

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 092**

51 Int. Cl.:

**A01H 9/00** (2006.01)  
**A01H 11/00** (2006.01)  
**C12N 15/52** (2006.01)  
**C12N 5/04** (2006.01)  
**C12N 9/10** (2006.01)  
**C12N 9/00** (2006.01)  
**C12P 7/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2014 PCT/US2014/063682**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15066609**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2014 E 14858679 (5)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 3062607**

54 Título: **Métodos de uso de O-metiltransferasa para la producción biosintética de pterostilbeno**

30 Prioridad:

**01.11.2013 US 201361898899 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.02.2020**

73 Titular/es:

**CONAGEN INC. (100.0%)  
15 Deangelo Drive  
Bedford, Massachusetts 01730, US**

72 Inventor/es:

**BHUIYA, MOHAMMAD, WADUD;  
WANG, YECHUN y  
YU, XIAODAN**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 745 092 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

Métodos de uso de O-metiltransferasa para la producción biosintética de pterostilbeno

5 **Campo técnico**

Esta descripción tiene aplicabilidad en las industrias alimentarias, médicas y farmacéuticas. Esta descripción se refiere, generalmente, a métodos para la producción biosintética de pterostilbeno con el uso de O-metiltransferasa (ROMT).

10 **Antecedentes de la descripción**

**Técnica anterior:** El pterostilbeno es un estilbenoide relacionado químicamente con el resveratrol y se encuentra en los arándanos y las uvas. Pertenece al grupo de fitoalexinas, agentes producidos por plantas para combatir infecciones. Basándose en estudios con animales, se cree que tiene propiedades antineoplásicas, antihipercolesterolémicas, antihipertriglicéridémicas, así como la capacidad de combatir y revertir el declive cognitivo. Se cree que el compuesto también tiene propiedades antidiabéticas, pero hasta el momento se ha estudiado muy poco sobre este problema.

Schmidlin y col. han informado que la resveratrol O-metiltransferasa (ROMT) podría catalizar la conversión directa de resveratrol en pterostilbeno (Schmidli y col, 2008). (N.º de registro: FM178870). El pterostilbeno se produce por la acción de la 4-cumarato-CoA ligasa (4CL), estilbeno sintasa (STS) y resveratrol O-metiltransferasa (ROMT) (Figura 1).

La publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2009/124966 A2 describe un método para preparar un estilbeno, por ejemplo, resveratrol o piceatanol.

La publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2008/009728 A1 describe un microorganismo genéticamente modificado que tiene una ruta metabólica funcional que produce cinamoil-CoA y su uso para producir pinosilvina a partir de los mismos por acción de una estilbeno sintasa.

Watts y col., 2006, BMC Biotechnology 6:22, páginas 1 a 12 describen la biosíntesis de policétidos de estilbeno específicos de plantas en Escherichiacoli metabólicamente modificada.

En la presente memoria, los solicitantes demuestran que la ROMT puede expresarse en un sistema celular junto con 4CL y STS para convertir el resveratrol en pterostilbeno.

35 **Breve resumen de la descripción**

La presente invención se refiere al objeto definido en las reivindicaciones adjuntas.

La descripción resuelve el problema técnico de producir pterostilbeno en un sistema celular, tal como levadura o bacterias. Los solicitantes han aislado exclusivamente los genes de 4-cumarato:coenzima A ligasa (4CL), estilbeno sintasa (STS) y resveratrol O-metiltransferasa (ROMT) y los expresan en un sistema celular que facilita la producción del pterostilbeno. Esta descripción proporciona la producción industrial de resveratrol y pterostilbeno.

La presente descripción es un método biosintético para producir pterostilbeno que comprende expresar una 4-cumarato:coenzima A ligasa (4CL) en un sistema celular, expresar una estilbeno sintasa (STS) en el sistema celular, expresar una resveratrol O-metiltransferasa (ROMT) en el sistema celular, alimentar el ácido p-cumárico al sistema celular, cultivar el sistema celular en un medio y, de ese modo, producir pterostilbeno.

