por ejemplo, quelantes de metales, también se pueden usar. Por ejemplo, se puede usar ácido etilendiamino tetraacético para unir iones metálicos, lo que puede reducir la oxidación catalítica de la sustancia de carga.
- 25 210. En un aspecto, las microcápsulas primarias (almacenes primarios) tienen un diámetro promedio de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 10 µm, de 0,1 µm a aproximadamente 10 µm, de 1 µm a aproximadamente 10 µm, de 1 µm a aproximadamente 8 µm, de 1 µm a aproximadamente 6 µm, de 1 µm a aproximadamente 4 µm, o de 1 µm a aproximadamente 2 µm, o de 1 µm. En otro aspecto, las microcápsulas nucleadas pueden tener un diámetro promedio de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 2000 µm, de 20 µm a aproximadamente 1000 µm, de aproximadamente 20 µm a aproximadamente 100 µm, o de aproximadamente 30 µm a aproximadamente 80 µm. En otro aspecto, las microcápsulas mononucleadas tienen un diámetro externo de 1 µm a 2.000 µm.
- 30 211. Las microcápsulas descritas en el presente documento generalmente tienen una combinación de alta carga útil y fuerza estructural. Por ejemplo, las cargas útiles de la sustancia de carga pueden ser del 20 % al 90 %, del 50 % al

70 % en peso o del 60 % en peso de las microcápsulas mononucleadas o multinucleadas.

212. En un aspecto, los métodos desvelados en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0193102 se puede usar para encapsular los compuestos de cromo descritos en el presente documento. También se contempla que una o más capas adicionales del armazón se pueden colocar sobre el armazón externo de las microcápsulas mononucleadas o multinucleadas. En un aspecto, las técnicas descritas en la Publicación Internacional N.º WO 2004/041251 A1, se pueden usar para añadir capas adicionales del armazón a las microcápsulas mononucleadas y multinucleadas.

10 a) Composiciones farmacéuticas y nutracéuticas

213. Estos lípidos y antioxidantes están dirigidos para su uso en piensos de animales, productos farmacéuticos, nutracéuticos (especialmente de fórmula para lactantes) así como para la industria. Esto también incluye formas de administración de nutracéuticos tales como cápsulas de gel y similares, microencapsulados comunes, etc.

214. Tal como se ha descrito anteriormente, las composiciones también se pueden administrar *in vivo* en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material que no es indeseable biológicamente o de otro modo, es decir, el material se puede administrar a un sujeto, junto con el ácido nucleico o el vector, sin provocar ningún efecto biológico o interacción indeseable de forma deletérea con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que lo contiene. El vehículo se seleccionaría de forma natural para minimizar cualquier degradación del principio activo y minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como bien sabría un experto en la materia.

215. Las composiciones se pueden administrar por vía oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa), mediante inyección intramuscular, mediante inyección intraperitoneal, transdérmica, extracorpórea, tópica o similares, incluyendo la administración tópica intranasal o la administración por inhalación. Tal como se usa en el presente documento, "administración tópica intranasal" se refiere a la administración de las composiciones en la nariz y en los conductos nasales a través de una o ambas fosas nasales y puede comprender administrar el ácido nucleico o el vector mediante un mecanismo de pulverización o mecanismo por goteo, o mediante aerosoles. La administración de las composiciones mediante inhalador puede ser a través de la nariz o de la boca por el suministro mediante un mecanismo de pulverización o de goteo. La administración también puede ser directamente a cualquier zona del sistema respiratorio (por ejemplo, los pulmones) mediante intubación. La cantidad exacta de las composiciones requeridas variará de un sujeto a otro, en función de la especie, de la edad, del peso y de la condición general del sujeto, de la gravedad del trastorno alérgico que se está tratando, del ácido nucleico o vector particular usado, de su modo de administración y similares. Por tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada composición. Sin embargo, un experto en la materia puede determinar la cantidad apropiada usando solo la experimentación habitual dadas las enseñanzas del presente documento.

216. La administración parenteral de la composición, si se usa, generalmente se hace mediante inyección. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, bien como soluciones líquidas o bien como suspensiones, formas sólidas adecuadas para la solución de suspensión en líquido antes de la inyección o como emulsiones. Una estrategia para administración parenteral revisada más recientemente implica el uso de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de tal manera que se mantiene una dosificación constante. Véanse, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 3.610.795.

217. Los materiales pueden estar en solución, en suspensión (por ejemplo, incorporados en micropartículas, liposomas o células). Estos se pueden direccionar a un tipo particular de células mediante anticuerpos, receptores o ligandos de receptores. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para direccionar proteínas específicas hacia el tejido tumoral (Senter, et al., *Bioconjugate Chem.*, 2:447-451,1991; Bagshawe, K.D., *Br. J. Cancer*, 60:275-281,1989; Bagshawe, et al., *Br. J. Cancer*, 58:700-703,1988; Senter, et al., *Bioconjugate Chem.*, 4:3-9,1993; Battelli, et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 35:421-425, 1992; Pietersz y McKenzie, *Immunolog. Reviews*, 129:57-80,1992; y Roffler, et al., *Biochem. Pharmacol.*, 42:2062-2065,1991). Los vehículos tales como los "furtivos" y otros liposomas conjugados con anticuerpos (incluyendo el direccionamiento del fármaco mediado por lípidos para carcinoma de colon), el direccionamiento de ADN mediado por receptor a través de ligandos específicos de células, el direccionamiento al tumor dirigido por linfocitos y el direccionamiento terapéutico de retrovirus a células de glioma de murino *in vivo*. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para direccionar proteínas específicas hacia el tejido tumoral (Hughes et al., *Cancer Research*, 49:6214-6220,1989); y Litzinger y Huang, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104:179-187,1992). En general, los receptores están implicados en las vías de endocitosis, bien constitutiva o inducida por ligando. Estos agrupamientos de receptores en huecos recubiertos de clatrina, penetran en la célula a través de vesículas recubiertas de clatrina, pasan a través de un endosoma ácido en el que se clasifican los receptores y después se reciclan a la superficie celular, se llegan a almacenar de manera intracelular o se degradan en lisosomas. Las vías de internalización sirven para una variedad de funciones, tales como la absorción de nutrientes, la eliminación de proteínas activadas, la eliminación de macromoléculas, la entrada oportunista de virus y de toxinas, la disociación y la degradación del ligando y la regulación a nivel del receptor. Muchos receptores siguen más de una vía intracelular, en función del tipo celular, de la concentración del receptor, del tipo de

ligando, de la valencia del ligando y de la concentración del ligando. Los mecanismos moleculares y celulares de endocitosis mediada por receptor se han revisado (Brown y Greene, DNA and Cell Biology 10:399-409,1991).

(1) Vehículos farmacéuticamente aceptables

- 5 218. Las composiciones, incluyendo anticuerpos, se pueden usar de manera terapéutica en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 219. Los vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19th ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995. Por lo general, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer que la formulación sea isotónica. Los ejemplos de vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen, pero sin limitación, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 y más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Los vehículos adicionales incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos con forma, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Será evidente para los expertos en la materia que determinados vehículos pueden ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la ruta de administración y la concentración de la composición que se está administrando.
- 15 220. Los vehículos farmacéuticos son conocidos para los expertos en la materia. Estos generalmente serían vehículos estándar para la administración de fármacos a seres humanos, incluyendo soluciones tales como agua estéril, solución salina y soluciones tamponadas a pH fisiológico. Las composiciones se pueden administrar por vía intramuscular o por vía subcutánea. Se administrarán otros compuestos de acuerdo con los procedimientos estándar usados por los expertos en la materia.
- 20 221. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos y similares además de la molécula de elección. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos y similares.
- 25 222. La composición farmacéutica se puede administrar de una serie de maneras en función de si se desea un tratamiento local o sistémico, y del área que se va a tratar. La administración puede ser por vía tópica (incluyendo la vía oftálmica, vaginal, rectal, intranasal), oral, por inhalación o por vía parenteral, por ejemplo mediante goteo intravenoso, inyección subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Los anticuerpos desvelados se pueden administrar por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavidad o transdérmica.
- 30 223. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.
- 35 224. Las formulaciones para la administración tópica pueden incluir pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos. Los vehículos farmacéuticos convencionales, soluciones acuosas, polvos o bases oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables.
- 40 225. Las composiciones para la administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o en medio no acuoso, cápsulas, sobrecitos o comprimidos. Los espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, dispersantes o aglutinantes pueden ser deseables.
- 45 226. Algunas de las composiciones se pueden administrar potencialmente como una sal de adición de ácido o de base farmacéuticamente aceptable, formada mediante la reacción con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y por ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico y ácido fumárico o mediante la reacción con una base inorgánica tal como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio y bases orgánicas tales como mono-, di-, trialkil y aril aminas y etanolaminas sustituidas.
- 50 55 60

(2) Usos terapéuticos

- 65 227. Las dosificaciones eficaces y las pautas para administrar las composiciones se pueden determinar de forma

empírica, y hacer tales determinaciones está dentro de la experiencia en la materia. Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son aquellos lo suficientemente grandes como para producir el efecto deseado en los síntomas del trastorno. La dosificación no debería ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas y similares. En general, la dosificación variará con la edad, la afección, el sexo y el grado de enfermedad en el paciente, la vía de administración o si se incluyen otro fármacos en el régimen, y se pueden determinar por un experto en la materia. El médico puede ajustar la dosificación en el caso de cualquier contraindicación. La dosificación puede variar, y se puede administrar en una o más administraciones de dosis al día, durante uno varios días. Se pueden seguir directrices en la bibliografía para dosificaciones apropiadas para las clases dadas de productos farmacéuticos. Por ejemplo, la directrices en la selección de las dosis apropiadas para los anticuerpos se pueden encontrar en la bibliografía sobre usos terapéuticos de los anticuerpos, por ejemplo, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., (1985) cap. 22 y pp. 303-357; Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, Nueva York (1977) pp. 365-389. Una dosificación diaria típica del anticuerpo usada sola podría variar de aproximadamente 1 µg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

b) Administración dirigida

228. Los liposomas y las microcápsulas desvelados se pueden dirigir a un tipo de célula particular, tal como las células de los islotes, a través de anticuerpos, receptores o ligandos de receptores. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para direccionar tejidos específicos (Senter, et al., Bioconjugate Chem 2:447-51, 1991; Bagshawe, Br J Cancer 60:275-81, 1989; Bagshawe, et al., Br J Cancer 58:700-3, 1988; Senter, et al., Bioconjugate Chem 4:3-9, 1993; Battelli, et al., Cancer Immunol Immunother 35:421-5, 1992; Pietersz y McKenzie, Immunolog Reviews 129:57-80, 1992; y Roffler, et al., Biochem Pharmacol 42:2062-5, 1991). Estas técnicas se pueden usar para una variedad de otros tipos celulares específicos.

8. Alimentos

229. También se desvelan en el presente documento alimentos que comprenden cualquiera de las microcápsulas y emulsiones desveladas en el presente documento. Por "alimento" se refiere a cualquier artículo que se puede consumir (por ejemplo, comer, beber o ingerir) por un sujeto. En un aspecto, las microcápsulas se pueden usar como suplementos nutricionales para un alimento. Por ejemplo, las microcápsulas y las emulsiones se pueden cargar con vitaminas, ácidos grasos omega-3 y otros compuestos que proporcionan beneficios saludables. En un aspecto, el alimento es un producto horneado, una pasta, un producto cárnico, un producto lácteo congelado, un producto de leche, un producto de queso, un producto de huevo, un condimento, una mezcla de sopa, un producto de aperitivo, un producto de frutos secos, un producto de proteína vegetal, un caramelo duro, un caramelo blando, un producto avícola, un zumo de frutas procesado, un azúcar granulado (por ejemplo, blanco o marrón), una salsa, un jugo de carne, un jarabe, una barrita nutritiva, una bebida, un polvo seco de bebida, un jamón o gelatina, un producto de pescado o un alimento de animales de compañía. En otro aspecto, el alimento es pan, tortillas, cereal, salchicha, pollo, helado, yogur, leche, aderezo de ensalada, salvado de arroz, zumo de frutas, un polvo seco de bebida, rollos, galletas con pepitas, galletas saladas, aperitivos, pasteles de frutas o tartas.

9. Microplacas y micromatrices

230. Se desvelan microplacas en donde al menos una dirección son las secuencias o parte de las secuencias establecidas en cualquiera de las secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento. También se desvelan microplacas en donde al menos una dirección son las secuencias o parte de las secuencias establecidas en cualquiera de las secuencias de péptidos desveladas en el presente documento.

231. También se desvelan microplacas en donde al menos una dirección es una variante de las secuencias o parte de las secuencias establecidas en cualquiera de las secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento. También se desvelan microplacas en donde al menos una dirección es una variante de las secuencias o una parte de las secuencias establecidas en cualquiera de las secuencias de péptidos desveladas en el presente documento.

10. Medios legibles en ordenador

232. Se entiende que los ácidos nucleicos y las proteínas desveladas se pueden representar como una secuencia que consiste en los nucleótidos de los aminoácidos. Hay una variedad de formas de presentar estas secuencias, por ejemplo, el nucleótido guanósina se puede representar mediante G o g. Del mismo modo, el aminoácido valina se puede representar por Val o V. Los expertos en la materia entienden cómo representar y expresar cualquier secuencia de ácido nucleico o de proteína en cualquier variedad de formas que existe, cada una de las cuales se considera desvelada en el presente documento. En el presente documento se contempla de manera específica la presentación de estas secuencias en medios legibles en ordenador, tal como, disquetes, cintas, microplacas, discos duros, discos compactos y discos de vídeo, u otros medios legibles por computadora, disponibles comercialmente. También se

desvelan representaciones en código binario de las secuencias desveladas. Los expertos en la materia entienden qué medios legibles por ordenador. Por tanto, medios legibles en ordenador en los que se registran, se almacenan o se guardan las secuencias de ácidos nucleicos o de proteínas.

- 5 233. Se desvelan medios legibles en ordenador que comprenden las secuencias y la información en relación con las secuencias establecidas en el presente documento.

11. Kits

- 10 234. En el presente documento se desvelan kits que se dirigen a reactivos que se pueden usar en la práctica de los métodos desvelados en el presente documento o en el uso o el mantenimiento de las composiciones desveladas en el presente documento. Los kits pueden incluir cualquier reactivo o combinación del reactivo tratada en el presente documento o que se podría entender que se requiere o que es beneficiosa en la práctica de los métodos desvelados. Por ejemplo, los kits podrían incluir uno o más de los microorganismos eucariotas desvelados en el presente documento junto con, por ejemplo, los medios para su mantenimiento. Los kits también podrían incluir, por ejemplo, los lípidos o antioxidantes, junto con los medios para el uso o la administración de éstos.

12. Composiciones con funciones similares

- 20 235. Se entiende que las composiciones desveladas en el presente documento tienen determinadas funciones, tales como producir determinadas proporciones de lípidos. En el presente documento se desvelan determinados requisitos estructurales, genéticos y funcionales para realizar las funciones desveladas, y se entiende que hay una variedad de estructuras, antecedentes genéticos y antecedentes funcionales que pueden realizar la misma función que se relacionan con las estructuras desveladas, y que estas estructuras lograrán en última instancia el mismo resultado, por ejemplo, la producción de una determinada proporción de lípidos.

D. Métodos de preparar las composiciones

- 30 236. Las composiciones desveladas en el presente documento y las composiciones necesarias para realizar los métodos desvelados se pueden hacer usando cualquier método conocido por los expertos en la materia para ese reactivo o compuesto particular salvo que se indique específicamente lo contrario.

1. Síntesis de ácido nucleico

- 35 237. Por ejemplo, los ácidos nucleicos, tales como, los oligonucleótidos que se van a usar como cebadores se pueden preparar usando los métodos convencionales de síntesis química o se pueden producir usando métodos enzimáticos o cualquier otro método conocido. Tales métodos pueden variar desde la digestión enzimática convencional seguida por el aislamiento de fragmentos de nucleótidos (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) Capítulos 5, 6) para métodos puramente sintéticos, por ejemplo, mediante el método de cianoetil fosforamida usando un sintetizador de ADN Milligen o Beckman System 1Plus (por ejemplo, el sintetizador automático modelo 8700 de Milligen-Biosearch, Burlington, MA o ABI Modelo 380B). Los métodos sintéticos útiles para preparar oligonucleótidos también se describen por Ikuta et al., *Ann. Rev. Biochem.* 53:323-356, 1984, (métodos de fosfotriéster y fosfitotriéster) y Narang et al., *Methods Enzymol.*, 65:610-620, 1980, (método de fosfotriéster). Las moléculas de ácido nucleico de las proteínas se pueden preparar usando los métodos conocidos tales como los descritos por Nielsen et al., *Bioconjug. Chem.* 5:3-7, 1994.

2. Síntesis de péptidos

- 50 238. Un método de producir las proteínas desveladas es unir dos o más péptidos o polipéptidos juntos mediante técnicas de química proteica. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos se pueden sintetizar químicamente usando los equipos de laboratorio actualmente disponibles usando bien la química de Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) o bien la de Boc (*tert*-butiloxycarbonilo). (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Un experto en la materia puede apreciar fácilmente que un péptido o polipéptido que se corresponde con las proteínas desveladas, por ejemplo, se puede sintetizar mediante reacciones químicas convencionales. Por ejemplo, se puede sintetizar un péptido o polipéptido y no escindirse de su resina de síntesis mientras que el otro fragmento de un péptido o proteína se puede sintetizar y escindir posteriormente de la resina, exponiendo por lo tanto a un grupo terminal que está funcionalmente bloqueado en el otro fragmento. Mediante reacciones de condensación de péptidos, estos dos fragmentos se pueden unir covalentemente mediante una unión peptídica en sus extremos amino terminal y carboxilo terminal, respectivamente, para formar un anticuerpo o un fragmento del mismo. (Grant GA (1992) *Synthetic Peptides: A User Guide*. W.H. Freeman and Co., N.Y. (1992); Bodansky M y Trost B., Ed. (1993) *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc., NY. Como alternativa, el péptido o el polipéptido se sintetiza independientemente *in vivo* tal y como se describe en el presente documento. Una vez aislados, estos péptidos o polipéptidos independientes se pueden unir para formar un péptido o un fragmento del mismo mediante reacciones de condensación de péptidos similares.

65

239. Por ejemplo, la unión enzimática de los segmentos de péptidos clonados o sintéticos permiten que los fragmentos de péptidos relativamente cortos se unan para producir fragmentos de péptidos más grandes, polipéptidos o dominios proteicos completos (Abrahmsen L et al., *Biochemistry*, 30:4151, 1991). Como alternativa, la unión química natural de los péptidos sintéticos se puede utilizar para construir sintéticamente péptidos o polipéptidos grandes a partir de fragmentos peptídicos más cortos. Este método consiste en una reacción química de dos etapas (Dawson et al. *Science*, 266:776-779, 1994). La primera etapa es la reacción quimioselectiva de un péptido sintético desprotegido-tioéster con otro segmento peptídico desprotegido que contiene un resto Cys en amino terminal para dar un intermediario unido por tioéster como el producto covalente inicial. Sin un cambio en las condiciones de reacción, este intermediario se somete a la reacción intramolecular espontánea, rápida para formar un enlace peptídico natural en el sitio de unión (Baggiolini M et al. *FEBS Lett.* 307:97-101, 1992; Clark-Lewis I et al., *J. Biol. Chem.*, 269:16075, 1994; Clark-Lewis I et al., *Biochemistry*, 30:3128, 1991; Rajarathnam K et al., *Biochemistry* 33:6623-30, 1994).

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

3. Procesos para preparar las composiciones

241. Se desvelan procesos para preparar las composiciones así como para preparar los intermediarios que llevan a las composiciones. Por ejemplo, se desvelan microorganismos eucariotas que pueden producir lípidos y antioxidantes deseados así como métodos para aislar y purificar los lípidos y antioxidantes deseados. Hay una variedad de métodos que se pueden usar para preparar estas composiciones, tales como métodos químicos sintéticos y métodos convencionales de biología molecular. Se entiende que los métodos de preparación de estas y otras composiciones desveladas se desvelan específicamente.