Otra realización es un método biosintético de preparar pterostilbeno que comprende expresar una resveratrol O-metiltransferasa (ROMT) en el sistema celular, alimentar resveratrol al sistema celular, cultivar el sistema celular en un medio, y producir pterostilbeno.

Otra realización es un método biosintético de producir resveratrol que comprende expresar una 4-cumarato:coenzima A ligasa (4CL) en un sistema celular, expresar una estilbeno sintasa (STS) en el sistema celular, alimentar ácido p-cumárico al sistema celular, cultivar el sistema celular en un medio, y producir resveratrol.

Otra realización es un método biosintético para fabricar pterostilbeno que comprende expresar una 4-cumarato:coenzima A ligasa (4CL) en un primer sistema celular, expresar una estilbeno sintetasa (STS) exógena en el primer sistema celular, alimentar ácido p-cumárico al primer sistema celular, cultivar el primer sistema celular en un medio, producir resveratrol, expresar una resveratrol O-metiltransferasa (ROMT) en un segundo sistema celular, alimentar el resveratrol producido al segundo sistema celular, cultivar el segundo sistema celular en un medio, y producir pterostilbeno.

65 **Breve descripción de los dibujos**

Para una mejor comprensión de la presente descripción, se puede hacer referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 muestra la ruta biosintética de pteroesetilbano.

La Figura 2 muestra los perfiles de HPLC de tres patrones (ácido p-cumárico, resveratrol y pteroesetilbano).

La Figura 3 muestra perfiles de HPLC de extractos de células de *E. coli* que expresan el gen de fusión 4CL::STS.

La Figura 4 muestra perfiles de HPLC de extractos de células de *E. coli* que expresan el gen ROMT.

La Figura 5 muestra perfiles de HPLC de extractos de células de *E. coli* que expresan simultáneamente los genes 4CL::STS y ROMT.

La Figura 6 muestra perfiles de HPLC de extractos de células de levadura que expresan el gen de fusión 4CL::STS.

La Figura 7 muestra perfiles de HPLC de extractos de células de levadura que expresan el gen ROMT.

La Figura 8 muestra perfiles de HPLC de extractos de células de levadura que expresan simultáneamente los genes 4CL::STS y ROMT.

La Figura 9 muestra un modelo de ROMT representado por cintas. Los sustratos se representan mediante un modelo de palotes en color gris oscuro. Los restos de unión al sustrato se representan mediante un modelo de palotes en color negro.

F167A, D174A, W258A, H261A (H261 es un aminoácido clave) son los cambios realizados. Todos son aminoácidos clave para la actividad de H261 que es lo más importante.

La Figura 10 muestra perfiles de HPLC de extractos de células de *E. coli* que expresan el gen ROMT natural y el ROMT mutante.

Aunque la descripción es susceptible de diversas modificaciones y formas alternativas, las realizaciones específicas de las mismas se han mostrado a manera de ejemplo en los dibujos, y se describirán con detalle en la presente memoria. Debe entenderse, sin embargo, que los dibujos y la descripción detallada presentada en la presente memoria no pretenden limitar la descripción a la realización particular descrita.

### Descripciones detalladas de la descripción

#### Definición

##### Sistema celular

El sistema celular es cualquier célula que proporcione la expresión de proteínas ectópicas. Incluye bacterias, levaduras, células vegetales y células animales. Incluye tanto células procariontas como eucariotas. También incluye la expresión in vitro de proteínas basadas en componentes celulares, tales como ribosomas.

##### Cultivo del sistema celular

El cultivo incluye proporcionar un medio que permita a las células multiplicarse y dividirse. También incluye proporcionar recursos de manera que las células o componentes celulares puedan traducir y fabricar proteínas recombinantes.

##### Transfección

La transfección es el proceso de introducir deliberadamente ácidos nucleicos en células. El término se usa, frecuentemente, para métodos no víricos en células eucariotas. También puede referirse a otros métodos y tipos de células, aunque se prefieren otros términos: "transformación" se usa con mayor frecuencia para describir la transferencia de ADN no vírico a bacterias, células eucariotas no animales, que incluyen células vegetales. En células animales, transfección es el término preferido ya que transformación también se usa para referirse a la progresión a un estado canceroso (carcinogénesis) en estas células. Transducción se usa, frecuentemente, para describir la transferencia de ADN mediada por virus. La transformación, transducción e infección vírica se incluyen en la definición de transfección para esta solicitud.

##### Aminoácidos modificados

Un aminoácido modificado es aquel que se ha modificado químicamente y se puede incorporar como parte de una secuencia de polipéptidos. El aminoácido puede modificarse de una manera postraduccional o antes de su incorporación a la secuencia del polipéptido durante la traducción.

4CL

El 4-cumarato:coenzima A ligasa se expresa a partir de un gen *4CL* clonado de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia-0). En otra realización, la 4-cumarato coenzima A ligasa se expresa a partir de un gen que tiene una identidad de secuencia de al menos 66 % con un gen *4CL* clonado de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia-0). En otra realización, el 4-cumarato:coenzima A ligasa se expresa a partir de un gen que tiene una similitud de secuencia de al menos 90 % con un gen *4CL* clonado de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia-0).

STS

La estilbeno sintasa se expresa a partir de un gen *STS* clonado a partir de uva (*Vitis vinifera*). En otra realización, la estilbeno sintasa se expresa a partir de un gen que tiene una identidad de secuencia de al menos 66 % con un gen *STS* clonado a partir de uva (*Vitis vinifera*). En otra realización, la estilbeno sintetasa se expresa a partir de un gen que tiene una secuencia de al menos 90 % de similitud con un gen *STS* clonado a partir de uva (*Vitis vinifera*).

ROMT

La resveratrol O-metiltransferasa se expresa a partir de un gen clonado de uva (*Vitis vinifera*). En otra realización, la resveratrol O-metiltransferasa se expresa a partir de un gen que tiene una identidad de secuencia de al menos 66 % con un gen *ROMT* clonado a partir de uva (*Vitis vinifera*). En otra realización, la resveratrol O-metiltransferasa se expresa a partir de un gen que tiene una similitud de secuencia de al menos 90 % con un gen *ROMT* clonado a partir de uva (*Vitis vinifera*).

Una realización de la presente descripción es un método biosintético para producir pteroesstilbeno que incluye expresar una 4-cumarato:coenzima A ligasa (*4CL*) en un sistema celular, expresar una estilbeno sintasa (*STS*) en el sistema celular, expresar una resveratrol O-metiltransferasa (*ROMT*) en el sistema celular, alimentar el ácido p-cumárico al sistema celular, cultivar el sistema celular en un medio y producir pteroesstilbeno.

En una realización, expresar la 4-cumarato:coenzima A ligasa y expresar la estilbeno sintasa comprende transfectar un gen de fusión *4CL::STS*. En otra realización, expresar la 4-cumarato:coenzima A ligasa comprende transfectar un gen *4CL* y expresar la estilbeno sintasa comprende transfectar un gen *STS* independiente. Expresar la resveratrol O-metiltransferasa comprende transfectar un gen *ROMT*.

El sistema celular se selecciona del grupo que consiste en al menos bacterias, levaduras, y una combinación las mismas. En otra realización, el sistema celular permite una reacción biosintética ectópica.

Una realización adicional es un método biosintético de preparar pteroesstilbeno que comprende expresar una resveratrol O-metiltransferasa (*ROMT*) en el sistema celular, alimentar resveratrol al sistema celular, cultivar el sistema celular en un medio, y producir pteroesstilbeno.

Una realización adicional es un método biosintético de producir resveratrol que comprende expresar una 4-cumarato:coenzima A ligasa (*4CL*) en un sistema celular, expresar una estilbeno sintasa (*STS*) en el sistema celular, alimentar ácido p-cumárico al sistema celular, cultivar el sistema celular en un medio, y producir resveratrol.