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

243. Se desvela cualquiera de los lípidos producidos por los microorganismos eucariotas desvelados. Se desvela cualquier péptido producido por el proceso de expresar el péptido en los organismos desvelados. Métodos de uso de las composiciones.

4. Método de uso de las composiciones como herramientas de investigación

244. Las composiciones desveladas se pueden usar de una variedad de formas como herramientas de investigación y de la producción de, por ejemplo, lípidos y antioxidantes.

245. Las composiciones desveladas se pueden usar tal como se trata en el presente documento bien como reactivos en micromatrices o bien como reactivos para sondear o analizar las micromatrices existentes. Las composiciones desveladas se pueden usar en cualquier método conocido para aislar o identificar polimorfismos de nucleótidos únicos. Las composiciones también se pueden usar en cualquier método para determinar el análisis alélico de, por ejemplo, las cepas de los organismos desvelados en el presente documento, en particular, el análisis de alelos en lo que se refiere a la producción de lípidos y antioxidantes. Las composiciones también se pueden usar en cualquier método conocido para ensayos de cribado, en relación con las microplacas/micromatrices. Las composiciones también se pueden usar en cualquier forma conocida de uso de las realizaciones legibles en ordenador de las composiciones desveladas, por ejemplo, para estudiar la asociación o para realizar análisis de modelización molecular relacionados con las composiciones desveladas.

5. Métodos de modificación génica y de alteración génica

246. Las composiciones y los métodos desvelados se pueden usar para alteración y modificación de genes dirigidos en cualquier animal que se pueda someter a estos eventos. La modificación génica y la alteración génica se refieren a los métodos, las técnicas y las composiciones en torno a la eliminación o la alteración selectiva de un gen o un tramo del cromosoma en un organismo, tal como los eucariotas desvelados en el presente documento, de una forma que propaga la modificación a través de la replicación del organismo. En general, por ejemplo, una célula se transforma con un vector que está diseñado para recombinar de forma homóloga con una región de un cromosoma o ácido nucleico particular contenido en la célula, tal como por ejemplo, se describe en el presente documento. Este evento de recombinación homóloga puede producir un cromosoma que tiene ADN exógeno introducido, por ejemplo en marco, con el ADN adyacente. Este tipo de protocolo permite que mutaciones muy específicas, tales como mutaciones puntuales, se introduzcan en el genoma contenido en la célula. En el presente documento se desvelan métodos de realización de este tipo de recombinación homóloga.

V. REALIZACIONES ESPECÍFICAS

247. En el presente documento se desvela un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1. El microorganismo eucariota puede producir ácidos grasos insaturados que tienen un perfil mostrado en la figura 2. El microorganismo eucariota puede ser del filo Labyrinthulomycota, la clase Labyrinthulomycetes, la subclase Thraustochytridae, el orden Thraustochytriales, la familia Thraustochytriaceae, y/o el género *Thraustochytrium*. El microorganismo eucariota puede ser de la familia Thraustochytriaceae, y puede tener los números de registro ATCC 20888, 20889, 20890, 20891 y 20892.

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

249. En el presente documento también se desvela un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1, en donde el microorganismo eucariota comprende un ácido graso omega 3 u omega 6. El microorganismo eucariota también puede comprender DHA o DPA.

250. En el presente documento también se desvela un microorganismo eucariota que tiene una secuencia de 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1, en donde el microorganismo produce un lípido o una fracción de ácido graso de al menos aproximadamente el 4 % en peso al 6 % en peso. El lípido puede comprender DHA. La composición de lípido también puede comprender de aproximadamente el 25 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente el 40 % en peso de fracción de ácidos grasos de DHA n-3, de aproximadamente el 6 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente el 10 % en peso de fracción de ácidos grasos de DPA n-6 y de aproximadamente el 0 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente el 3 % en peso de fracción de ácidos grasos de EPA n-3.

251. También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1. La composición puede comprender adicionalmente un medio y/o nutrientes.

252. También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1, en donde la composición es una biomasa. El microorganismo eucariota de la composición puede ser del filo Labyrinthulomycota, la clase Labyrinthulomycetes, la subclase Thraustochytridae, el orden Thraustochytriales, la familia Thraustochytriaceae o el género *Thraustochytrium*. El microorganismo eucariota puede ser *Thraustochytrium sp.*, *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium roseum* o *Thraustochytrium striatum*. El microorganismo eucariota también puede ser de la familia Thraustochytriaceae y puede tener un número de registro de ATCC 20888, 20889, 20890, 20891 o 20892.

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

254. También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1, en donde el microorganismo eucariota, produce ácidos grasos insaturados que tienen un perfil mostrado en la figura 2. El ácido graso insaturado puede comprender un ácido graso omega 3 u omega 6. El ácido graso insaturado también puede comprender DHA o DPA.

255. También se desvela una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1, en donde el microorganismo eucariota puede producir un lípido o una fracción de ácidos grasos de al menos aproximadamente el 4 % en peso al 6 % en peso. El lípido puede comprender DHA. El lípido también puede comprender de aproximadamente el 25 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente el 40 % en peso de fracción de ácidos grasos de DHA n-3, de aproximadamente el 6 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente el 10 % en peso de fracción de ácidos grasos de DPA n-6 y de aproximadamente el 0 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente el 3 % en peso de fracción de ácidos grasos de EPA n-3.

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

65

257. También se desvela que comprende de aproximadamente el 25 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente el 40 % en peso de fracción de ácidos grasos de DHA n-3, de aproximadamente el 6 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente el 10 % en peso de fracción de ácidos grasos de DPA n-6 y de aproximadamente el 0 % en peso de fracción de ácidos grasos a aproximadamente el 3 % en peso de fracción de ácidos grasos de EPA n-3.
258. También se desvela un método de preparación de una composición de lípidos, comprendiendo el método: cultivar el microorganismo eucariota descrito en el presente documento, en un medio heterotrófico, y aislar la composición de lípidos. También se desvela una composición de lípidos preparada de acuerdo con el presente método.
259. También se desvela un dispositivo de administración que comprende cualquiera de las composiciones descritas anteriormente. Por ejemplo, se desvela un dispositivo de administración que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1. El dispositivo de administración puede comprender una microcápsula, una microesfera, una nanoesfera o nanopartícula, un liposoma, un noisoma, un nanoeritosoma, una nanopartícula de sólido-líquido, una leuprolida, un gel, una cápsula de gel, un comprimido, una loción, una crema, un pulverizador, una emulsión o un polvo.
260. También se desvela una microcápsula, que comprende una aglomeración de microcápsulas primarias y una sustancia de carga, teniendo cada una de las microcápsulas individuales primarias un armazón primario, en donde la sustancia de carga comprende cualquiera de las composiciones descritas anteriormente, y se encapsula mediante el armazón primario, y en donde la aglomeración se encapsula mediante un armazón externo. El armazón primario y/o el armazón externo pueden comprender un tensioactivo, gelatina, polifosfato, polisacárido o una mezcla de los mismos. El armazón primario y/o el armazón externo también pueden comprender gelatina de tipo B, polifosfato, goma arábiga, alginato, quitosán, carragenano, pectina, almidón, almidón modificado, alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina, ovalbúmina, polisorbítón, maltodextrina, ciclodextrina, celulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, proteína láctea, proteína del trigo, proteína de la soja, proteína de la colza, albúmina, gelatina de kósher, gelatina no de kósher, gelatina Halal, gelatina no Halal o una mezcla de los mismos. El armazón primario y/o el armazón externo también pueden comprender un coacervado complejo, gelatina de tipo A, gelatina de pescado, una gelatina con un número de Bloom de aproximadamente 0 a aproximadamente 300, una gelatina con un número de Bloom de aproximadamente 0 a aproximadamente 50, una gelatina con un número de Bloom de aproximadamente 51 a aproximadamente 300, una gelatina con un número de Bloom de aproximadamente 0, aproximadamente 210, aproximadamente 220 o aproximadamente 240, un coacervado de gelatina y polifosfato.
261. La sustancia de carga de las microcápsulas desveladas puede comprender aceite de *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, o una mezcla de los mismos. La sustancia de carga puede ser de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 90 % o del 50 % a aproximadamente el 70 % en peso de la microcápsula.
262. El armazón externo de las microcápsulas desveladas pueden tener un diámetro promedio de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 2.000 μm , de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 1.000 μm , de aproximadamente 30 μm a aproximadamente 80 μm , de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 10 μm , o de 0,1 μm a aproximadamente 5 μm .
263. También se desvela un suplemento nutricional que comprende cualquiera de las composiciones, dispositivos de administración o microcápsulas descritos anteriormente. Los suplementos nutricionales desvelados pueden estar en la forma de un comprimido, una cápsula de gel, una cápsula, un líquido o un jarabe.
264. También se desvela un alimento que comprende cualquiera de las composiciones, dispositivos de administración o microcápsulas descritos anteriormente. El alimento puede ser un producto horneado, una pasta, un producto cárnico, un producto lácteo congelado, un producto de leche, un producto de queso, un producto de huevo, un condimento, una mezcla de sopa, un producto de aperitivo, un producto de frutos secos, un producto de proteína vegetal, un caramelo duro, un caramelo blando, un producto avícola, un zumo de frutas procesado, un azúcar granulado, una salsa, un jugo de carne, un jarabe, una barrita nutritiva, una bebida, un polvo seco de bebida, un jamón o gelatina, una fórmula para lactantes o un alimento para bebés. El alimento también puede ser un producto de pesado, un alimento para animales de compañía, un pienso para ganado o para acuicultura. El alimento también puede ser pan, tortillas, cereal, salchicha, pollo, helado, yogur, leche, aderezo de ensalada, salvado de arroz, zumo de frutas, un polvo seco de bebida, rollos, galletas con pepitas, galletas saladas, pasteles de frutas o tartas.
265. También se desvela un método de administración de una composición a un sujeto, que comprende administrar al sujeto cualquiera de las composiciones, dispositivos de administración, microcápsulas o productos alimenticios descritos anteriormente. El sujeto puede ser un mamífero. El sujeto también puede ser un ser humano.
266. También se desvela el uso de cualquiera de las microcápsulas descritas anteriormente y para preparar un medicamento para administrar una sustancia de carga a un sujeto.

267. También se desvela un método de reducción de los niveles de colesterol, de los niveles de triglicéridos o una combinación de los mismos en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de administración, microcápsulas, suplementos nutricionales o alimentos descritos anteriormente.

5

268. También se desvela un método de complementar elementos traza esenciales en un sujeto, comprendiendo el método la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de administración, microcápsulas, suplementos nutricionales o alimentos descritos anteriormente, en donde la composición, el dispositivo de administración, la microcápsula, el suplemento y el alimento comprende un elemento

10

269. También se desvela un método de mejora de la sensibilidad a la insulina en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de administración, microcápsulas, suplementos nutricionales o alimentos descritos anteriormente.

15

270. También se desvela un método de reducción de la hiperglucemia en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de administración, microcápsulas, suplementos nutricionales o alimentos descritos anteriormente.

20

271. También se desvela un método de reducción de la hipercolesterolemia en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de administración, microcápsulas, suplementos nutricionales o alimentos descritos anteriormente.

25

272. También se desvela un método de reducción de la grasa corporal en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de administración, microcápsulas, suplementos nutricionales o alimentos descritos anteriormente.

30

273. También se desvela un método de promover la pérdida de peso en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de administración, microcápsulas, suplementos nutricionales o alimentos descritos anteriormente.

35

274. También se desvela un método de tratamiento o prevención de la diabetes en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de administración, microcápsulas, suplementos nutricionales o alimentos descritos anteriormente.

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

40

276. También se desvela un alimento que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1. El alimento puede ser un producto horneado, una pasta, un producto cárnico, un producto lácteo congelado, un producto de leche, un producto de queso, un producto de huevo, un condimento, una mezcla de sopa, un producto de aperitivo, un producto de frutos secos, un producto de proteína vegetal, un caramelo duro, un caramelo blando, un producto avícola, un zumo de frutas procesado, un azúcar granulado, una salsa, un jugo de carne, un jarabe, una barrita nutritiva, una bebida, un polvo seco de bebida, un jamón o gelatina, una fórmula para lactantes o un alimento para bebés. El alimento también puede ser un producto de pesado o un alimento para animales de compañía, un pienso para ganado o para acuicultura. El alimento también puede ser pan, tortillas, cereal, salchicha, pollo, helado, yogur, leche, aderezo de ensalada, salvado de arroz, zumo de frutas, un polvo seco de bebida, rollos, galletas con pepitas, galletas saladas, pasteles de frutas o tartas.

50

277. También se desvela un método de reducción de los niveles de colesterol, de los niveles de triglicéridos o una combinación de los mismos en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1, un suplemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1, un dispositivo de administración que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1, o un alimento que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1.

60

278. También se desvela un método de complementar elementos traza esenciales en un sujeto, el método que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la

65

- secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1, un suplemento nutricional que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1, un dispositivo de administración que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1, o un alimento que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1.
- 10 285. También se desvela una formulación farmacéutica que comprende una composición que comprende un microorganismo eucariota que tiene una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 94 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1.

VI. EJEMPLOS

- 15 286. Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de cómo se preparan y evalúan los compuestos, las composiciones, los artículos, los dispositivos y/o los métodos reivindicados en el presente documento, y se pretende que sean puramente ejemplares y no pretenden limitar la divulgación. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero algunos errores y desviaciones deberían tenerse en cuenta. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes por peso, la temperatura está en °C o está a temperatura ambiente y la presión es o está cerca de la atmosférica.

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

- 25 287. Se emplearon técnicas clásicas de purificación de cepas bacterianas con el fin de aislar la ONC-T18 de las hojas de mangle recolectadas en Advocate Harbor, Nueva Escocia. La ONC-T18 se cultivó de forma seriada a 25 °C en un medio nutritivo de agar que contiene 5 g l⁻¹ de glucosa, 2 g l⁻¹ de peptona, 2 g l⁻¹ de extracto de levadura y 15,0 g l⁻¹ de agar para 1 litro de agua de mar filtrada a 0,2 µm hasta que se aseguró su pureza. Posteriormente, se preparó un medio líquido que contiene agua de mar artificial al 15 % (marina trófica), suplementado con una fuente de nitrógeno y de carbono que es 60 g l⁻¹ de glucosa y 10 g l⁻¹ de extracto de levadura, respectivamente. Este medio (50 ml de medio en matraces de 250 ml) se inoculó con ONC-T18, después se incubó a 25 °C y se aireó mediante agitación a 120 rpm.
- 30 288. Se separó la ONC-T18 del medio mediante centrifugación, después se lavó la biomasa celular, se volvió a centrifugar y se liofilizó hasta su finalización. Después se pesó la biomasa celular con el fin de determinar las eficacias del cultivo con valores registrados de biomasa por litro del medio. La extracción de la fracción lipídica de la biomasa y la posterior separación del éster metílico del ácido graso se realizó usando el método de Bligh y Dyer. La transesterificación se realizó transfiriendo material celular liofilizado a un tubo de ensayo con rosca de 10 ml y añadiendo HCl metanólico al 10 % y diclorometano al tubo, permitiendo que la mezcla reaccionase durante 2 horas a 90 °C. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se extrajeron después mediante la adición de hexano : cloroformo y el componente de éster metílico se midió mediante cromatografía de gases (FID) con el fin de determinar el perfil de ácidos grasos de cada microorganismo u la comunidad simbiótica (ONC-T18). Se determinaron las concentraciones de cada éster metílico de ácidos grasos (C14:0 a C22:6) mediante comparación de las áreas del pico de GC de dos patrones internos (C19:0 y C23:0) añadidas en cantidades definidas tanto al comienzo (C23:0) y al final (C19:0) del proceso de transesterificación. La cantidad total de ácidos grasos por gramo de biomasa celular seca y el porcentaje de contenido de cada ácido graso calculado usando este método se muestra en la figura 2.
- 35 289. Del análisis de estos resultados, en conjunto con los mostrados en la Figura 1, se puede ver que la ONC-T18 demostró la capacidad para producir cantidades aumentadas de DHA, así como cantidades notables de EPA y DPA. ONC-T18, produce aproximadamente el 25 % de DHA, el 80 % de DPA (n-6) y el 1,0 % de EPA en este medio de fermentación no optimizado. Posteriormente, se eligió la ONC-T18 basándose en una combinación de características económicamente deseables: (1) capaz de crecimiento heterotrófico máximo (en comparación con las cepas de control); (2) contiene alto porcentaje de ácidos grasos omega-3 altamente insaturados; (3) capaz de crecer sobre nutrientes de bajo costo; (4) termotolerable y (5) eurihalino.
- 40 290. Además, se compararon múltiples cepas diferentes de microbios productores de aceites con la ONC-T18. Se cree que cada uno de estos microbios comprende un Thraustochyrid, y produce aceite en las cantidades mostradas en la Tabla 3.
- 45 50 55

- 60

Tabla 3, []= mg/g

	[] DHA	[] EPA	Lípido total	Peso (g)
MYA-1381	127,96	5,52	216,37	1,80
ATCC-20891	37,97	7,14	67,34	1,30

(continuación)

	[] DHA	[] EPA	Lípido total	Peso (9)
ONC-T01	5,18	7,76	50,82	0,40
ONC-T02	31,84	4,20	52,88	0,50
ONC T03	24,87	6,97	75,00	0,60
ONC-T04	14,39	4,49	41,74	0,90
ONC-T05	11,37	3,97	34,89	0,10
ONC-T06	27,80	6,71	63,87	0,10
ONC-T07	33,02	5,49	61,81	0,50
ONC-T08	24,48	4,83	53,35	0,80
ONC-T09	63,82	4,25	109,12	0,80
ONC-T10	22,22	4,93	40,99	0,10
ONC-T11	18,37	21,25	214,98	0,80
ONC-T12	57,96	9,03	96,26	0,60
ONC-T13	12,90	4,57	39,52	1,30
ONC-T14	15,99	5,16	36,46	0,50
ONC-T15	15,53	5,11	37,72	0,50
ONC-T16	18,02	5,55	42,12	0,50
ONC-T17	36,43	4,34	94,26	0,30
ONC-T18	83,63	2,76	321,14	2,30
ONC-T19	34,71	8,07	66,14	0,60
ONC-T20	19,28	6,94	66,74	0,10
ONC-T21				
ONC-T22	22,72	3,26	47,58	0,60
ONC-T23				
ONC-T24	11,73	3,56	33,56	0,70
ONC-T25	26,99	6,11	45,67	0,60
ONC-T26	14,50	6,43	39,22	0,60
ONC-T27	26,83	7,75	61,87	0,70
ONC-T28	16,62	6,02	38,28	0,90
ONC-T29	14,67	4,91	34,48	0,80
ONC-T30	16,56	5,42	81,88	0,80
ONC-T31	13,36	5,74	44,86	0,30
ONC-T32	19,12	6,56	53,29	0,20
ONC-T33				
ONC-T34	18,92	5,98	53,36	0,60
ONC-T35				
ONC-T36				
ONC-T37	35,69	11,06	82,73	0,10
ONC-T38	22,73	10,94	51,56	0,10
ONC-T39				
ONC-T40	26,87	8,83	67,87	0,80
ONC-T41	22,85	6,65	52,63	0,50
ONC-T42	33,65	9,22	83,93	0,80
ONC-T43	12,49	3,25	37,93	0,80
ONC-T44	11,71	2,93	55,05	1,10
ONC-T45	26,08	7,95	70,45	0,70
ONC-T46	33,34	6,27	63,76	0,30

(continuación)

	[] DHA	[] EPA	Lípido total	Peso (9)
ONC-T47	10,01	4,77	68,02	0,70
ONC-T48	26,23	3,95	69,06	0,60
ONC-T49	16,64	4,89	39,76	0,30
ONC-T50	13-64	4,56	40,30	1,00
ONC-T51				
ONC-T52	26,57	4,55	41,36	0,60
ONC-T53	11,40	3,56	29,20	0,70
ONC-T54	10,34	3,18	29. 31	0,70
ONC-T55				
ONC-T56				
ONC-T57				
ONC-T58	10,30	3,13	27,10	0,70
ONC-T59				
ONC-T60	27,71	7,01	66,84	0,30
ONC-T61	15,72	5,62	52,56	0,40
ONC-T62				
ONC-T63	20,17	8,25	62,58	0,60
ONC-T64	12,16	2,97	44,73	1,10
ONC-T65				
ONC-T66				
ONC-T67	23,71	5,63	43,24	0,50
ONC-T68	22,72	6,10	41,37	0,50

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

2. Ejemplo 2 Identificación de la especie eucariota *Thraustochytrium* de ONC-T18 usando técnicas genéticas

292. El uso de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los cebadores que se dirigen al gen de ARN ribosómico 18S, que es universal para todas las especies eucariotas, fue posible generar productos de PCR de los genes estructurales del microorganismo eucariota aislado de ONC-T18 (de acuerdo con el ejemplo 1). Después se secuenciaron los productos de PCR y se designaron SEQ ID NO:1 para la especie eucariota (véase la figura 2).

293. La comparación de la SEQ ID NO:1 con las secuencias de ácido nucleico halladas en la base de datos genómica, GenBank (National Centre for Biotechnology Information, National Institute of Health, Bethesda, MD, EE.UU.) usando el algoritmo BLAST (herramienta básica de búsqueda de alineación local) identificó que la SEQ ID NO:1 estaba muy relacionada con *Thraustochytrium striatum* [AF265338] (similitud del 97,5 %).

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

Secuencias que producen alineaciones significativas:	Puntuación (bits)	E Valor
gi 14279326 gb AF265338.1 <i>Thraustochytrium striatum</i> small subun...	2126	0.0
gi 50508012 dbj AB183657.1 <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11072 gen...	2121	0.0
gi 54778780 gb AY773276.1 <i>Thraustochytriidae</i> sp. FJN-10 18S rib...	1857	0.0
gi 50508019 dbj AB183664.1 <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11093 gen...	1828	0.0
gi 38524571 dbj AB126669.1 <i>Thraustochytrium</i> sp. CHN-1 gene for...	1748	0.0
gi 24817740 dbj AB073308.2 <i>Thraustochytriidae</i> sp. N1-27 gene fo...	1628	0.0
gi 50508018 dbj AB183663.1 <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11092 gen...	1257	0.0
gi 50508017 dbj AB183662.1 <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11091 gen...	1257	0.0

ES 2 729 976 T3

(continuación)

Secuencias que producen alineaciones significativas:	Puntuación (bits)	E Valor
gi 50508015 dbj AB183660.1 Thraustochytriidae sp. MBIC11084 gen...	1255	0.0
gi 50508011 dbj AB183656.1 Thraustochytriidae sp. MBIC11070 gen...	1255	0.0
gi 50508016 dbj AB183661.1 Thraustochytriidae sp. MBIC11086 gen...	1249	0.0
gi 15823623 dbj AB052555.1 Schizochytrium sp. KH105 gene for 18...	1245	0.0
gi 50508013 dbj AB183658.1 Thraustochytriidae sp. MBIC11075 gen...	1227	0.0
gi 50508010 dbj AB183655.1 Thraustochytriidae sp. MBIC11067 gen...	1213	0.0
gi 54303872 gb AY758384.1 Schizochytrium sp. FJU-512 18S riboso...	1158	0.0
gi 14279326 gb AF265338.1 AF265338 Thraustochytrium striatum sma...	1106	0.0
gi 6492308 gb AF155209.1 AF155209 Labyrinthulid quahog parasite...	765	0.0
gi 16209570 gb AY052644.1 Labyrinthulid quahog parasite QPX sma...	757	0.0
gi 9755031 gb AF261664.1 AF261664 Labyrinthulid quahog parasite...	757	0.0
gi 58176547 gb AY870336.1 Thraustochytriidae sp. Fng1 18S ribos...	735	0.0
gi 67624914 dbj AB191425.1 Uncultured eukaryote gene for small...	724	0.0
gi 5509891 dbj AB022112.1 Thraustochytrium striatum gene for 18...	724	0.0
gi 561884 gb L34054.1 ULKRRE Ulkenia profunda 18S ribosomal RNA...	702	0.0
gi 50508014 dbj AB183659.1 Thraustochytriidae Sp, MBIC11077 gen...	686	0.0
gi 50508008 dbj AB183653.1 Thraustochytriidae sp. MBIC11060 gen...	686	0.0
gi 50508009 dbj AB183654.1 Thraustochytriidae sp. MBIC11063 gen...	658	0.0
gi 41391986 emb AJ535188.1 Pleurosira cf. laevis 18S rRNA gene,...	634	e-178
gi 28316562 gb AF525670.1 Pleurosira laevis small subunit ribos...	634	e-178
gi 5509889 dbj AB022110.1 Thraustochytrium aureum gene for 18S...	634	e-178
gi 561883 gb L34668.1 TUKRRE Thraustochytrium kinnei 18S ribosom...	628	e-176
gi 5509894 dbj AB022115.1 Ulkenia radiata gene for 18S rRNA	624	e-175
gi 5509893 dbj AB022114.1 Ulkenia profunda gene for 18S rRNA	624	e-175
gi 5509895 dbj AB022116.1 Ulkenia Visurgensis gene for 18S rRNA	603	e-169
gi 90275S3 gb AF257315.2 Thraustochytriidae sp. BS2 18S ribosom...	589	e-164
gi 5509886 dbj AB022107.1 Schizochytrium limacinum gene for 18S...	581	e-162
gi 48727879 gb AY620254.1 Metromonas simplex clone TC-S small s...	S71	e-159
gi 33309650 gb AF411282.1 Unidentified cercozoan 18S ribosomal...	569	e-158
gi 28076844 gb AF530543.1 Uncultured eukaryote clone AT4-68 18S...	531	e-147
gi 30144485 gb AY256273.1 Uncultured eukaryote isolate E170 sma...	517	e-143
gi 30144529 gb AY256317.1 Uncultured eukaryote isolate D107 sma...	507	e-140
gi 14579477 gb AF363207.1 Eukaryote marine clone ME1-24 18S rib...	505	e-139
gi 39578677 gb AY426906.1 Uncultured marine eukaryote clone BL0...	504	e-139
gi 39981869 gb AY381216.1 Uncultured eukaryote clone BL010625.3...	S04	e-139
gi 73533408 gb DQ103811.1 Uncultured marine eukaryote clone M4_...	504	e-139
gi 73533402 gb DQ103805.1 Uncultured marine eukaryote clone M3_...	504	e-139
gi 73533389 gb DQ103792.1 Uncultured marine eukaryote clone M2_...	504	e-139
gi 73533382 gb DQ103785.1 Uncultured marine eukaryote clone M1_...	504	e-139
gi 30144534 gb AY256322.1 Uncultured eukaryote isolate P179 sma...	504	e-139
gi 24817738 dbj AB073305.2 Thraustochytriidae sp. H1-14 gene fo...	504	e-139
gi 30268157 emb AJ519935.1 AST519935 Aplanochytrium stocchini p...	504	e-139
gi 58531881 gb AY882S27.1 Uncultured marine eukaryote clone T41...	504	e-139
gi 463127 gb L27634.1 LADDLRRNA Labyrinthuloides minuta 16S-like...	504	e-139
gi 39981839 gb AY381186.1 Uncultured eukaryote clone OR000415.1...	502	e-138
gi 39981824 gb AY381171.1 Uncultured eukaryote clone HE001005.1...	502	e-138
gi 18026024 gb AY046848.1 Uncultured eukaryote isolate C3_E019...	502	e-138
gi 18026022 gb AY046846.1 Uncultured eukaryote isolate C3_E017...	502	e-138
gi 18026014 gb AY046838.1 Uncultured eukaryote isolate C3_E008...	502	e-138
gi 18026008 gb AY046832.1 Uncultured eukaryote isolate C3_E002...	502	e-138
gi 18025980 gb AY046804.1 Uncultured eukaryote isolate C2_E014...	502	e-138
gi 18025969 gb AY046793.1 Uncultured eukaryote isolate C2_E002...	502	e-138

(continuación)

Secuencias que producen alineaciones significativas:	Puntuación (bits)	E Valor
gi 18025801 gb AY046625.1 Uncultured eukaryote isolate C1_E024...	502	e-138
gi 67624915 dbj AB191426.1 Uncultured eukaryote gene for small...	502	e-138
gi 67624913 dbj AB191424.1 Uncultured eukaryote gene for small...	502	e-138
gi 67624912 dbj AB191423.1 Uncultured eukaryote gene for small...	502	e-138
gi 39981861 gb AY381208.1 Uncultured eukaryote clone BL010320.1...	500	e-138
gi 14349249 dbj AB052556.1 Thraustochytrium sp. KK17-3 gene for...	500	e-138
gi 20218962 dbj AB073307.1 Thraustochytriidae sp. M4-103 gene f...	498	e-137
gi 59709960 gb AY916582.1 Uncultured eukaryote clone Zeuk76 18S...	496	e-136
gi 18025960 gb AY046784.1 Uncultured eukaryote isolate A3_E043...	496	e-136
gi 18025789 gb AY046613.1 Uncultured eukaryote isolate C1_E009...	496	e-136
gi 30144548 gb AY256336.1 Uncultured eukaryote isolate D278 sma...	496	e-136
gi 2138106 gb U59933.1 U59933 Scybalium jamaicense 18S ribosomal...	496	e-136
gi 53828186 gb AY744948.1 Phytophthora palmivora isolate 88108...	494	e-136
gi 60687349 gb AY821976.1 Uncultured oomycete clone CV1_B2_5 sm...	494	e-136
gi 60687347 gb AY821974.1 Uncultured Phytophthora-like oomycete...	494	e-136
gi 60687342 gb AY821969.1 Uncultured oomycete clone CV1_B1_49 s...	494	e-136
gi 39981870 gb AY381217.1 Uncultured eukaryote clone BL010625.3...	494	e-136
gi 39981864 gb AY381211.1 Uncultured eukaryote clone BL010320.2...	494	e-136
gi 39981860 gb AY381207.1 Uncultured eukaryote clone BL010320.6...	494	e-136
gi 39981844 gb AY381191.1 Uncultured eukaryote clone BL000921.1...	494	e-136
gi 18026046 gb AY046870.1 Uncultured eukaryote isolate C3_E044...	494	e-136
gi 18026039 gb AY046863.1 Uncultured eukaryote isolate C3_E035...	494	e-136
gi 18026031 gb AY046855.1 Uncultured eukaryote isolate C3_E026...	494	e-136
gi 42412527 gb AY486144.1 Pythium insidiosum 18S ribosomal RNA...	494	e-136
gi 73533425 gb DQ103828.1 Uncultured marine eukaryote clone M2_...	494	e-136
gi 34576227 gb AY129064.1 Uncultured marine eukaryote UEPAC45p4...	494	e-136
gi 30144522 gb AY256310.1 Uncultured eukaryote isolate D85 smal...	494	e-136
gi 30144521 gb AY256309.1 Uncultured eukaryote isolate D84 smal...	494	e-136
gi 30144518 gb AY256306.1 Uncultured eukaryote isolate D79 smal...	494	e-136
gi 30144475 gb AY256263.1 Uncultured eukaryote isolate E106 sma...	494	e-136
gi 30144473 gb AY256261.1 Uncultured eukaryote isolate E94 smal...	494	e-136
gi 21954246 gb AY116220.1 Uncultured eukaryote clone ANT12-26 1...	494	e-136
gi 41393027 emb AJ535176.1 LMI535176 Leptocylindrus minimum 18S...	494	e-136
gi 53693111 gb AY742743.1 Phytophthora tropicalis isolate. 129F-...	494	e-136
gi 53693108 gb AY742759.1 Pythium vexans isolate Pyv6-2 18S rib...	494	e-136
gi 53693105 gb AY742756.1 Pythium splendens isolate 117 18S rib...	494	e-136
gi 53693104 gb AY742755.1 Pythium aphanidermatum 18S ribosomal...	494	e-136
gi 53693097 gb AY742748.1 Phytophthora capsici isolate 98110 18...	494	e-136
gi 53693096 gb AY742747.1 Phytophthora tropicalis isolate 23047...	494	e-136
gi 53693094 gb AY742745.1 Phytophthora palmivora isolate 8829 1...	494	e-136
gi 58531862 gb AY882508.1 Uncultured marine eukaryote clone T53...	494	e-136

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

295. La producción de aceites de origen microbiano (o unicelular) depende de una variedad de variables del proceso, tales como el nivel de inóculo inicial, el tipo de sustrato, la composición de los medios, la temperatura y el pH. En concreto, la producción de ácidos grasos altamente insaturados usando las cepas de *Traustochytridos*, presenta una correlación directa entre la biomasa y la producción de ácidos grasos. Por consiguiente, un entendimiento de las necesidades básicas o la optimización de parámetros es un factor importante en el logro del resultado máximo. Por lo tanto, con el fin de determinar el mejor medio para la producción de elevadas cantidades de ácidos grasos, se realizaron experimentos iniciales de optimización de la biomasa. En concreto, el método de Taguchi desarrollado recientemente (Joseph J and Piganatiells JR, IIE Trans 20:247-254, 1998), basado en ensayos ortogonales, se usó con el fin de determinar la configuración del medio óptima para una elevada densidad óptica (directamente relacionada con la producción de biomasa). En este caso, se usó el método de Taguchi para comprender los efectos acumulativos de las variables que poseen un gran impacto sobre la producción de la biomasa. Las variaciones de nitrógeno (extracto de

levadura, peptona, L-glutamato), carbono (glucosa) y concentración de sal (sal de mar artificial) tuvieron efectos sobre la producción de biomasa. Por lo tanto, se preparó una variedad de medios líquidos con cantidades variables de extracto de levadura, peptona y L-glutamato (0, 4, 10, 20, 50 g l⁻¹) en relación con las cantidades variables de glucosa y solución de sal marina (5, 40, 100, 160, 200 g l⁻¹ y 0, 6, 20, 30, 40 g l⁻¹, respectivamente). Las concentraciones se calcularon de acuerdo con una matriz ortogonal L²⁵ de tal forma que el medio de nitrógeno de elección se discernió mediante el análisis de la proporción de señal frente a ruido (SNL) a las 48 y 120 horas, usando la siguiente fórmula:

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

10 donde, n = número de niveles e y = rendimiento (DDO promedio de experimentos por triplicado).

296. Los resultados de estos experimentos (que se dirigen específicamente a consideraciones de biomasa), tal como se muestra en la figura 2 a continuación, demostraron que la tasa de utilización de nitrógeno por ONC-T18 en relación con la densidad óptica (DO₆₀₀) era la peptona, después el extracto de levadura seguido por L-glutamato. Sin embargo, basándose en el máximo crecimiento, las mejores fuentes de nitrógeno para el aumento de la producción de biomasa fueron el extracto de levadura, después la peptona, seguido por L-glutamato. Además, mediante el uso de experimentos similares con variaciones en la glucosa y en la salinidad (concentración de sal marina), la composición del medio óptima y más barata para la producción de biomasa de ONC-T18 estaba dentro de un medio que comprende 2 g l⁻¹ de extracto de levadura, 8 g l⁻¹ de MSG, 60 g l⁻¹ de glucosa y 6 g l⁻¹ de sal marina.

20

4. Ejemplo 4: Producción óptima de ácido docosahexaenoico (DHA) por la cepa ONC-T18

297. Se prepararon medios que consistían en una fuente de nitrógeno (bien peptona, extracto de levadura, L-glutamato (MSG) o combinaciones de estos) y una fuente de carbono (glucosa) en una solución salina (agua de mar artificial), con el fin de determinar la mejor composición de los medios para la producción óptima de biomasa y DHA de forma similar a la descrita en el Ejemplo 3 (mostrado en la Tabla 4). Tras el cultivo a 25 °C y 130 rpms durante 3 días, se determinó la biomasa, el total de ácidos grasos por litro de medio, el porcentaje del contenido de ácidos grasos por peso, el porcentaje del contenido de DHA en el total de ácidos grasos y la cantidad de DHA por litro de medio mediante cromatografía de gases según el método descrito en el ejemplo 1, y en el presente documento, y se muestran en la Tabla 4 a continuación.

298. En este caso, se confirmó el DHA mediante comparación con patrones conocidos de DHA usando la cromatografía de gases, la espectrometría de masas y los métodos de bloqueo de picos. Los hallazgos del paquete experimental ❶, en donde se investigaron las variaciones en formas de nitrógeno tanto naturales como orgánicas, mostraron que la composición óptima de los medios debería contener entre 4,0 y 6,0 g l⁻¹ tanto de extracto de levadura como de L-glutamato para la producción óptima de biomasa y DHA. El paquete experimental ❷, por otro lado, que investigó cambios en la composición de sodio añadida al medio mostró una producción óptima de DHA y una producción de biomasa cuando se usó sal marina artificial. Además, el paquete experimental ❸, en el que varió la concentración de sodio en el medio, representó los máximos para la producción de DHA y biomasa entre el 5 y el 15 % de agua de mar artificial l⁻¹ de dH₂O. Los resultados del paquete experimental ❹, en donde se evaluaron las variaciones en los niveles de glucosa, demostraron que el intervalo de 40 a menos de 160 g l⁻¹ se tradujo en una producción óptima de biomasa y DHA. Finalmente, los resultados del paquete experimental ❺ indican que ONC-T18 produjo valores equivalentes para tanto la biomasa celular como la concentración de DHA, cuando se usó glucosa o glicerol como fuentes de carbono.

45

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

Exp. N.º	Fuentes de carbono		Tipos de sal		Fuentes de nitrógeno			Ácidos grasos totales (g l ⁻¹)	Porcentaje de ácidos grasos (% en peso)	Porcentaje del contenido en DHA (% en peso)	Cantidad de DHA (g l ⁻¹)
	Fuente de carbono usada	Cantidad añadida (g l ⁻¹)	Mezcla de sal usada	Cantidad añadida (% de salinidad)	Extracto de levadura (g l ⁻¹)	MSG (g l ⁻¹)					
①	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	7,7	34,53	20,20	1,5579	
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	8,0	2,0	10,0	44,01	17,49	1,7156	
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	6,0	4,0	11,5	50,69	16,23	1,8624	
	Glucosa	66,0	Sal marina	15,0	4,0	6,0	16,9	69,07	24,19	4,0877	
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	2,0	8,0	21,3	81,73	20,99	4,4752	
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	0,0	10,0	0,15	1,97	28,81	0,0426	
②	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	13,2	58,92	31,44	4,1362	
	Glucosa	60,0	NaCl	15,0	10,0	0,0	9,6	63,75	38,45	3,7009	
	Glucosa	60,0	NaSO ₄	15,0	10,0	0,0	0,05	1,41	20,14	0,0109	
③	Glucosa	60,0	Sal marina	5,0	10,0	0,0	14,6	59,23	31,44	4,6004	
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	10,8	51,01	26,17	2,8144	
	Glucosa	60,0	Sal marina	37,5	10,0	0,0	15,9	69,32	25,32	4,0194	
	Glucosa	60,0	Sal marina	75,0	10,0	0,0	10,8	61,02	25,25	2,7356	
	Glucosa	60,0	Sal marina	100,0	10,0	0,0	11,8	68,21	24,02	2,8290	
	Glucosa	60,0	Sal marina	125,0	10,0	0,0	11,2	59,63	22,56	2,5256	
④	Glucosa	5,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	0,63	5,21	29,18	0,1844	
	Glucosa	20,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	4,06	29,59	24,01	0,9752	
	Glucosa	40,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	9,91	59,39	23,88	2,3665	
⑤	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	10,76	51,01	26,17	2,8144	
	Glucosa	100,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	12,79	69,50	31,55	4,0344	
	Glucosa	160,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	1,00	9,40	30,01	0,3013	
⑤	Glucosa	5,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	0,62	12,74	29,86	0,1866	
	Glicerol	5,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	0,52	18,84	35,07	0,1836	

5. Ejemplo 5: Tiempo óptimo para la recolección de ONC-T18 para la máxima producción de DHA

299. Se cultivó ONC-T18 en la misma composición y condiciones de los medios que las mostradas en el ejemplo 1. En este caso en particular es de interés el tiempo en el que se debería recolectar la ONC-T18 con el fin de obtener las máximas cantidades de DHA, DPA y EPA así como tener en cuenta el tiempo necesario para obtener dichas cantidades (véase la figura 3).