Una realización adicional es un método biosintético para fabricar pteroesstilbeno que comprende expresar una 4-cumarato:coenzima A ligasa (*4CL*) en un primer sistema celular, expresar una estilbeno sintetasa (*STS*) exógena en el primer sistema celular, alimentar ácido p-cumárico al primer sistema celular, cultivar el primer sistema celular en un medio, producir resveratrol, expresar una resveratrol O-metiltransferasa (*ROMT*) en un segundo sistema celular, alimentar el resveratrol al segundo sistema celular, cultivar el segundo sistema celular en un medio, y producir pteroesstilbeno.

Materiales y métodos

Cepas, plásmidos y condiciones de cultivo

Se usaron HI-Control 10G y DH5 $\alpha$  para la clonación del plásmido, y se usó BL21 (DE3) (Invitrogen) para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. La cepa pWat11 se utilizó para la expresión de proteínas en levadura. Los patrones de ácido p-cumárico, resveratrol y el pteroesstilbeno se adquirieron de Sigma. El vector pETite N-His SUMO Kan se adquirió de Lucigen (Middleton, WI). El plásmido pETDuet-1 se adquirió de Novagen y se usó para expresar proteínas recombinantes.

Manipulación del ADN

Todas las manipulaciones del ADN se realizaron de acuerdo con los procedimientos estándar. Las enzimas de restricción y la T4 ADN ligasa se adquirieron de New England Biolabs. Todas las reacciones de amplificación por PCR y clonación se llevaron a cabo utilizando ADN polimerasa Phusion $\text{®}$  High-Fidelity de New England Biolabs.

## Extracción de ARN y síntesis de ADNc

ROMT (resveratrol O-metiltransferasa), 4CL (4-cumarato:coenzima A ligasa) y STS (estilbeno sintasa) se clonaron a partir de varias especies de plantas. El ARN total vegetal se extrajo de uva (*Vitis vinifera*) para la clonación de ROMT y STS y de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia-0) para la clonación de 4CL con el kit de purificación de ARN Trizol Plus (Invitrogen Inc). La síntesis de ADNc se llevó a cabo con el sistema de transcripción inversa Im Prom-II™ de Promega Inc. según el manual del fabricante. Los genes se amplificaron a partir del ADNc sintetizado con el kit New England Biolabs Phusion PCR con los cebadores relacionados en la Tabla 1.

## Ejemplo 1

## Construcción del vector de expresión bacteriano

El producto de la PCR de ROMT se clonó en el vector pETite N-His SUMO Kan (LucigenInc) según el manual del fabricante. El plásmido resultante con la inserción correcta se confirmó mediante secuenciación, especialmente Sumo-ROMT, y se transformó en BL21 (DE3) para la expresión del gen heterogéneo.

Para construir el gen de fusión 4CL::STS, se fusionaron At4CL y VvSTS mediante una estrategia de amplificación por PCR. Se eliminó el codón de terminación de 4CL y se introdujo un conector de tres aminoácidos (Gly-Ser-Gly) entre el marco de lectura abierto de 4CL y STS. Esta construcción dio como resultado un constructo de genes fusionado de 2,87 kb que codifica 4CL, el enlazador tripeptídico, y STS. El gen de fusión 4CL::STS clonado en el vector de entrada Gateway usando el Kit de clonación pCR8/GW/TOPO TA (Invitrogen) se transformó en células *E. coli* One Shot, y a continuación se secuenciaron. El gen de fusión 4CL::STS se amplificó y clonó en el sitio de clonación múltiple del vector pETDuet-1 mediante BamHI/hindIII, de nombre pETDuet-4CLSTS. Los cebadores de todas las reacciones de clonación se encuentran disponibles en la Tabla 1.

## Ejemplo 2

## Construcción del vector de expresión de levadura

El gen 4CL::STS se introdujo en el vector de destino pAG304GPD-ccdB de Advanced Gateway de *S. cerevisiae* (Addgene, Boston, MA), y el gen ROMT se intercambió en otro vector de destino de Gateway, el pAG305GPD - ccdB (Addgene) por de LR clonase II de mezcla enzimática de kit (de Invitrogen). Los plásmidos resultantes se denominaron pAG304GPD-4CLSTS y pAG304GPD-ROMT. Los vectores contienen un lado de recombinación integradora y un casete de expresión bajo el control de un promotor constitutivo (GPD). Estos vectores se transformaron en WAT11 para los ensayos de fermentación.