300. Los resultados experimentales del transcurso del tiempo mostraron que el tiempo óptimo para recolectar la ONC-T18 para la producción óptima de DHA en matraz y biorreactor varió entre 3 y 5 días, respectivamente.

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

301. La fracción total de lípidos de ONC-T18 se extrajo usando un método de Bligh y Dyer modificado. En concreto, se rehidrataron 2,0 g de biomasa celular seca durante toda la noche a 4 °C en 8 ml de H₂O destilada. Se añadieron 30 ml de metanol:cloroformo (2:1 vol/vol) a la mezcla y se agitó suavemente a 120 rpm durante 20 min, con el sobrenadante resultante decantado. Después se resuspendió el sedimento en metanol:cloroformo:H₂O (2:1:0,8 vol/vol/vol) y el proceso se repitió con sobrenadantes que se agruparon y se movieron a un embudo de decantación. Después se añadieron 5 ml de cloroformo y 5 ml de H₂O al embudo de decantación, dando como resultado la formación de un sistema líquido de dos fases. Tras el mezclado vigoroso en el embudo de decantación, se eliminó la capa de cloroformo, se concentró bajo gas N₂, se resuspendió en cloroformo y se almacenó a -20 °C bajo análisis. Aproximadamente 1 µl de la fracción de lípido total se colocó en gotas sobre múltiples chromarods, se separaron y se analizaron usando un instrumento latroscan MK6 TLC/FID.

302. El análisis de los resultados muestra que el componente de los ácidos grasos que produce la ONC-T18 en fermentación heterotrófica es casi totalmente de triglicéridos (al menos el 95 %) en la naturaleza. Además de la fracción neutra de ácidos grasos mencionada anteriormente. La ONC-T18 también produce una fracción discernible de carotenoide y fosfolípido. En un aislamiento posterior de la fracción del fosfolípido, primero a través de una combustión al 50 % y después una combustión al 75 % seguido por una separación a base de disolventes, se determinó que estaba presente una fracción de fosfolípido grande y compleja. Los resultados demostraron la presencia de los componentes fosfatidilcolina, fosfatidil serina y ácido fosfatídico en la muestra.

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

303. El eucariota, ONC-T18, se cultivó usando las condiciones y el medio tal como se mencionó anteriormente. La biomasa celular resultante tras la fermentación heterotrófica se recolectó mediante centrifugación, filtración o decantación. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 3800 x g y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato. La biomasa celular (fresca o liofilizada) se suspendió en un volumen de 10 x de acetona, se agitó durante 5 minutos a 200 rpm, se centrifugó a 3800 x g durante 5 minutos y se concentró a sequedad por evaporación de N₂. Después se resuspendieron después inmediatamente en una cantidad mínima de acetona al 10 % en hexano y se almacenó a -20 °C hasta el análisis de HPLC. Después se llevó a cabo la identificación de los extractos de carotenoide en un Agilent 1100 HPLC (Agilent, Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con un detector de longitud de onda variable configurado a 470 nm. Las muestras se inyectaron a través de una columna Symmetry C18 guard (Waters, Milford, IA, EE.UU.) a una columna de fase inversa Bondclone C18 (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.; partículas de 10 µm; 3,9 x 300 mm i.d.). El volumen de inyección fue de 10 µl y se usó un flujo de 1,00 ml/min de acetona al 10 % en hexano durante un período de 25 minutos. Los datos cuantitativos de carotenoides se basaron en la comparación del área del pico con patrones conocidos (en este caso, astaxantina, cantaxantina, β-criptoxantina, zeaxantina, equinonona y β-caroteno; ChromaDex, Santa Ana, CA, EE.UU.). En ausencia de un patrón conocido tal como en el caso del carotenoide, fenicoxantina, se usó el área del pico de astaxantina para calcular sus concentraciones. La identidad del carotenoide se confirmó posteriormente mediante HPLC-MS usando un HPLC Waters equipado con una matriz de fotodiodos (Waters modelo 996) que lleva a un espectrómetro de masa Micromass ESI-Q-Tof (Waters, Milford, MA, EE.UU.). El análisis de HPLC de ONC-T18 posteriormente reveló la presencia de varios compuestos antioxidantes (entre 50 a 1250 mg kg⁻¹) dentro de la biomasa celular. Estos compuestos incluyeron los carotenoides antioxidantes astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equineona y beta-caroteno en el intervalo de 1 a 20 mg kg⁻¹, 0,25 a 10 mg kg⁻¹, 1 a 20 mg kg⁻¹ 1 a 20 mg kg⁻¹ y 1 a 200 mg kg⁻¹, respectivamente, así como varios compuestos polifenólicos flavonoides no identificados.

8. Ejemplo 8: Comparación con microorganismos conocidos

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

de acuerdo con la presente invención.

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

Microorganismo	Cantidad de biomasa celular (g l ⁻¹)	Porcentaje de contenido de lípidos (% g ⁻¹)	Porcentaje de contenido de DHA (% g ⁻¹)	Porcentaje de contenido de EPA (% g ⁻¹)	Porcentaje de contenido de DPA (% g ⁻¹)	DHA total (g l ⁻¹)	EPA total (mg l ⁻¹)	DPA total (mg l ⁻¹)
<i>Thraustochytrium</i> sp ATCC 20891	1,8	sin datos	12	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos
<i>Thraustochytrium</i> sp ATCC 20892	3	7	35	sin datos	sin datos	0,07	sin datos	sin datos
<i>Thraustochytrium</i> sp ATCC 26185	2,3	sin datos	41,9	3,1	10	sin datos	sin datos	sin datos
<i>T. aureum</i> ATCC 34304	4-5	8-20	24-51	3,6-9,3	sin datos	0,1-0,5	0,0001	sin datos
<i>T. roseum</i> ATCC 28210	8-17	18-25	50	sin datos	sin datos	0,6-2,1	sin datos	sin datos
<i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888	10,5	50	25-37	sin datos	sin datos	1,95	sin datos	sin datos
<i>S. aggregatum</i> ATCC 28209	1,4	1,7	6,0	6,1	sin datos	1	1	sin datos
<i>S. limacinum</i> SR21 MYA-1381	23-40	40-53,5	29,7-34	0,2-0,4	sin datos	3,0-7,2	0,08	sin datos
ONC-T18	25-55	45-80	24-34,2	0,1-2	6-10	4,6-13	0,2-0,8	0,9-3,8

5

305. Tal como se muestra en la Tabla 5, es evidente que, cuando se lleva a cabo el cultivo usando ONC-T18 de acuerdo con la presente invención, los valores de biomasa celular por litro de medio eran extremadamente altos en comparación con las otras cepas ensayadas. Además, de acuerdo con la presente invención, ONC-T18 tuvo un contenido porcentual muy alto de lípidos en comparación con las otras cepas mencionadas anteriormente. Además, de acuerdo con la presente invención, el contenido porcentual de DHA y DPA en ONC-T18 es extremadamente alto, con niveles de EPA que mostraron ser comparables con todas las cepas cribadas. Por tanto, parece que ONC-T18 tiene la capacidad para producir grandes cantidades de DHA, EPA y DPA en condiciones de fermentación como las mencionadas en el ejemplo 1.

15 9. Ejemplo 9: Información de fuente de carbono alternativa

306. Se ha demostrado que la ONV-T18 crece preferentemente en medios en donde las principales fuentes de nitrógeno son extracto de levadura, glutamato de sodio y/o peptona y la principal fuente de carbono es D-glucosa. Como resultado del perfil metabólico de la ONC-T18, se observó que el glicerol (fuente de carbono) también era una alternativa viable. Además, los flujos de residuos del procesamiento de aceites de pescado que contienen glicerol también se probaron para la aplicabilidad como alternativas de nutrientes a bajo coste. Se llevaron a cabo experimentos usando 200 ml de medios en matraces de 500 ml, cultivos a 25 °C durante 3 días, a 120 rpm en el caso del glicerol. El contenido en glicerol de dos productos residuales del procesamiento de aceites de pescado, GWW (lavado con agua de glicerol) y GAW (lavado con ácido de glicerol), constituyeron el 40 % en vol:vol del medio de 200 ml (ajustado a pH 6,5), mientras que el 6 % de glicerol se añadió a 200 ml de medio (peso:vol) como control.

Tabla 6. Contenido de ácidos grasos, biomasa y glicerol para el estudio de fuentes alternativas de carbono.

	Porcentaje (%) de ácidos grasos frente al contenido total de lípidos por peso					TFA (mg g ⁻¹)	Glicerol (g l ⁻¹)	Biomasa (g l ⁻¹)
	AA	EPA	DHA	DPA n-3	DPA n-6			
Glicerol al 6 % (peso:vol)	0,29	0,52	26,31	0,24	9,49	426,12	76,00	9,13
40 % de GAW (vol:vol)	0,37	1,32	19,69	0,42	6,36	294,55	68,59	5,94
40 % de GWW (vol:vol)	0,46	5,55	12,46	1,01	3,82	274,33	2,70	3,08

307. El análisis de estos resultados ha determinado que el uso de los componentes del flujo de residuos de aceite de

pescado, tal como los subproductos de glicerol, como fuentes de carbono para la fermentación a gran escala de ONC-T18 mientras que resultan en una cantidad reducida de ácido graso total, representan un contenido de DHA mantenido dentro de las células microbianas (figura 10).

5 10. Ejemplo 10: Multiplicador de peso de células secas

308. se puede cultivar *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 para la producción de aceites omega 3 en una variedad de configuraciones del reactor de hasta 100.000 litros. Todas las fermentaciones comienzan con la preparación de un inóculo del 10-20 % del volumen final, que se usa para establecer el cultivo de la fermentación. Las configuraciones
 10 iniciales del medio comprenden hasta 6 g/l de sal marina, 10 g/l de fuente de nitrógeno y 60 g/l de fuente de carbono, con adición a lotes alimentados de otros 75 g/l de fuente de carbono después de 24 a 36 horas de fermentación inicial durante 72 a 96 horas adicionales y tiene lugar en el intervalo de temperatura de 18-25 °C. Por ejemplo, usando el medio de 6 g/l de sal marina, 2 g/l de extracto de levadura, 8 g/l de L-glutamato y 60 g/l de D-glucosa (con una adición de 75 g/l añadida después de 36 horas), cultivado a 25 °C durante 96 horas, la ONC-T18 fue capaz de producir 40 g/l
 15 de peso de células secas (dcw, del inglés *dry cell weight*), el 80 % (dcw) del total de ácidos grasos (TFA)/fracción lipídica (entre C14:0 y C24:0) y el 30 % (TFA) de DHA. De manera similar, es posible aumentar el peso de las células secas al multiplicar los componentes de los medios de nitrógeno y carbono para lograr un efecto de multiplicación similar en la biomasa sin afectar los contenidos de TFA o DHA. Por ejemplo, usando el medio de 24 g/l de sal marina, 8 g/l de extracto de levadura, 32 g/l de L-glutamato y 300 g/l de D-glucosa, cultivado a 25 °C durante 312 horas, la
 20 ONC-T18 fue capaz de producir 80 g/l de peso de células secas (dcw), el 60 % (dcw) del total de ácidos grasos (TFA)/fracción lipídica (entre C14:0 y C24:0) y el 38 % (TFA) de DHA.

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

25 309. Se investigó el cultivo de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 sobre una variedad de fuentes de nitrógeno y de carbono de bajo costo. En concreto, se cultivaron 50 ml de ONC-T18 en matraces de 250 ml que contienen 6 g/l de sales marinas artificiales, durante 72 horas a 25 °C. Las concentraciones de las fuentes de carbono y de nitrógeno se muestran a continuación con 2 g/l de cada una de las fuentes de nitrógeno enumeradas, usadas en conjunto con 8 g/l
 30 de L-glutamato (con la excepción de la harina de pescado en donde se usaron 4 g). Las fuentes de carbono se cambiaron según se indica. Todos los experimentos se realizaron por triplicado; todas las extracciones para el análisis del éster metílico del ácido graso se realizaron por triplicado junto con las inyecciones de GC por triplicado.

310. Los resultados indican que *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 produce una biomasa óptima de células secas (es decir, mayor que los dos medios de control) cuando se cultivan en las fuentes de nitrógeno extracto de levadura EMD y harina de pescado. Por el contrario, se descubrió que el lípido era menos del control, mientras que el DHA fue óptimo usando licor de maíz fermentado y peptona de EMD. Finalmente, se descubrió que la fuente de carbono dextrosa aumenta el contenido en lípidos, mientras que la fructosa y la dextrosa producen un mayor contenido de DHA que los controles.

40

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

Medio (6 g/l de sal, cultivado a 72 horas, en cultivos de 50 ml)		C (g/l)	N (g/l)	dcw/ del medio (g)	Lípido (mg/g)	Lípido (g/l)	DHA (mg/g)	DHA (g/l)	DHA (% de lípido)
Fuentes de nitrógeno	licor de maíz fermentado-MSG	60	10	11,36	371,97	4,33	111,64	1,244	29,72
	Semillas de algodón-MSG	60	10	9,99	297,08	2,70	45,20	0,500	16,94
	YE-MSG de EMD™	60	10	15,49	343,96	5,02	70,68	0,786	20,70
	YE de EMD™	60	10	35,79	189,01	6,76	37,14	0,448	19,65
	Peptona-MSG de EMD™	60	10	11,70	379,48	4,19	83,50	0,926	23,33
	YE-MSG de Sigma™	60	10	9,77	257,86	3,28	54,60	0,618	19,69
	YE de Sigma™	60	10	10,39	341,98	3,53	58,30	0,629	17,01
	YE-MSG de Fermtech™	60	10	13,99	269,53	3,82	56,97	0,664	21,10
	YE de Fermtech™	60	10	17,07	243,23	4,15	48,01	0,530	19,74
	Harina de pescado (62 % de proteína)	60	12	19,53	290,72	5,68	73,59	0,828	25,31
Fuentes de carbono	Fructosa	60	10	14,57	498,54	8,09	96,97	1,070	21,55
	Dextrosa	60	10	14,98	623,91	9,87	113,69	1,232	18,94
	Dextrina de maíz	60	10	4,65	89,69	0,39	25,69	0,278	26,75

(continuación)

Medio (6 g/l de sal, cultivado a 72 horas, en cultivos de 50 ml)		C (g/l)	N (g/l)	dcw/l del medio (g)	Lípido (mg/g)	Lípido (g/l)	DHA (mg/g)	DHA (g/l)	DHA (% de lípidos)
Gelatina		60	10	7,09	31,87	0,13	11,86	0,127	27,70
	Almidón (maíz)	5	10	4,85	94,04	0,46	19,49	0,206	20,72
		30	10	3,13	90,07	0,28	23,78	0,256	26,40
	Almidón (trigo)	5	10	8,03	86,96	0,47	17,62	6,185	17,76
30		10	18,16	18,59	0,34	3,83	0,042	20,58	
Medio de control (1)		60	10	16,92	487,59	8,25	70,87	0,768	13,25
Medio de control (2)		60	10	10,88	483,06	6,06	74,64	0,818	16,19

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

311. Se probaron una variedad de métodos para el aislamiento de los aceites omega-3 con el fin de determinar la eficacia óptima del aislamiento. Estos métodos incluyeron: el método convencional de Bligh y Dyer (Bligh y Dyer, Can J. Biochem. Physiol., 37:912-917, 1959); el método de extracción y transesterificación combinada usado de manera específica con especies de Traustochytridos que permite el procesamiento de muestras para un análisis rápido de GC FAME (Lewis et al., J. Microbiol. Methods, 43:107-116, 2000); la extracción por saponificación simultánea (Cartens et al., J. Am. Oil Chem. Soc. 73:1025-1031, 1996); y la extracción en fase sólida usando columnas de gel de sílice que pueden aislar de manera selectiva los triglicéridos; diglicéridos y monoglicéridos (Pinkart et al., J. Microbiol. Methods, 34:9-15, 1998; Bateman y Jenkins, J. Agric. Food Chem., 45:132-135, 1997).

312. En concreto, 40 gramos de biomasa de peso de células secas de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 producidas en una sola ronda de fermentación (véase el ejemplo 1) se dividieron en lotes de 0,44 g y se usaron para cada una de las técnicas. Todas las técnicas se realizaron por triplicado con las eficacias analizadas usando la determinación de éster metílico del ácido graso mediante FID-GC, de nuevo por triplicado con rondas de triplicados por muestra. Los resultados demuestran que el contenido total de ácidos grasos puede variar entre métodos individuales con fluctuaciones lo más probablemente debido al disolvente: saturación del compuesto, consideraciones de alteración de biomasa y otras consideraciones de condiciones físicas (por ejemplo, temperatura y tiempo).

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

Bligh y Dyer

	DHA	EPA	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA
	mg de omega-3 por gramo de biomasa (mg/g)											
1	104,39	4,25	36,28	5,82	113,94	77,27	4,92	44,01	1,13	1,67	28,86	430,99
2	136,75	5,45	46,51	7,40	142,96	98,38	6,07	56,49	1,40	2,19	37,92	552,98
3	134,59	4,78	42,51	6,91	128,54	87,01	5,20	51,10	1,30	2,10	35,98	532,91
Prom.	125,24	4,83	41,77	6,71	128,48	87,55	5,40	50,53	1,28	1,99	34,25	505,63

Transesterificación directa

	DHA	EPA	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA
	mg de omega-3 por gramo de biomasa (mg/g)											
1	104,39	4,24	36,39	5,42	112,94	75,27	5,42	44,01	1,13	1,67	28,86	420,99
2	89,83	4,54	34,81	5,60	103,04	73,43	5,56	42,85	0,98	1,87	25,35	392,88
3	101,64	4,25	37,16	5,98	106,94	75,98	5,35	43,95	1,11	1,78	26,46	410,65
Prom.	98,65	4,34	36,12	5,67	107,64	74,89	5,44	43,60	1,07	1,77	26,89	408,17

Saponificación simultánea

	DHA	EPA	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA
	mg de omega-3 por gramo de biomasa (mg/g)											
1	204,85	6,75	46,55	8,56	182,26	134,81	8,73	105,04	2,16	3,20	66,68	785,25
2	188,51	6,17	47,64	9,32	208,29	121,25	10,35	95,80	2,53	2,89	61,41	770,14
3	198,25	6,12	47,21	9,65	207,71	136,51	9,58	98,50	2,41	3,10	63,58	782,54
Prom.	197,20	6,35	47,13	9,18	199,42	130,86	9,55	99,78	2,37	3,06	63,89	779,31

Extracción en fase sólida

	DHA	EPA	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA
--	-----	-----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-----

(continuación)

mg de omega-3 por gramo de biomasa (mg/g)

1	169,17	0,42	68,41	10,83	204,43	140,14	8,09	76,97	1,75	3,00	47,05	748,33
2	172,26	0,44	69,59	11,01	207,01	143,74	8,11	78,72	1,74	3,27	47,86	819,04
3	173,65	0,43	69,21	11,31	208,97	146,64	8,16	77,64	1,73	3,64	46,98	785,64
Prom.	171,69	0,43	69,07	11,05	206,80	143,51	8,12	77,78	1,74	3,30	47,30	784,34

N.B: Cada valor enumerado anteriormente es el promedio de rondas por triplicado usando FID-GC para el análisis de FAME

13. Ejemplo 13:

5 a) Materiales y métodos

(1) Aislamiento y mantenimiento de Traustokítridos

313. Se recogieron setenta muestras marinas incluyendo: *Spartina alterniflora*, *Zostera marina* y sedimento en sitios de la costa este de Canadá de Nueva Escocia, Isla Prince Edward, New Brunswick, Newfoundland y Labrador entre julio y agosto de 2002. Las muestras se colocaron en frascos de 20 ml que contienen 10 ml de agua de mar natural estéril filtrada a 0,2 µm y 300 mg·l⁻¹ de penicilina y 500 mg·l⁻¹ de estreptomycin. Las suspensiones se cebaron con polen estéril (*Acer* sp.) y se incubaron durante 48 horas a 18 °C, de acuerdo con (Bremer, Marine Mycology - A Practical Approach, Fungal Diversity Press, Hong Kong, pp 49-61 (2000)). Los granos de polen se transfirieron después con el asa y se sembraron en placas de agar B1 (1 g·l⁻¹ de extracto de levadura, 1 g l⁻¹ de peptona, 10 g l⁻¹ de agar para 1 litro de agua de mar natural) que contiene antibióticos y se incubó. Las colonias simples, irregulares, hialinas hechas de células esféricas o limaciformes y atípicas de colonias de levadura o bacterianas se seleccionaron y se subcultivaron al menos tres veces en placas B1 para la pureza.

20 (2) Producción de biomasa para el cribado de ácidos grasos

314. Para cribar aislados para el crecimiento y la producción de ácidos grasos, se preparó medio líquido usando agua de mar natural filtrada a 0,2 µm que contiene 2 g l⁻¹ de peptona (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) y 2 g l⁻¹ de extracto de levadura (BD, Franklin Lanes, NJ, EE.UU.), que se esterilizó mediante autoclave, seguido por la adición de 5 g·l⁻¹ de glucosa esterilizada por filtro de 0,2 µm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) (Bowles et al., J Biotechnol 70:193-202 (1999)). Se inoculó un volumen de 30 ml de cultivo por asa desde una placa de agar y se cultivó durante 4 días a 18 °C en un agitador a 100 RPM. Después se usaron 5 ml de este cultivo para inocular un cultivo de 95 ml incubado durante 4 días más (fase estacionaria). Las células se recolectaron mediante centrifugación a 4.500 RPM, se enjuagaron con 5 ml de agua destilada y se volvieron a centrifugar. Los sedimentos celulares se liofilizaron, se pesaron y se almacenaron a -80 °C antes de la derivatización para el análisis de ácidos grasos.

(3) Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)

315. La extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, *fatty acid methyl ester*) fue mediante el método de transesterificación directa, modificado de Lewis et al. (J Microbiol Meth. 43:107-116 (2000)). En concreto, se añadieron 20 mg de material liofilizado y 3 ml de mezcla de reacción de transesterificación (metanol:ácido clorhídrico:cloroformo (10:1:1 vol/vol)). Las células se agitaron vorticialmente durante 10 segundos para asegurar la dispersión uniforme de biomasa y se colocaron a 90 °C durante 120 minutos. Una vez que se completó la transesterificación, se retiraron las muestras y se permitió que se enfriasen a temperatura ambiente. Después se añadió agua (1 ml) y se agitó vorticialmente durante 10 segundos. Después se extrajeron los FAME mediante la adición de 3 alícuotas de 2 ml de hexano: cloroformo (4:1), se agitó vorticialmente durante 10 segundos y se dejó reposar hasta que se lograron separaciones líquidas claras.

(4) Análisis de cromatografía de gases (GC) de los FAME

316. El análisis de GC de los FAME se llevó a cabo usando dos patrones internos (200 µl cada uno). Se añadió un ácido hexacosanoico (C23:0) antes de la transesterificación y el otro, ácido nonadecanoico (C19:0) se añadió directamente antes del análisis. El análisis se realizó usando un Agilent 6890 GC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con una columna capilar de sílice fusionada con diámetro interno de 30 m x 0,32 m (0,25 µm de espesor de película) OMEGAWAX 320 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y un detector de ionización de llama (volumen de inyección de 1 µl, gas de vehículo de H₂ con un flujo constante de 5,0 ml min⁻¹ establecido a 250 °C, relación de división de 50:1 para detector de FID a 275 °C). La confirmación de la identidad de los FAME se realizó usando un espectrómetro de masas Trace GC-DSQ (Thermo Electron, Boston, MA, EE.UU.) y comparación de los tiempos de retención para patrones de laboratorio.

55

(5) Identificación genética

317. El ADN genómico se extrajo usando el kit de aislamiento de ADN microbiano MoBio UltraClean (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores de oligonucleótidos usados en la amplificación del gen de ARNr 18S, se modificaron de Vinda et al. (J Eukaryot Microbiol. 46:637-647 (1999)) principalmente T18S1F 5'-CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3' y T18S5R 5'-TCACTACGGAAACCTTGTTACGAC-3'. Una mezcla de reacción de PCR de 20 μ l contenía 2U de ADN polimerasa de Biolase™ (Biolin, Boston, MA, EE.UU.), 1 tampón de reacción de NH₄, MgCl₂ 3 mM, Betaine 1 M (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), 200 μ M de mezcla de nucleótidos de PCR (Promega, Madison, WI, EE.UU.), 1 μ M de cada cebador directo e inverso (MWG Biotech., High Point, NC, EE.UU.) y 100 ng de molde de ADN genómico. Después de una etapa inicial de desnaturalización durante minutos a 94 °C, se realizó la amplificación por PCR usando un ciclador térmico Eppendorf Master Cycle Gradient (Eppendorf, Westbury, NY, EE.UU.), usando un programa de 45 segundos a 94 °C, 30 segundos a 64 °C y 2 minutos a 72 °C durante 30 ciclos, seguido por una extensión final de 10 minutos a 72 °C. El producto de PCR se purificó usando el kit de limpieza de PCR MoBio UltraClean PCR (MoBio Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EE.UU.) para la secuenciación directa (MWG Biotech., High Point, NC, EE.UU.) usando los cebadores FA2, FA3, RA1, R (Mo et al., Mar Biol 140:883-889 2002), T18S1F y T18S5R. Las secuencias resultantes se alinearon y se compararon con secuencias de nucleótidos de microorganismos similares almacenados en GenBank (Benson et al., Nucleic Acids Res 33:D34-38 (2005)) usando Ds Gene (Accelrys, San Diego, CA, EE.UU.). Posteriormente se generó un árbol filogenético usando el método de Neighbor-Joining (Saito and Nei, Mol Biol Evol 4:406-425 (1987)), con la significación estadística evaluada usando 1.000 remuestreos de arranque (Felsenstein, Evolution 39:783-791 (1985)).

(6) Identificación de carotenoides

318. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 3800 x g y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato. Después se resuspendieron en un volumen de acetona de 10 x (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), se agitó durante 5 minutos a 200 RPM, se centrifugó a 3.800 x g durante 5 minutos y se concentró a sequedad por evaporación de N₂. Tras la resuspensión en una cantidad mínima de acetona al 10 % en hexano antes del análisis de HPLC. Las identificaciones se llevaron a cabo en un Agilent 1100 HPLC (Agilent, Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con un detector de longitud de onda variable configurado a 470 nm. Las muestras se inyectaron a través de una columna Symmetry C₁₈ guard (Waters, Milford, MA, EE.UU.) a una columna de fase inversa Bondclone C₁₈ (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.; partículas de 10 μ m; 3,9 x 300 mm i.d.). El volumen de inyección fue de 10 μ l y se usó un flujo de 1 ml·min⁻¹ de acetona al 10 % en hexano durante un periodo de 25 minutos. Posteriormente se confirmó la identidad de carotenoide con análisis de espectrometría de masas (Micromass ESI-QToF MS, Waters, Milford, MA, EE.UU.). Los datos cuantitativos para cada carotenoide se basaron en el desarrollo de una curva de calibración usando patrones (astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenona y β -caroteno) y comparando el área del pico con concentraciones definidas.

(7) Optimización de la fermentación

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

b) Resultados

320. Se desarrolló un proceso de recolección y de cribado mediante el cual los miembros de la familia Labyrinthulida, especialmente el género, *Schizochytrium* y *Thraustochytrium*, se aislaron usando el cebado con polen y los medios bacteriológicos selectivos. Este estudio, que abarca una colección de 20 sitios únicos dispersos a lo largo de la costa atlántica de Canadá, produjo 68 cepas puras, identificadas al microscopio. La selección de cepas oleaginosas, que tiene más del 20 % de su peso seco de células siendo ácidos grasos, se basó en los resultados del perfil de GC de PUFA, la productividad de la biomasa, el TFA y DHA máximo, y en menor grado las concentraciones de EPA (Fig. 11), de acuerdo con el método de (Lewis et al., J Microbiol Meth 43:107-116 (2000)). Los valores para las productividades de biomasa, TFA y DHA y EPA variaron de 100 a 2300 mg l⁻¹, 27,1 a 321,14, 5,18 a 83,63 y 2,97 a 21,25 mg g⁻¹, respectivamente (Fig. 11).

321. Todos los aislados que crecieron en medio líquido (54 de 68), produjeron mayores cantidades de ácido graso poliinsaturado omega-3, en particular, DHA que comprendió entre el 22 y el 80 % del contenido total de C20 a C22 de estas células (Fig. 11). Esto confirma los hallazgos previos, mediante lo cual, los traustocitrídeos aislados de ambientes de temperaturas frías tienen perfiles de ácidos grasos con DHA que son de hasta el 53 % del total de ácidos grasos presentes (Bowles et al., J Biotechnol 70:193-202 (1999) and Huang et al., Mar Biotechnol 5450-457 (2003)). De

- particular interés es ONC-T18 que produce hasta el 90 % de su contenido de C20 a C22 como DHA que es aproximadamente el 35 % del total de ácidos grasos intracelulares. Este contenido de DHA demostró ser equivalente al de varias cepas de producción comercial, tales como *Schizochytrium sp.* ATCC 20888 (32 %) y *S. limacinum MYA-1381/SR21* (34 %) (Barclay et al., J App1 Phycol 6:123-129 (1994) y Yokochi et al., Appl Microbiol Biotechnol 49:72-76, (2003)). Además, todos los aislados sintetizaron ácido eicosapentaenoico (EPA), variando entre el 2 y el 20 % del total de los PUFA identificados (Fig. 11). Además de los aceites omega-3 producidos, aproximadamente el 80 % de todos los aislados sintetizaron los PUFA de omega-6, ácido araquidónico (AA) o ácido docosapentaenoico (DPA), a concentraciones que varían entre el 1 y el 18 % y el 3 y el 7 % en p/p, respectivamente (Fig. 11).
322. Huang et al. (Mar Biotechnol 5:450-457 (2003)) que para los traustocquítridos aislados de las aguas costeras tropicales de Japón y Fiyi, se podrían describir cinco perfiles de ácido graso poliinsaturado, principalmente DHA/DPA (n-6), DHA/DPA/EPA, DHA/EPA, DHA/DPA/EPA/AA y DHA/DPA/EPA/AA/ácido docosatetraenoico (Huang et al., Mar Biotechnol 5:450-457 (2003)). En el caso de esta colección de traustocquítridos, aislados de las aguas templadas de las costas atlánticas de Canadá, se podrían determinar cuatro perfiles de PUPA, tres de los cuales son idénticos a los mencionados anteriormente, principalmente DHA/DPA/EPA al 7,4 % de la colección, DHA/EPA al 13 % de la colección DHA/DPA/EPA/AA, 74 %, con un cuarto que comprende una mezcla de DHA/EPA/AA al 5,6 %.
323. Mediante la secuenciación directa del gen de DNAr 18S, se identificó positivamente la ONC-T 18 como un miembro de la familia de los traustocquítridos (Número de registro en GenBank: DQ374149). El análisis filogenético indicó que la ONC-T18 formó un único grupo (97,5 % de identidad) con *Thraustochytrium striatum* T91-6 (Fig. 12) (Leander y Porter, Mycologia 93:459-464 (2001)). Mientras que *Thraustochytriidae sp. MBIC 11093, N1-27* y *Thraustochytrium sp. CHN-1*, recolectado de las aguas tropicales costeras de Japón, y se encontró que son productores significativos de DHA (Carmona et al., Biosci Biotechnol Biochem 67: 884-888 (2003) y Huang et al., Mar Biotechnol 5: 450-457 (2003), se demostró que eran similares al 96, 95,5 y al 94,5 %, respectivamente. La diversidad genética es bastante baja entre todos los miembros de *Thraustochytriidae* que se muestran en la figura 12, variando del 97,5-91,0 % de similitud entre ellos. Todavía, estas especies se distribuyen a nivel global, con dos tercios aislados de las aguas de las costas tropicales de Japón, China e Israel y las restantes de aguas templadas de América, Europa y Canadá.
324. El perfil de ácidos grasos de ONC-T18 incluyó altos contenidos de PUFA C22, niveles muy bajos de FA de C18 y de C20, y la aparición de ácidos grasos saturados de cadena impar (15:0 y 17:0), similares a los de *Schizochytrium sp.* KH105 o *S. limacinum* SR21. Además, el análisis de los perfiles de utilización de carbono y nitrógeno para las cepas ONC-T18, SR21 y KH105 presentó un patrón de asimilación similar. El contenido de DPA n-6 en la cepa ONC-T18 varió del 6-10 %, lo que parece ser extremadamente alto cuando se considera la aparición limitada de DPA n-6 en la biosfera. Sin embargo se documentaron niveles similares de DPA n-6, por Nakahara et al. (J Am Oil Chem Soc 73:1421-1426 (1996)) en *Schizochytrium sp.* SR21 (6-10 %) y Ellenbogen et al. (Comp Biochem Physiol 29:805-81 (1969)) en *T. aureum* (9,5 %) y *T. roseum* (6,6 %).
325. El análisis del perfil de ácidos grasos de ONC-T18 en tres configuraciones de cultivo diferentes: (1) placa agar; (2) matraz cónico y (3) biorreactor y se cultivó en el mismo medio (Fig. 13) muestra una disminución en la diversidad de los PUFA presente y un aumento global en TFA de placa agar al reactor. En concreto, las placas de agar presentaron una variedad de PUFA, mientras que los cultivos crecidos en el matraz y en el biorreactor estaban dominados por uno o dos intermediarios (Fig. 13). En comparación con *Thraustochytrium aureum*, que creció mejor en cultivo en matraz que en un fermentador de tanque de agitación (Ilda et al., J Ferment Bioeng 81:76-78 (1996)), ONC-T18 creció mejor en un biorreactor. Este resultado concuerda con el de (Nakahara et al., J Am Oil Chem Soc 73:1421-1426 (1996)), que descubrió que *Schizochytrium sp.* SR21 presentaba una elevada resistencia a la agitación mecánica y, por lo tanto, prosperó en condiciones del biorreactor.
326. Además, se descubrió que los pigmentos carotenoides se producían en fermentaciones en placa, matraz y biorreactor de *Thraustochytrium sp. ONC-T 18*, dando como resultado una decoloración naranja pálido. La producción de estos antioxidantes es máxima en las fermentaciones del biorreactor de manera concurrente con la producción de ácidos grasos. Además, mediante el uso de espectrometría de masas HPLC, se determinó que estos compuestos antioxidantes se identificaron como astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equineona y β -caroteno (Fig. 14), que están conjugados con diversos PUFA. Se documentaron resultados similares entre los miembros de protistas del grupo de traustocquítridos. En concreto, *Schizochytrium aggregatum* demostró que produce equinenona y cantaxantina (Valadon, Trans Br Mycol Soc 67:1-15 (1976)), mientras que Carmona et al. (Biosci Biotechnol Biochem 67:884888 (2003) y Huang et al. (Mar Biotechnol 5:450457 (2003)) demostraron la producción de astaxantina, equinenona, cantaxantina, fenicoxantina (no zeaxantina como en la ONC-T18) y β -caroteno por *Thraustochytrium sp. CHN-1*, un pariente cercano de ONC-T18 (Fig. 12). En este estudio, se descubrió que las concentraciones de estos carotenoides eran de un orden de magnitud de menos de los de CHN-1 siendo el compuesto principal β -caroteno, en lugar de astaxantina. Por tanto, dentro de *Thraustochytrium spp.*, la producción de PUFA y carotenoides se puede unir para que las grasas de almacenamiento que se producen puedan protegerse de la oxidación.
327. Previamente, se ha determinado que las cantidades relativas de los principales componentes de los ácidos grasos (ácidos mirístico, palmítico y oleico) se pueden alterar de algún modo cambiando las condiciones de crecimiento del

cultivo (Ilda et al., J Ferment Bioeng 81:76-78 (1996)). De esta manera, se puede manipular la composición final de ácidos grasos y, por lo tanto, las propiedades físicas del PUFA deseado de manera controlada durante la fermentación (Sijtsma et al., Recent Res Devel Microbiol 2:219-232 (1998)). En un intento de limitar los factores que inhiben tanto la producción de biomasa como de PUFA de omega-3 en ONC-T18, se manipularon los componentes de carbono, nitrógeno y sal marina en medio de nutriente (Tabla 9) junto con la duración del cultivo (Fig. 15).

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

Glucosa (g l ⁻¹)	Biomasa (g l ⁻¹)		TFA (% de biomasa)	DHA (% de TFA)	DHA (g l ⁻¹)
5	12,13		5,21	29,18	0,18
20	13,73		29,59	24,01	0,98
40	16,69		59,39	23,88	2,37
60	21,08		51,01	26,17	2,81
100	18,40		69,49	31,55	4,03
160	10,68		9,40	30,01	0,30
YE (g l ⁻¹)	MSG (g l ⁻¹)	Biomasa (g l ⁻¹)	TFA (% de biomasa)	DHA (% de TFA)	DHA (g l ⁻¹)
10	0	22,33	34,53	20,20	1,56
8	2	22,81	44,00	17,52	1,72
6	4	22,64	50,69	16,23	1,86
4	6	24,046	69,07	24,19	4,09
2	8	26,09	81,73	20,99	4,47
0	10	7,50	1,97	28,81	0,04
Sal marina (g l ⁻¹)	Biomasa (g l ⁻¹)		TFA (% de biomasa)	DHA (% de TFA)	DHA (g l ⁻¹)
2	24,70		59,23	31,44	4,60
6	21,08		51,01	26,17	2,81
15	22,90		69,32	25,32	4,02
30	17,76		61,02	25,25	2,74
40	17,27		68,21	24,02	2,83
50	18,77		59,63	22,56	2,53

10

328. En este estudio, a medida que se reduce la concentración de nitrógeno, aumenta el contenido de ácidos grasos totales, con el mayor contenido de ácidos grasos totales (aproximadamente el 80 %) obtenido a una concentración del 1 % de extracto de levadura y glutamato de monosodio (p/v). Los cultivos con una baja concentración de nitrógeno, sin embargo, también limitaron el crecimiento celular y, por lo tanto, la producción total de ácidos grasos. La producción óptima en este experimento se obtuvo usando 8 g l⁻¹ de glutamato de monosodio y 2 g l⁻¹ de extracto de levadura, lo que produce 26,1 g l⁻¹ de biomasa y 4,5 g l⁻¹ DHA (Tabla 9). Además, los aumentos en carbono de hasta 100 g l⁻¹ aumentaron eficazmente la producción de DHA, esto concuerda con los resultados obtenidos para *Schizochytrium* sp. SR21 (Yokochi et al., Appl Microbiol Biotechnol 49:72-76, (2003)) y contrarios a los mostrados en *T. aureum* en donde las concentraciones de glucosa por encima de 10 g l⁻¹ fueron inhibitorias (Ilda et al., J Ferment Bioeng 81:76-78 (1996)). Se obtuvieron producciones máximas de DHA de más de 4,0 g l⁻¹ en medio de glucosa, con producciones de más de 5 veces la de *T. aureum* (Bajpai et al., JAm Oil Chem Soc 68:509-514 (1991)) y *T. roseum* (Li and Ward, Ind Microbiol 13:238-241 (1994)) y comparables con las de *Schizochytrium* sp. SR21 y KH105 (Aki et al., JAm Oil Chem Soc 80:789-794 (2003)). Finalmente, ONC-T18 presentó capacidades eurihalinas clásicas, siendo capaz de resistir a salinidades que varían de 2,0 a 50,0 g l⁻¹, dando como resultado una variabilidad de la productividad de la biomasa del 25-30 % (Tabla 9). En el mismo experimento, se descubrió que los valores de DHA g l⁻¹ varían hasta un 45 % entre los valores óptimos de 4,6 g l⁻¹ y los mínimos de 2,5 g l⁻¹ (Tabla 9).