## Transformación de levadura

Los constructos pAG304GPD-4CLSTS y pAG304GPD-ROMT, junto con los vectores pAG304GPD-ccdB y pAG305GPD- ccdB como controles, se transformaron en células WAT11 con el kit de transformación Frozen-EZ Yeast Transformation II (Zymo Research, Orange, CA). Los vectores, pAG304GPD-4CLSTS y pAG304GPD-ROMT, se transformaron simultáneamente en células de levadura WAT11.

## Modelado de homología y acoplamiento para predecir los restos de unión al sustrato de ROMT

Según el conocimiento de los solicitantes, no hay ninguna estructura terciaria de ROMT que pueda utilizarse para el análisis de los sitios de unión al sustrato. Para analizar el sitio de unión al sustrato, los solicitantes generaron un modelo de ROMT (Figura 9) con el programa informático I-TASSER (Ambrishycol.,2010).

Los solicitantes aplican un método combinado de biología molecular y biología estructural para la evolución y desarrollo en laboratorio de ROMT mejorada. El sitio de unión al sustrato se pronosticó acoplado el resveratrol al modelo de ROMT usando el programa informático SWISDOCK (Grosdidiercol.,2011).

Bioconversión de ácido *p*-cumárico en resveratrol con la proteína de la proteína de fusión 4CL::STS en *E. coli* y *S. cerevisiae*

Una colonia individual de la cepa de *E. coli* se cultivó en 3 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina durante la noche a 37 °C, y a continuación el cultivo sembrado se transfirió a 50 ml de medio modificado M9 con 100 µg/ml de ampicilina. *E.coli* BL21(DE3) que contenía el vector pETDuet-4CLSTS se mantuvo en agitación a 200 rpm a 37 °C en medio M9 modificado hasta que la DO600 alcanzó un valor de 0,6, a continuación se añadió IPTG 1 mM, después de 2 horas de inducción con IPTG, se añadió ácido *p*-cumárico disuelto en etanol al 100 % al cultivo a 0,5 g/l. El cultivo se mantuvo en agitación en la misma condición de cultivo, y se tomaron muestras en el intervalo para análisis por HPLC.

Las células Wat11 que contenían el plásmido pAG304GPD-4CLSTS se cultivaron en medio de goteo SD a 30 °C hasta que la DO600 alcanzó un valor de 0,2, después se añadió ácido *p*-cumárico (0,5 g/l). El cultivo se mantuvo en agitación durante 4 días en la misma condición de cultivo, y se tomaron muestras en el intervalo para análisis por HPLC.

#### 5 Bioconversión de resveratrol a pterostilbeno con la proteína de RQMT en *E.coli* y *S. cerevisiae*

E.coli BL21(DE3) que contenía el vector SUMO-RMOT se cultivó en medio M9 modificado a 37 °C hasta que la DO600 alcanzó un valor de 0,6, a continuación se añadió IPTG 1 mM, después de 2 horas de inducción con IPTG, se añadió resveratrol disuelto en DMSO al cultivo a 0,228 g/ml. El medio M9 se modificó añadiendo extracto de levadura (1,25 g/l) y glicerol (0,5 % v/v) en medio M9 estándar. El cultivo se mantuvo en agitación en la misma condición de cultivo, y se tomaron muestras en el intervalo para análisis por HPLC.

Las células Wat11 que contenían el plásmido pAG305GPD-RMOT se cultivaron en medio estándar de goteo de levadura a 30 °C hasta que la DO600 alcanzó un valor de 0,2, después se añadió ácido resveratrol (0,228 g/l).

El cultivo se mantuvo en agitación en la misma condición de cultivo, y se tomaron muestras en el intervalo para análisis por HPLC.