329. La biomasa, el TFA y el DHA producidos por ONC-T18 durante un período de 168 h en un biorreactor de 5 litros se presenta en la Figura 15. La curva de crecimiento representada es típica de varias logradas en condiciones idénticas. La máxima producción de biomasa se alcanzó tras 120 horas, cerca del punto del agotamiento de la fuente de carbono (es decir, glucosa). Este fue también el punto al que el contenido de ácidos grasos de la biomasa alcanzó un máximo alrededor del 70 % de la biomasa. Curiosamente, después de solo 24 horas de cultivo, el contenido en DHA se disparó al 30 % de ácidos grasos totales, permaneciendo constante desde entonces al 20-25 %. Estos resultados son consistentes con los de otras cepas de traustoquitrinos productoras de ácidos grasos, sin embargo, existe una disparidad con respecto a la velocidad a la que ocurren estas reacciones.

35

c) Discusión

330. Anteriormente, la mayoría de los estudios de Labyrinthomycoata identificaron cepas que no pueden almacenar el ácido graso total en cantidades superiores al 20 % de la biomasa. Por ejemplo, antes del aislamiento de *Schizochytrium* sp. SR 21 que es capaz de acumular hasta el 50 % de biomasa como grasa, *T. aureum* fue el mejor acumulador al 20 % (Bajpai et al., J Am Oil Chem Soc 68:509-514 (1991)). ONC-T18, por otro lado, es capaz de acumular hasta el 80 % de su biomasa como lípido.

331. Para que los microorganismos tales como ONC-T18 acumulen aceite, normalmente deberían crecer en un medio de cultivo con una cantidad de nitrógeno limitada (normalmente agotada tras 24 a 36 horas) y cantidades abundantes de una fuente de carbono. Una vez que se ha agotado el nitrógeno, los microbios oleaginosos continúan a asimilar la fuente de carbono pero ya son capaces de someterse a la división celular debido a la ausencia de nitrógeno (evitando así la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos). El resultado es la conversión de estas fuentes de carbono (es decir, azúcares tales como glucosa) en aceites de almacenamiento. A este respecto, se considera que la ONC-T18 crece más despacio que otras cepas de Traustozytridos, tales como G13 (Bowles et al., J Biotechnol 70:193-202 (1999) and Huang et al., Mar Biotechnol 5:450-457 (2003)), todavía produce DHA a tasas más rápidas y demuestra una capacidad única para incorporar elevadas cantidades de ácidos grasos totales. Finalmente, la capacidad de ONC-T18 para crecer a concentraciones muy bajas de sal con una alta biomasa y una productividad total de ácidos grasos es notable. Se presta bien para ampliarse anulando la naturaleza corrosiva del agua salada en equipos de fermentación industrial.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> OCEAN NUTRITION LTD. CANADÁ
Adam Burja
Helia Radianingtyas
Colin Barrow

30 <120> MICROORGANISMOS EUCARIOTAS PARA LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS Y ANTIOXIDANTES
<130> 15113.0012U4
<140> US 13/427.562
<141> 22/03/2012

35 <150> 11/916,781
<151> 23/06/2008

40 <150> PCT/IB06/03977
<151> 07/06/2006
< 150> 60/688.207
<151> 07/06/2005

45 < 150> 60/751.401
<151> 16/12/2005
<160> 3

50 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
<210> 1
<211> 1724
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; nota = construcción sintética

60 <400> 1

ES 2 729 976 T3

dgtagtcata	cgctcgtctc	aaagattaag	ccatgcatgt	gtaagtataa	gcgattatac	60
tgtgagactg	cgaacggctc	attatatcag	ttatgatttc	ttcggatatt	tctttatatg	120
gatacctgca	gtaattctgg	aattaataca	tgctgagagg	gcccgactgt	tcgggagggc	180
cgcaacttatt	agagttgaag	ccaagtaaga	tggtgagtca	tgataattga	gcagatcgct	240
tgtttgagc	gatgaatcgt	ttgagtttct	gccccatcag	ttgtcgacgg	tagtgtattg	300
gactacgggtg	actataacgg	gtgacgggga	gttagggctc	gactccggag	agggagcctg	360
agagacggct	accacatcca	aggaaggcag	cagggcgtga	aattacccaa	tgtggactcc	420
acgaggtagt	gacgagaaat	atcaatgcgg	ggcgcttcgc	gtcttgctat	tggaatgaga	480
gcaatgtaaa	accctcatcg	aggatcaact	ggagggcaag	tctggtgcc	gcagcccgcg	540
taattccagc	tccagaagcg	tatgctaaag	ttggtgcagt	taaaagctc	gtagttgaat	600
ttctggggcg	ggagccccgg	tctttgcgcg	actgcgctct	gtttgccgag	cggctcctct	660
gccatcctcg	cctctttttt	tagtggcgctc	gttactctgta	attaaagcag	agtgttccaa	720
gcaggtcgta	tgacctggat	gtttattatg	ggatgatcag	atagggctcg	ggtgctatct	780
tgttggtttg	cacatctgag	taatgatgaa	taggaacagt	tgggggtatt	cgtatttagg	840
agctagaggt	gaaattcttg	gatttccgaa	agacgaacta	cagcgaaggc	attaccaag	900
catgttttca	ttaatcaaga	acgaaagtct	ggggatcgaa	gatgattaga	taccatcgta	960
gtctagaccg	taaacgatgc	cgacttgcca	ttgctgggtg	tttgtattgg	accctcgag	1020
cagcacatga	gaaatcaaag	tctttgggtt	ccggggggag	tatggtcgca	aggctgaaac	1080
ttaaaggaat	tgacggaagg	gcaccaccag	gagtggagcc	tgctggctta	tttgactcaa	1140
cacgggaaaa	cttaccaggt	ccagacatag	gtaggattga	cagattgaga	gctctttctt	1200
gattctatgg	gtggtggtgc	atggccgttc	ttagttggtg	gagtgatttg	tctggttaat	1260
tccgttaacg	aacgagacct	cggcctacta	aatagcggtg	ggtatggcga	catacttgcg	1320

tacgcttctt	agagggacat	gttcggtata	cgagcaggaa	gttcgaggca	ataacaggtc	1380
tgtgatgccc	ttagatgttc	tgggcccgcac	gcgcgctaca	ctgatgggtt	caacgggtgg	1440
tcatcgttgt	tcgcagcgag	gtgctttgccc	ggaaggcatg	gcaaactcctt	tcaacgcca	1500
tcgtgctggg	gctagatctt	tgcaattatt	aatctccaac	gaggaattcc	tagtaaaccg	1560
aagtcatcag	cttgattgga	atacgtccct	gccctttgta	cacaccgccc	gtcgcacctt	1620
ccgattgaac	ggtccgatga	aacatgggga	tgaccttttg	agcgtttggt	cgcgaggggg	1680
gtcagaactc	gggtgaatct	tattgtttag	aggaaggtga	agtc		1724

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

- <220>
- 10 <223> Descripción de secuencias artificiales; nota = construcción sintética

- <400> 2
- dcaacctggt tgatcctgcc agta 24

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

- <220>
- 20 <223> Descripción de secuencias artificiales; nota = construcción sintética

- <400> 3
- dtcactacgg aaacctgtt acgac 25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar lípidos, comprendiendo el procedimiento:
 - 5 proporcionar un cultivo, comprendiendo el cultivo un medio heterotrófico que comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno y microorganismos eucariotas aislados que tienen una secuencia 18S, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 97 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1; y cultivar los microorganismos en el medio heterotrófico en condiciones adecuadas para la producción de lípidos.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además romper los microorganismos en el medio heterotrófico.
 3. El procedimiento de la reivindicación 2, que comprende además extraer los lípidos del medio heterotrófico.
- 15 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la fuente de carbono comprende glucosa, xilosa o glicerol.
 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el medio heterotrófico comprende de 1 g/L a 200 g/L de la fuente de carbono.
- 20 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la fuente de nitrógeno comprende extracto de levadura.
 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el pH del cultivo es de un pH 4,0 a 6,5.
- 25 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el cultivo se lleva a cabo a una temperatura de 18 °C a 28 °C.
 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el cultivo se lleva a cabo de uno a doce días, de uno a nueve días o de tres a cinco días.
- 30 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde los lípidos comprenden de aproximadamente el 4 % a el 12 % de DPA.
 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde los microorganismos producen al menos de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 80 % de una composición de lípidos por biomasa celular seca.
 12. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde los lípidos comprenden al menos aproximadamente el 35 % de DHA.
- 35 40 13. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde los lípidos comprenden al menos aproximadamente el 50 % de DHA.
 14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la secuencia 18S tiene al menos el 98 % o el 99 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1.
 - 45 15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde los microorganismos tienen el número de acceso de la ATCC PTA-6245.

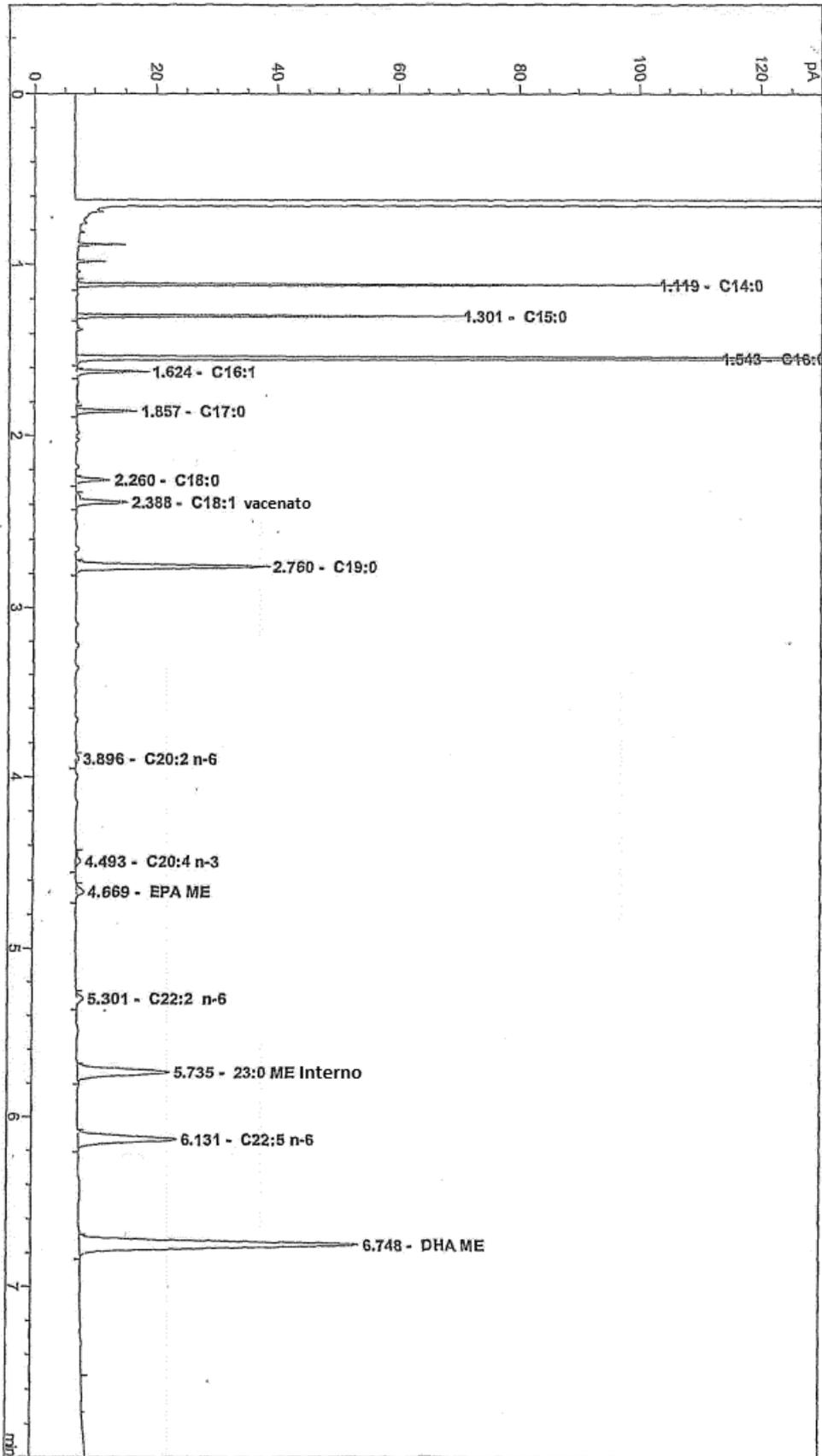
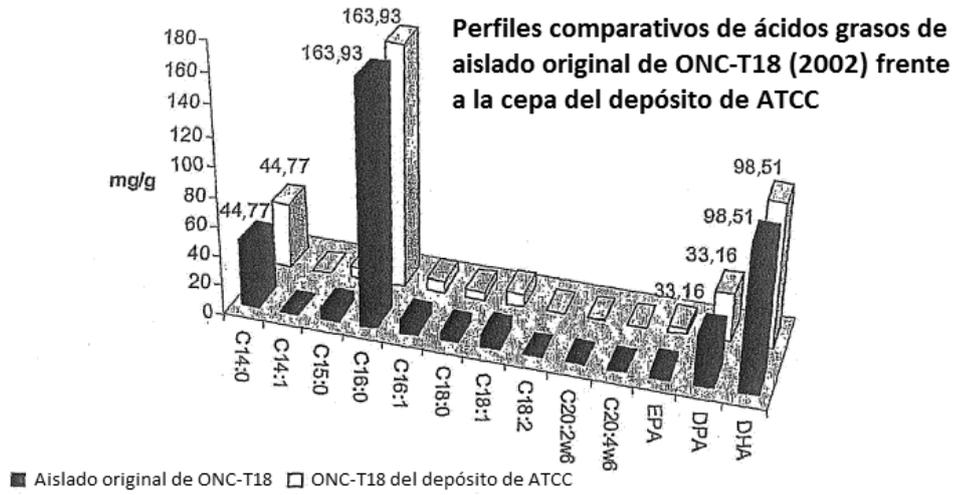