#### 20 Bioconversión de ácido *p*-cumárico en pterostilbeno con la proteína de ROMT y la proteína de fusión 4CL::STS en *E. coli* y *S. cerevisiae*

E.coli BL21(DE3) que contenía los vectores pETDuet-4CLSTS y SUMO-ROMT se cultivó en medio M9 modificado a 37 °C hasta que la DO600 alcanzó un valor de 0,6, a continuación se añadió IPTG 1 mM, después de 2 horas de inducción con IPTG, se añadió ácido *p*-cumárico disuelto en 100 % etanol al cultivo a 0,5 g/l. El cultivo se mantuvo en agitación en la misma condición de cultivo, y se tomaron muestras en el intervalo para análisis por HPLC.

Las células Wat11 que contenían los plásmidos pAG304GPD-4CLSTS y pAG305GPD-ROMT se cultivaron en medio de goteo SD a 30 °C hasta que la DO600 alcanzó un valor de 0,2, después se añadió ácido *p*-cumárico (0,5 g/l). El cultivo se mantuvo en agitación en la misma condición de cultivo, y se tomaron muestras en el intervalo para análisis por HPLC.

#### 30 Extracción de productos

Se extrajeron alícuotas de cultivos (400 ul) con 800 ul de acetato de etilo. Los extractos se evaporaron a sequedad en un Eppendorf Vacufuge (Eppendorf Scientific Westbury, NY) a temperatura ambiente y se volvieron a disolver en 200 ul de metanol al 80 % (v/v).

#### Análisis por HPLC.

El análisis por HPLC de resveratrol y pterostilbeno se llevó a cabo con el sistema Dionex Ultimate 3000. Los productos intermedios se separaron mediante cromatografía en fase inversa en una columna Phenomenex Kinetex C18 (tamaño de partícula 2,6 µm; 150 x 4,6 mm) con 0,1 % (vol/vol) de ácido fórmico (solución A) y 100 % de acetonitrilo (solución B). Las muestras se diluyeron en metanol al 80 % y se usó el siguiente procedimiento de gradiente: 10 % de solución B durante 2 min; un gradiente lineal de 10 % a 70 % de solución B durante 18 min; de 70 % a 30 % de solución B durante 1 min; de 30 % a 10 % de solución B durante 2 min; 10 % de solución B durante 5 min a un caudal de 0,8 ml/min. Para la cuantificación, todos los productos intermedios se calibraron con patrones externos. Los compuestos se identificaron por sus tiempos de retención, así como sus espectros correspondientes, que se identificaron con un detector de matriz de diodos en el sistema.

#### 50 Resultados

##### Bioconversión del ácido *p*-cumárico en resveratrol con la proteína de fusión de 4CL y STS

Se analizaron tres patrones mediante HPLC, lo que demuestra que estaban bien separados (Figura 2). Con la estrategia de amplificación por PCR, se fusionaron 4CL y STS con un enlace de Gly-Ser-Gly entre 4CL y STS. Los solicitantes estudiaron la conversión de ácido *p*-cumárico en resveratrol con la cepa BL21(DE3) de *E. coli* que contenía el plásmido pETDuet-4CLSTS en un medio M9 modificado en los matraces. Según muestra la Figura 3, el ácido *p*-cumárico podría convertirse en resveratrol en un medio M9 modificado.

Para el ensayo de levadura in vivo, colonias de levadura fresca que contenían pAG304GPD-4CLSTS se cultivaron a 30 °C en 3 ml de medio de goteo de levadura que contenía 0,5 g/l de ácido *p*-cumárico durante 4 días. Los extractos se analizaron por HPLC. Según muestra la Figura 6, casi todo el ácido *p*-cumárico se convirtió en resveratrol en un plazo de 4 días. En comparación con *E. coli*, la eficiencia de conversión en levadura fue mucho mejor.

65

Bioconversión de resveratrol a pterostilbeno con la proteína de ROMT

Según muestra la Figura 4, el resveratrol alimentado al cultivo de *E. coli* con la expresión de ROMT se convirtió en pterostilbeno en el matraz. El análisis por HPLC indica que el resveratrol se puede convertir en pterostilbeno en el matraz. Sin embargo, aparece otro pico desconocido, que probablemente es el que tiene un grupo metilo añadido al resveratrol. También se obtuvieron resultados similares con levadura (Figura 7).

Bioconversión del ácido p-cumárico en pterostilbeno con expresión simultánea de 4CL::STS y ROMT

Se alimentó ácido p-cumárico al cultivo de *E. coli* y *S. cerevisiae* con la expresión simultánea de 4CL::STS y ROMT, según muestra la Figura 5 y la Figura 8, el ácido p-cumárico se convirtió en resveratrol y pterostilbeno en el matraz según la HPLC en 24 h en *E. coli* y *S. cerevisiae*. Se obtuvieron los perfiles de HPLC con la condición en un plazo de 96 horas.

Mutagénesis convencional y de saturación de ROMT

Después de haber analizado cuidadosamente el sitio de unión al sustrato, los restos de aminoácido 167, 174, 258, y 261 se seleccionan para mutagénesis de saturación para mejorar la actividad de ROMT. Los solicitantes ya habían realizado la mutagénesis convencional para construir los mutantes de ROMT denominados F167A, D174A, W258A, y H261A, para conocer su efecto sobre la actividad enzimática. Ninguno de ellos muestra actividad salvo D174A, que mostró actividad muy baja (Figura 10). Este resultado sugiere que los restos de aminoácido en los sitios 167, 174, 258 y 261 son importantes para la unión al sustrato y la actividad catalítica. Por tanto, la siguiente etapa de los solicitantes será la mutagénesis de saturación dirigida al sitio para mejorar la actividad enzimática de ROMT. La mutagénesis de saturación permite cambiar un aminoácido por otro de los 19 restos de aminoácidos alternativos. Los solicitantes realizarán la mutagénesis de saturación en el sitio 167, 174, 258, y 261 de ROMT siguiendo la estrategia de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange (Stratagene, CA) con el uso de cebadores degenerados NNK (N representa la mezcla de A, T, G, C y K por G/T). El codón NNK tiene una capacidad de degeneración de 32 veces, y codifica los 20 aminoácidos sin codones raros. La mezcla de PCR (25 µl) compuesta de tampón Phusion HF que contenía 60 ng de la plantilla de ADN Sumo-ROMT, dNTPS200 µM, cebadores directos 0,5 µM, cebadores inversos 0,5 µM, DMSO al 5 % y 0,3 µl de polimerasa. La PCR se realizó mediante desnaturalización al 98 °C durante 20 s, hibridación a 58 °C durante 30 s y seguido de alargamiento a 72 °C durante 2 min 30 s durante 25 ciclos. Los productos de PCR QuikChange se examinaron por electroforesis en gel de agarosa y después se digirieron 15 µl de productos de la PCR con 1 µl de DpnI (New England BioLabs) a 37° durante 4 horas para eliminar el plásmido de plantilla. Se añadió una alícuota de (2 µl) de los productos de digestión a digestivos 50 µl de células competentes BL21 (DE3) (Stratagene, CA), se mantuvieron en hielo durante 30 min. Después de esto, se realizó un choque térmico a 42 °C durante 20 s, se mantuvieron sobre hielo durante 2 min y después se añadieron 500 µl de medio SOC y las células se cultivaron a 37 °C durante 1 h. Las células se centrifugaron a 5000 rpm durante min, se descartaron 450 µl de sobrenadante y las células se suspendieron con el resto del medio SOC y se inocularon en placas de agar Luria-Bertani (LB) que contenían kanamicina (50 µg/ml). Los inventores aislarán el plásmido y secuenciarán el ADN para confirmar el mutante. Los inventores confirmarán la calidad de la biblioteca mediante secuenciación del ADN.