FIGURA 1

FIGURA 2



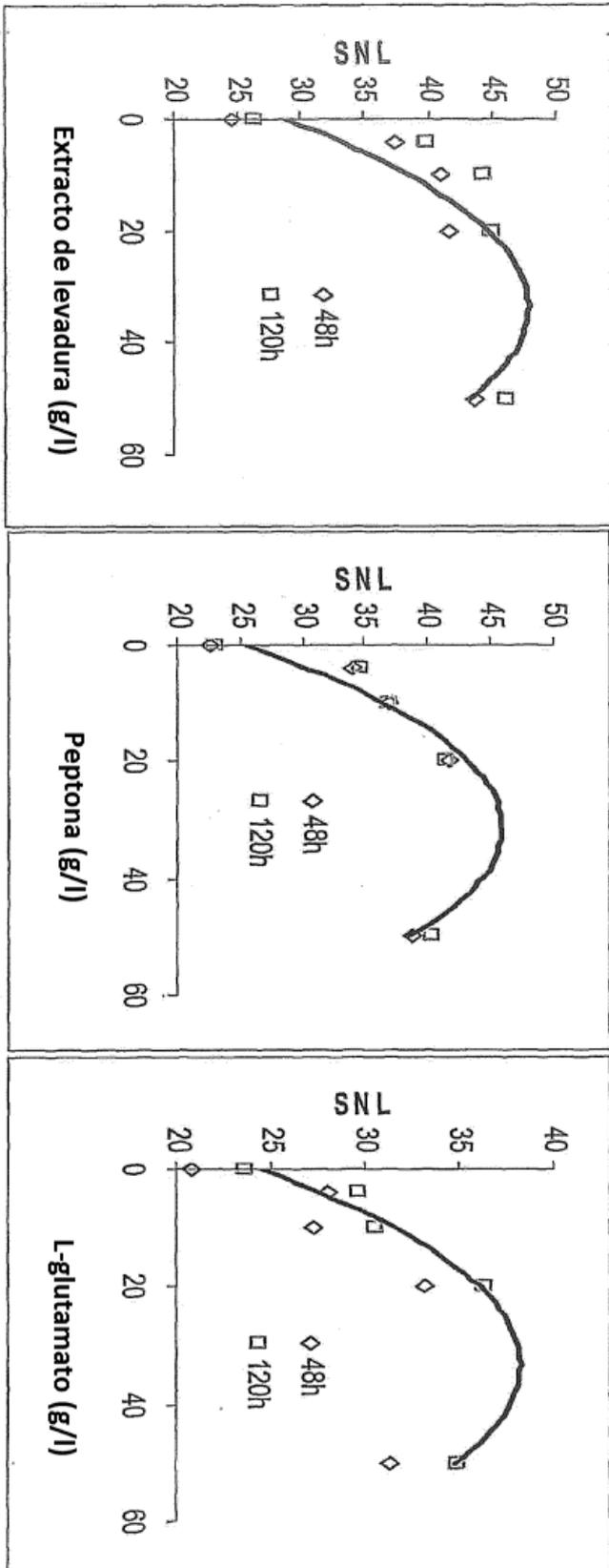


FIGURA 3

FIGURA 4

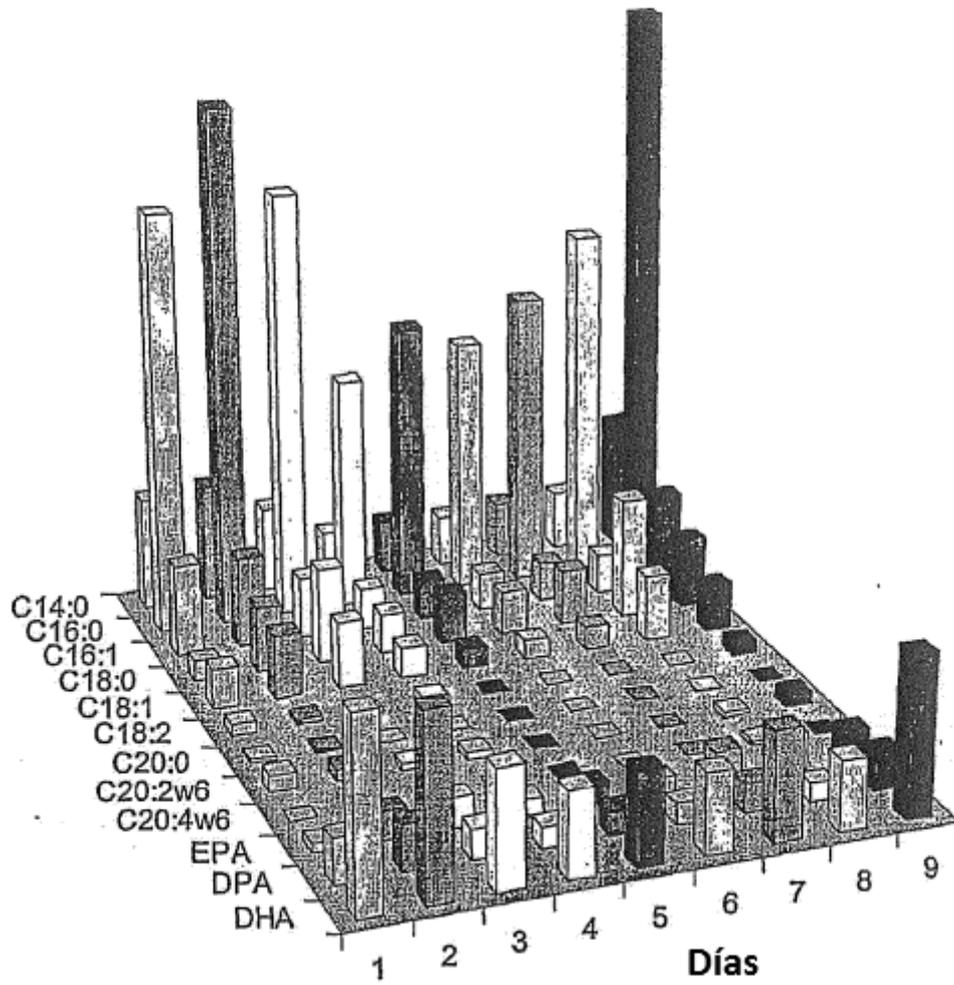
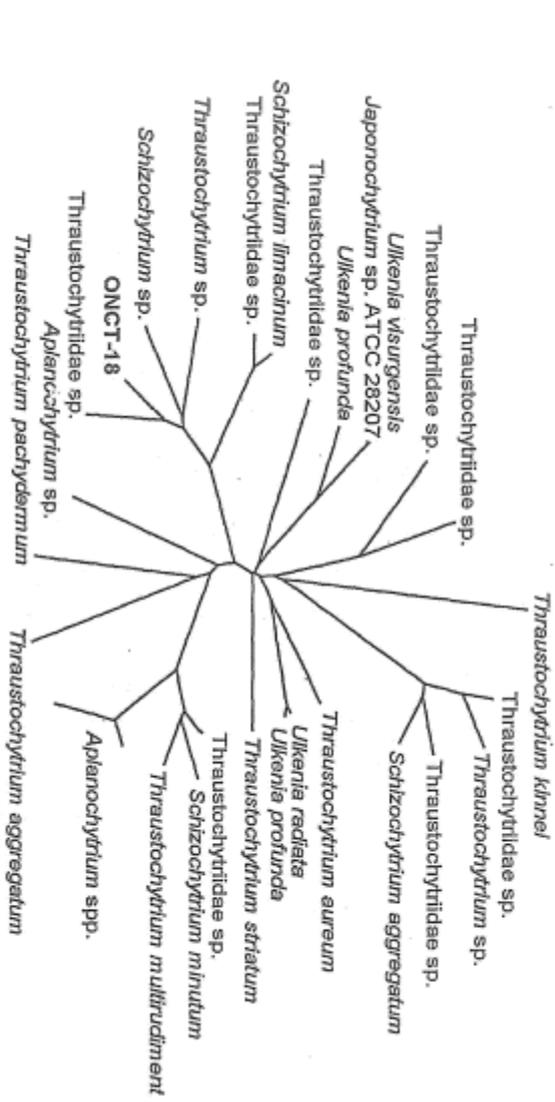


FIGURA 5

Fuentes microbianas de los PUFA

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

FIGURA 6



0,1

FIGURA 7

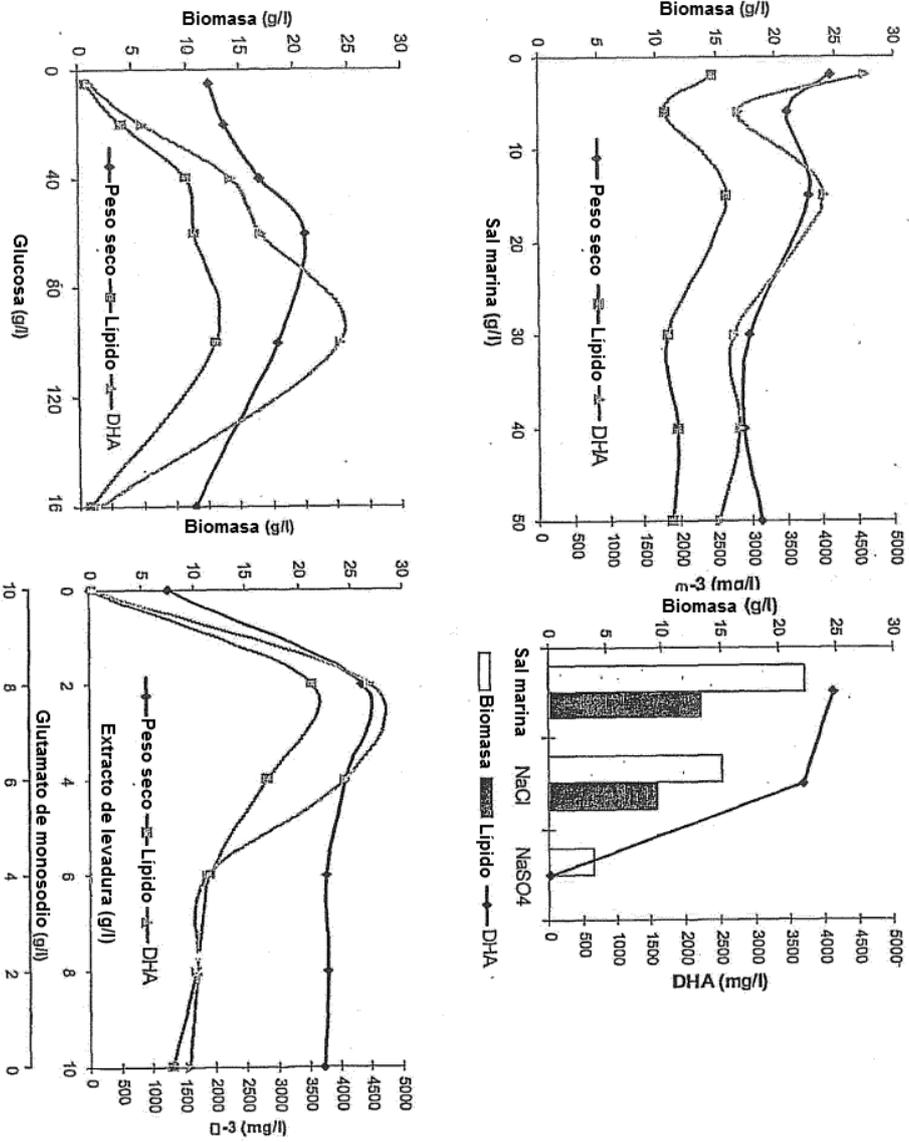
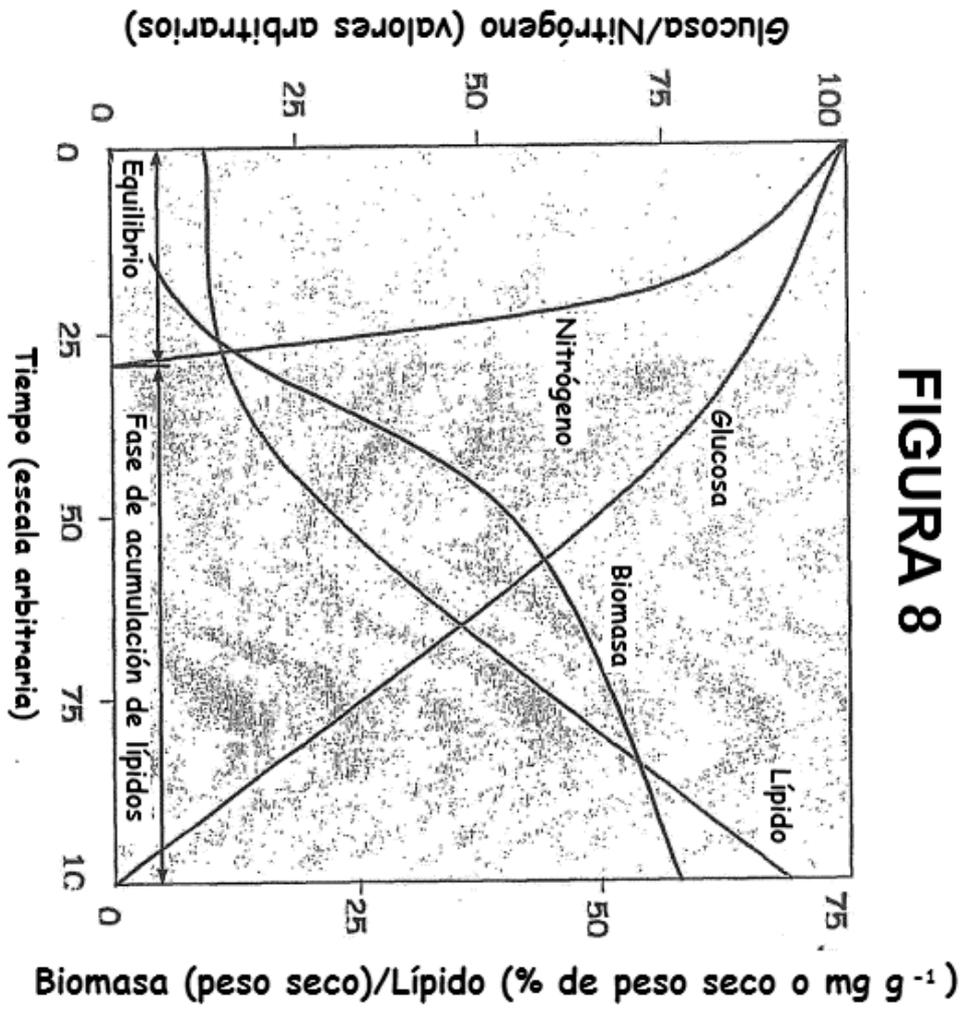


FIGURA 8



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

FIGURA 9
Vías metabólicas de los PUFA

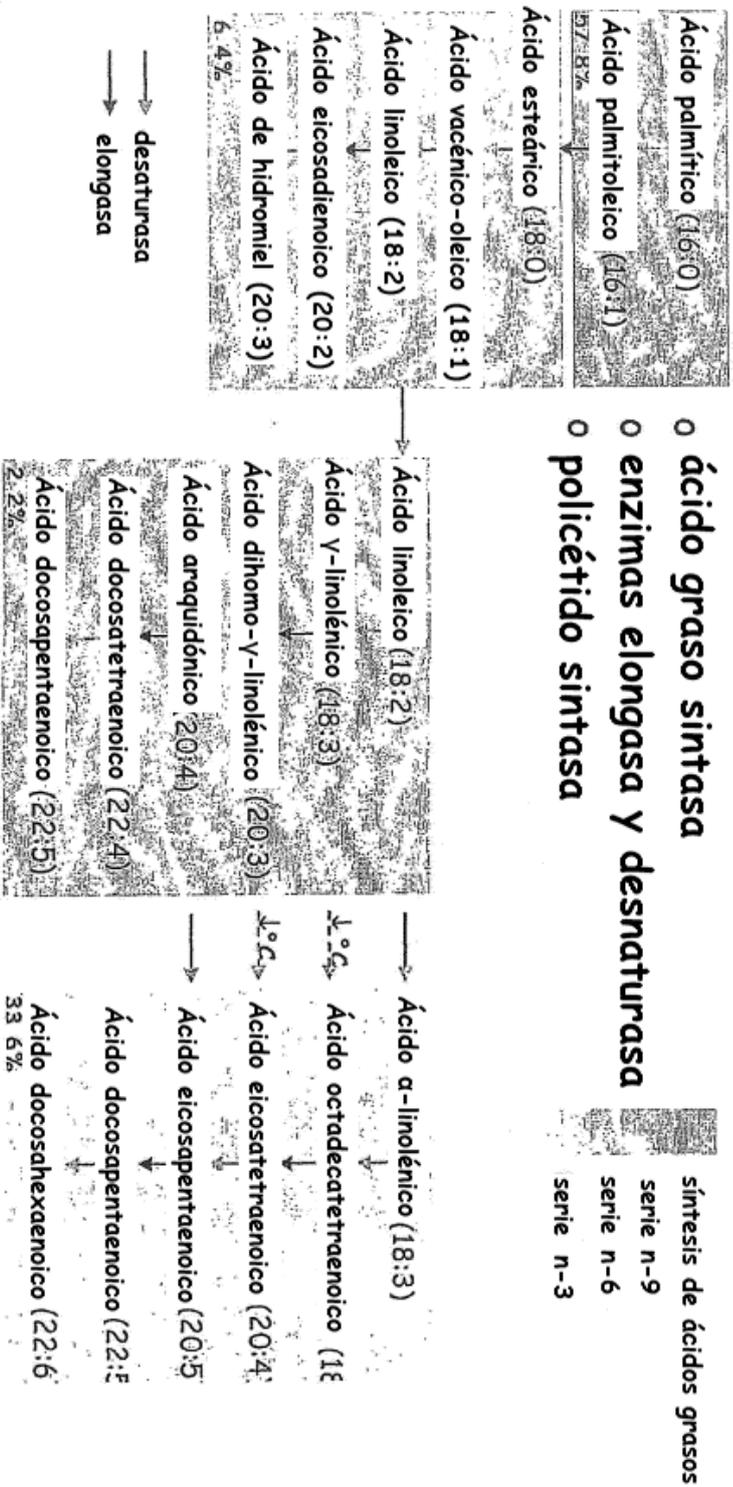


FIGURA 10

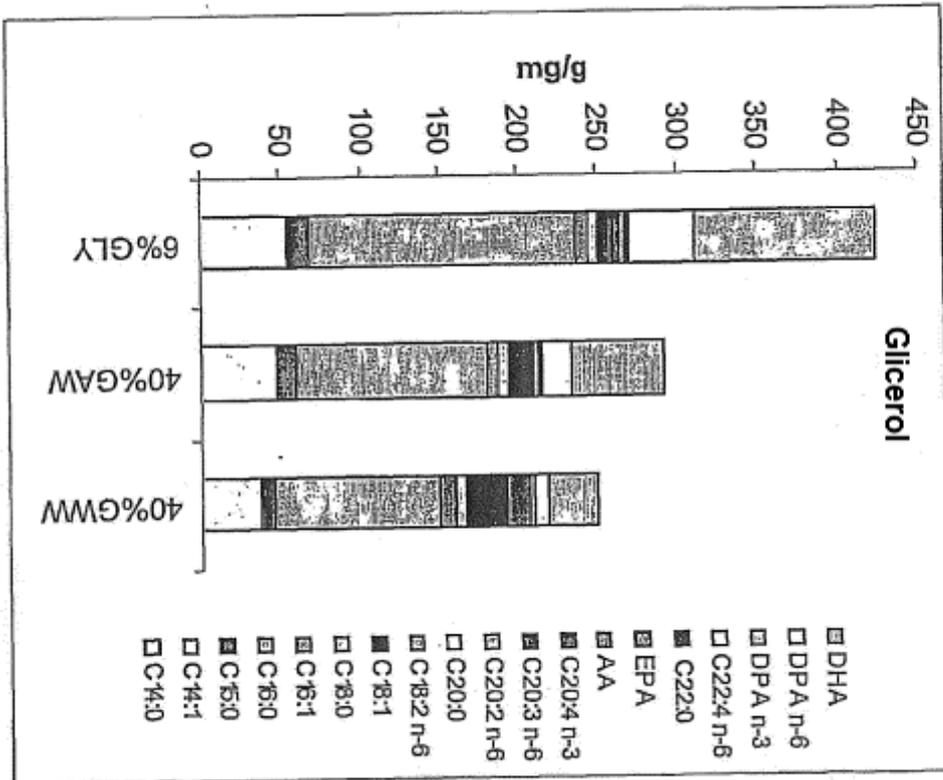
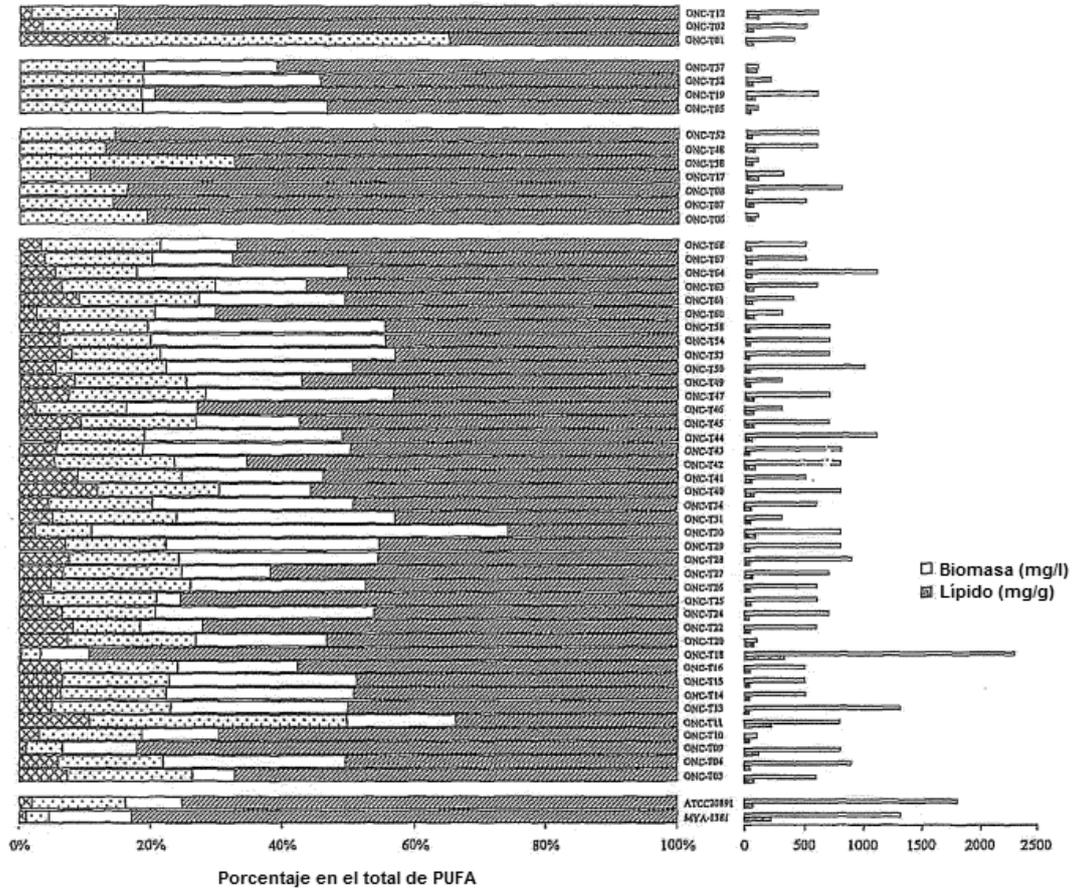


FIGURA 11



Agrupación de aislados recolectados basándose en los perfiles de los PUFA de C20 y C22. Leyenda:

- ▣ Ácido araquidónico
- ▤ Ácido eicosapentaenoico;
- ▥ Ácido docosapentaenoico, n-6; y
- ▧ Ácido docosahexaenoico. Los resultados se compararon con dos cepas de referencia: ATCC 20891 y MYA-1381

FIGURA 12

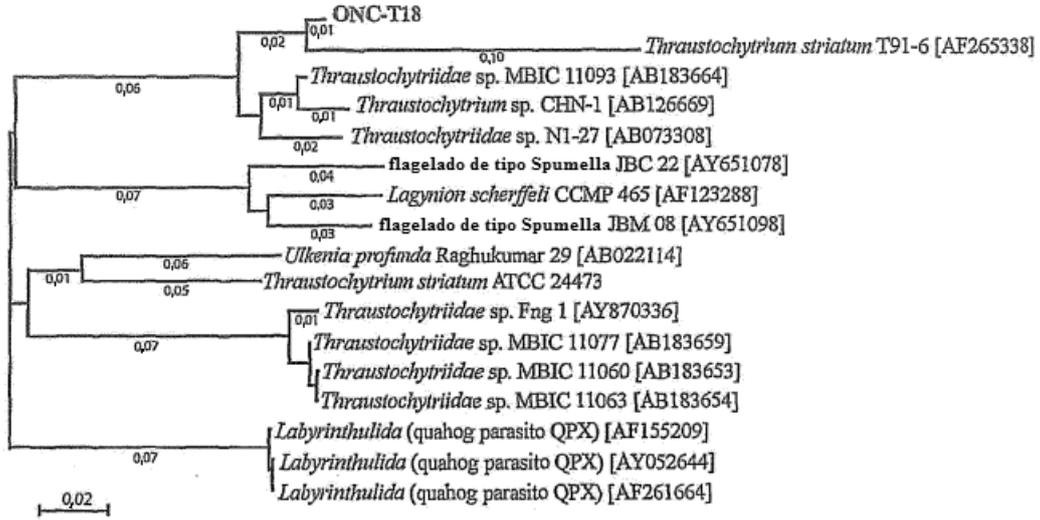


FIGURA 13

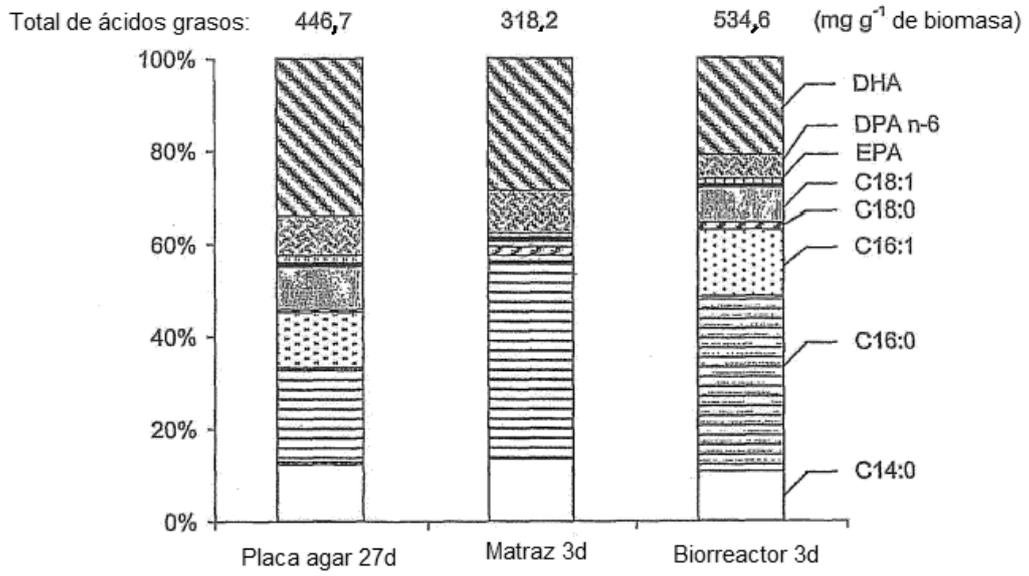
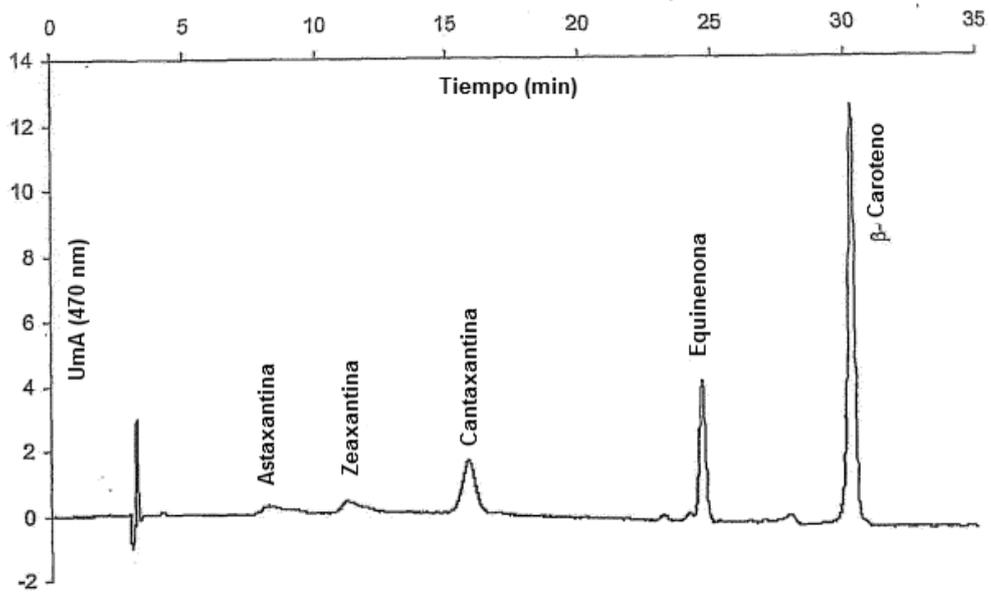


FIGURA 14



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

FIGURA 15

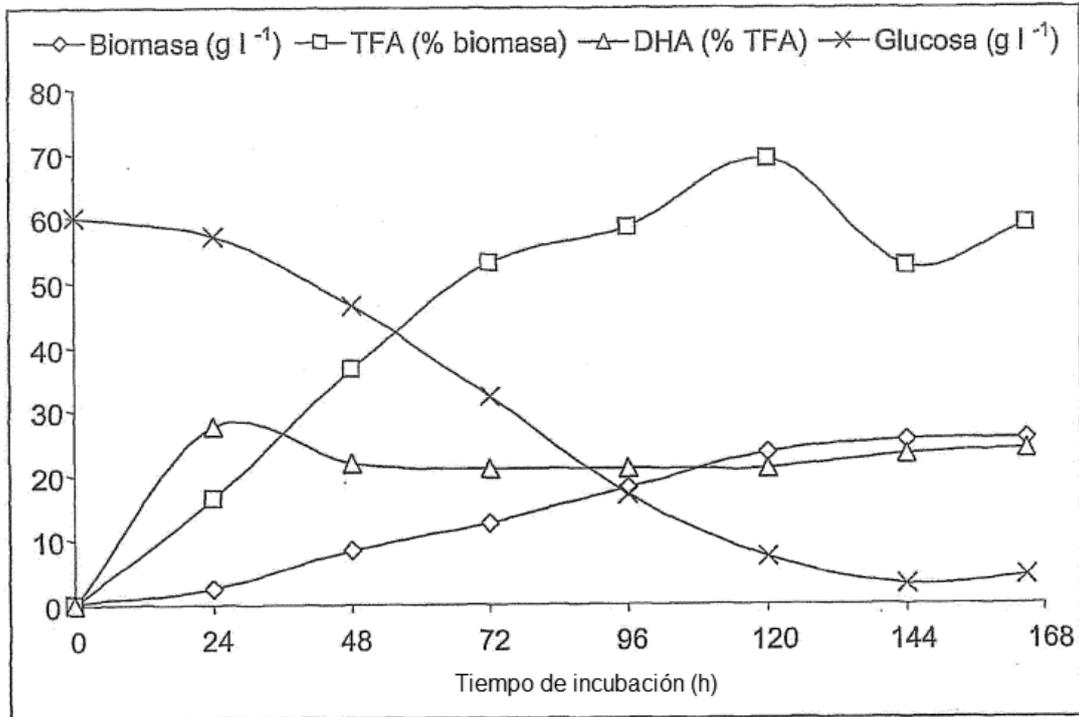
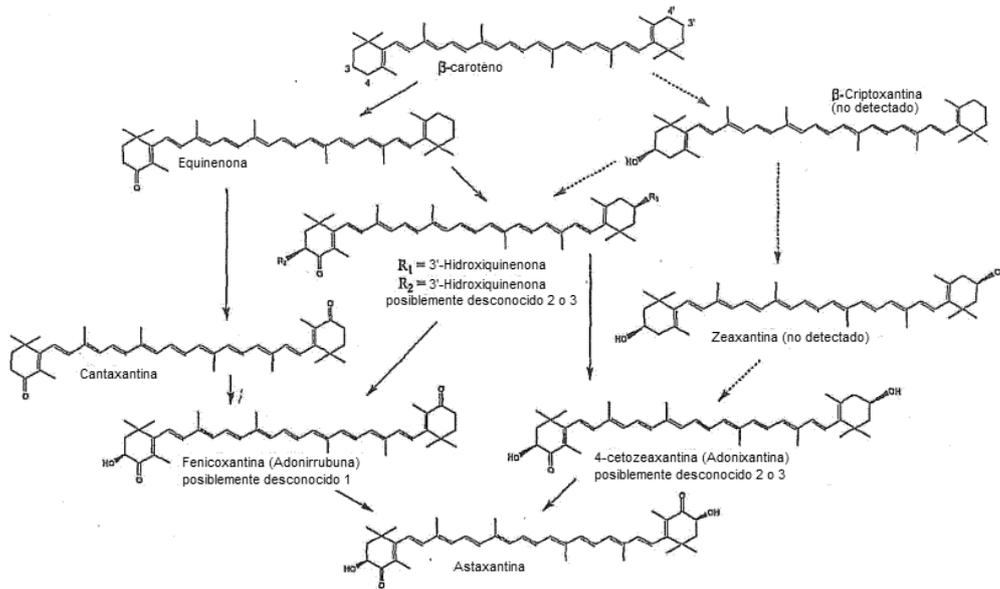


FIGURA 16



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

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

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 68820705 P [0001]
- 10 • US 75140105 P [0001]
- US 5130242 A, Barclay [0033]
- US 6451567 B, Barclay [0035]
- US 6582941 B, Yokochi [0036]
- US 6607900 B, Bailey [0037]
- 15 • US 20040161831 A, Komazawa [0038]
- US 517168 A [0094]
- EP 45665 A [0167]
- US 4897355 A [0176]
- US 20030193102 A [0196]
- 20 • WO 2004041251 A1 [0196]
- US 3610795 A [0200]
- WO 151130012 U4 [0316]
- US 13427562 B [0316]
- WO 11916781 A [0316]
- 25 • WO 0603977 W [0316]
- WO 60688207 A [0316]
- WO 60751401 A [0316]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

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

- TIERS et al. *Nature*, 1978, vol. 273, 113 [0147]
- GREENWAY, P.J. et al. *Gene*, 1982, vol. 18, 355-360 [0147]
- LAIMINS, L. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981, vol. 78, 993 [0148]
- LUSKY, M.L. et al. *Mol. Cell Bio.*, 1983, vol. 3, 1108 [0148]
- 5 • BANERJI, J.L. et al. *Cell*, 1983, vol. 33, 729 [0148]
- OSBORNE, T.F. et al. *Mol. Cell Bio.*, 1984, vol. 4, 1293 [0148]
- SOUTHERN P.; BERG, P. *J Molec. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1,327 [0155]
- MULLIGAN, R.C. ; BERG, P. *Science*, 1980, vol. 209, 1422 [0155]
- SUGDEN, B. et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 410-413 [0155]
- 10 • T.E. CREIGHTON. *Proteins: Structure and Molecular Properties*. W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, 79-86 [0160]
- THORSON et al. *Methods in Mol. Biol.*, 1991, vol. 77, 43-73 [0166]
- ZOLLER. *Curr. Opin. Biotech.*, 1992, vol. 3, 348-354 [0166]
- IBBA. *Biotechnol. Genet. Eng.*, 1995, vol. 13, 197-216 [0166]
- 15 • CAHILL et al. *Trends Biochem. Sci.*, 1989, vol. 14, 400-403 [0166]
- BENNER. *Trends. Biotechnol.*, 1994, vol. 12, 158-163 [0166]
- SPATOLA, A. F. *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*. Marcel Dekker, 1983, 267 [0167]
- SPATOLA, A.F. Peptide Backbone Modifications (general review). *Vega Data*, March 1983, vol. 1 (3 [0167]
- 20 • MORLEY. *Trends Pharm. Sci.*, 1980, 463-468 [0167]
- HUDSON, D. et al. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1979, vol. 14, 177-185 [0167]
- SPATOLA et al. *Life Sci.*, 1986, vol. 38, 1243-1249 [0167]
- HANN. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1982, 1307-314 [0167]
- ALMQUIST et al. *J. Med. Chem.*, 1980, vol. 23, 1392-1398 [0167]
- 25 • JENNINGS-WHITE et al. *Tetrahedron Lett.*, 1982, vol. 23, 2533 [0167]
- HOLLADAY et al. *Tetrahedron Lett.*, 1983, vol. 24, 4401-4404 [0167]
- HRUBY. *Life Sci.*, 1982, vol. 31, 189-199 [0167]
- RIZO ; GIERASCH. *Ann. Rev. Biochem.*, 1992, vol. 61,387 [0169]
- *Methods in Cell Biology*. Academic Press, 1976, vol. XIV, 33 [0175]
- 30 • BRIGHAM et al. *Am JResp Cell Mol Biol*, 1989, vol. 1,95-100 [0176]
- FEIGNER et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, vol. 84, 7413-7 [0176]
- SENTER et al. *Bioconjugate Chem.*, 1991, vol. 2, 447-451 [0201]
- BAGSHAWE, K.D. *Br. J. Cancer*, 1989, vol. 60, 275-281 [0201]
- BAGSHAWE et al. *Br. J. Cancer*, 1988, vol. 58, 700-703 [0201]
- 35 • SENTER et al. *Bioconjugate Chem.*, 1993, vol. 4, 3-9 [0201]
- BATTELLI et al. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1992, vol. 35, 421-425 [0201]
- PIETERSZ; MCKENZIE. *Immunolog. Reviews*, 1992, vol. 129, 57-80 [0201]
- ROFFLER et al. *Biochem. Pharmacol.*, 1991, vol. 42, 2062-2065 [0201]
- HUGHES et al. *Cancer Research*, 1989, vol. 49, 6214-6220 [0201]
- 40 • LITZINGER ; HUANG. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, vol. 1104, 179-187 [0201]
- BROWN ; GREENE. *DNA and Cell Biology*, 1991, vol. 10, 399-409 [0201]
- Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*. Mack Publishing Company, 1995 [0203]
- *Handbook of Monoclonal Antibodies*. Noges Publications, 1985, 303-357 [0211]
- SMITH et al. *Antibodies in Human Diagnosis and Therapy*. Raven Press, 1977, 365-389 [0211]
- 45 • SENTER et al. *Bioconjugate Chem*, 1991, vol. 2, 447-51 [0212]
- BAGSHAWE. *Br J Cancer*, 1989, vol. 60, 275-81 [0212]
- BAGSHAWE et al. *Br J Cancer*, 1988, vol. 58, 700-3 [0212]
- SENTER et al. *Bioconjugate Chem*, 1993, vol. 4, 3-9 [0212]
- BATTELLI et al. *Cancer Immunol Immunother*, 1992, vol. 35, 421-5 [0212]
- 50 • PIETERSZ; MCKENZIE. *Immunolog Reviews*, 1992, vol. 129, 57-80 [0212]
- ROFFLER et al. *Biochem Pharmacol*, 1991, vol. 42, 2062-5 [0212]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0221]
- IKUTA et al. *Ann. Rev. Biochem.*, 1984, vol. 53, 323-356 [0221]
- NARANG et al. *Methods Enzyrnol.*, 1980, vol. 65, 610-620 [0221]
- 55 • NIELSEN et al. *Bioconjug. Chem.*, 1994, vol. 5, 3-7 [0221]
- GRANT GA. *Synthetic Peptides: A User Guide*. W.H. Freeman and Co, 1992 [0222]
- BODANSKY M ; TROST B. *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc, 1993 [0222]
- ABRAHMSEN L et al. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 4151 [0223]
- DAWSON et al. *Science*, 1994, vol. 266, 776-779 [0223]
- 60 • BAGGIOLINI M et al. *FEBS Lett.*, 1992, vol. 307, 97-101 [0223]
- CLARK-LEWIS I et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 16075 [0223]
- CLARK-LEWIS I et al. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 3128 [0223]
- RAJARATHNAM K et al. *Biochemistry*, 1994, vol. 33, 6623-30 [0223]
- SCHNOLZER, M. et al. *Science*, 1992, vol. 256, 221 [0224]
- 65 • LISLE MILTON RC et al. *Techniques in Protein Chemistry IV*. Academic Press, 1992, 257-267 [0224]

- **BLIGH ; DYER.** *Can J. Biochem. Physiol.*, 1959, vol. 37, 912-917 [0295]
- **LEWIS et al.** *J Microbiol. Methods*, 2000, vol. 43, 107-116 [0295]
- **CARTENS et al.** *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, vol. 73, 1025-1031 [0295]
- **PINKART et al.** *J. Microbiol. Methods*, 1998, vol. 34, 9-15 [0295]
- 5 • **BATEMAN ; JENKINS.** *J. Agric. Food Chem.*, 1997, vol. 45, 132-135 [0295]
- **BREMER.** *Marine Mycology - A Practical Approach.* Fungal Diversity Press, 2000, 49-61 [0297]
- **BOWLES et al.** *J Biotechnol*, 1999, vol. 70, 193-202 [0298] [0305] [0315]
- **LEWIS et al.** *J Microbiol Meth.*, 2000, vol. 43, 107-116 [0299]
- **VINDA et al.** *J Eukaryot Microbiol.*, 1999, vol. 46, 637-647 [0301]
- 10 • **MO et al.** *Mar Biol*, 2002, vol. 140, 883-889 [0301]
- **BENSON et al.** *Nucleic Acids Res*, 2005, vol. 33, D34-38 [0301]
- **SAITO ; NEI.** *Mol Biol Evol*, 1987, vol. 4, 406-425 [0301]
- **FELSENSTEIN.** *Evolution*, 1985, vol. 39, 783-791 [0301]
- **LEWIS et al.** *J Microbiol Meth*, 2000, vol. 43, 107-116 [0304]
- 15 • **HUANG et al.** *Mar Biotechnol*, 2003, 5450-457 [0305]
- **BARCLAY et al.** *J App1 Phycol*, 1994, vol. 6, 123-129 [0305]
- **YOKOCHI et al.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, vol. 49, 72-76 [0305] [0312]
- **HUANG et al.** *Mar Biotechnol*, 2003, vol. 5, 450-457 [0306] [0307] [0315]
- **LEANDER; PORTER.** *Mycologia*, 2001, vol. 93, 459-464 [0307]
- 20 • **CARMONA et al.** *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, vol. 67, 884-888 [0307]
- **NAKAHARA et al.** *J Am Oil Chem Soc*, 1996, vol. 73, 1421-1426 [0308] [0309]
- **ELLENBOGEN et al.** *Comp Biochem Physiol*, 1969, vol. 29, 805-81 [0308]
- **ILDA et al.** *J Ferment Bioeng*, 1996, vol. 81, 76-78 [0309] [0311] [0312]
- **VALADON.** *Trans Br Mycol Soc*, 1976, vol. 67, 1-15 [0310]
- 25 • **CARMONA et al.** *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, vol. 67, 884888 [0310]
- **HUANG et al.** *Mar Biotechnol*, 2003, vol. 5, 450457 [0310]
- **SIJTSMA et al.** *Recent Res Devel Microbiol*, 1998, vol. 2, 219-232 [0311]
- **BAJPAI et al.** *JAm Oil Chem Sac*, 1991, vol. 68, 509-514 [0312]
- **LI; WARD.** *Ind Microbiol*, 1994, vol. 13, 238-241 [0312]
- 30 • **AKI et al.** *JAm Oil Chem Soc*, 2003, vol. 80, 789-794 [0312]
- **BAJPAI et al.** *J Am Oil Chem Soc*, 1991, vol. 68, 509-514 [0314]