Tabla 1. Cebadores usados en este estudio

Nombre	Secuencia (5'-3')
SumoROMTF	CGC GAA CAG ATT GGA GGT GAT TTG GCA AAC GGT GTG ATA TCA GC
SumoROMTR	GTG GCG GCC GCT CTA TTA TCA AGG ATA AAC CTC AAT GAG GGA CC
ROMTF	ATG GAT TTG GCA AAC GGT GTG ATA TC
ROMTR	TCA AGG ATA AAC CTC AAT GAG GGA CC
4CL-F	ATG GCG CCA CAA GAA CAA GCA GTT TC
4CLSTS-LinkF	GAG GGC AAA ACT AGC AAA TGG ATT GGG ATC TGG CAT GGC TTC AGT CGA GGA ATT TAG AA
4CLSTS-LinkR	TTC TAA ATT CCT CGA CTG AAG CCA TGC CAG ATC CCA ATC CAT TTG CTA GTT TTG CCC TC
STS-R	TTA ATT TGT AAC CAT AGG AAT GCT ATG
4CL-BamHIF	CGG GAT CCA TGG CGC CAC AAG AAC AAG CAG TTT C
STS-HindIIIR	CCC AAG CTT TTA ATT TGT AAC CAT AGG AAT GCT ATG
OligodT (22)	TTT TTTTTTTTTTTTTTTT TTV N

Identidad y similitud

La identidad es la fracción de aminoácidos que son iguales entre un par de secuencias después de un alineamiento de las secuencias (que pueden realizarse exclusivamente mediante el uso de información de secuencias o información estructural o alguna otra información, pero que habitualmente está basada solamente en la información de la secuencia) y la similitud es la puntuación asignada en función de una alineación con el uso de alguna matriz de similitud. El índice de similitud puede ser uno cualquiera de los siguientes BLOSUM62, PAM250, o GONNET, o cualquier matriz usada por el experto en la técnica para el alineamiento de secuencias de proteínas.

5 La identidad es el grado de correspondencia entre dos subsecuencias (sin huecos entre las secuencias). Una identidad de 25 % o mayor implica la similitud de funciones, mientras que 18-25 % implica similitud de estructura o función. Se debe tener en cuenta que dos secuencias completas no relacionadas o aleatorias (con más de 100 restos) pueden tener una identidad mayor del 20 %. La similitud es el grado de semejanza entre dos secuencias cuando se comparan entre sí. Esto depende de su identidad.

10 Como es evidente a partir de la descripción anterior, ciertos aspectos de la presente descripción no están limitados por los detalles particulares de los ejemplos ilustrados en la presente memoria descriptiva y, por tanto, se contempla que los expertos en la técnica idearán otras modificaciones y aplicaciones, o equivalentes de las mismas.

15 Además, salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende normalmente el experto en la técnica a la que pertenece la descripción. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria se pueden usar en la práctica o ensayos de la presente descripción, los métodos y materiales preferidos se han descrito anteriormente.

#### Referencias

20 Schmidlin L, Poutaraud A, Claudel P, Mestre P, Prado E, Santos-Rosa M, Wiedemann-Merdinoglu S, Karst F, Merdinoglu D, Hugueney P (2008) A stress-inducible resveratrol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiol.* 148(3): 1630-1639.

25 Ambrish R, Alper K, Yang Z (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5:725-738.

Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. (2011) SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADockDSS. *JNucleic Acids Res.* 39:W270-277.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Conagen  
 <120> Métodos de uso de O-metiltransferasa para la producción biosintética de pterostilbeno  
 <130> 515281.12  
 <140> PCT  
 <141> 2014-11-02  
 <160> 19  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 1  
 cgcgaaacaga ttggaggtga tttggcaaac ggtgtgatat cagc 44  
 <210> 2  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 2  
 gtggcgccg ctctattatc aaggataaac ctcaatgagg gacc 44  
 <210> 3  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 3  
 atggatttgg caaacggtgt gatatc 26  
 <210> 4  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 4  
 tcaagataa acctcaatga gggacc 26

<210> 5  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 5  
 atggcgccac aagaacaagc agtttc 26  
  
 <210> 6  
 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 6  
 gagggcaaaa ctagcaaatg gattgggatc tggcatggct tcagtcgagg aatttagaa 59  
  
 <210> 7  
 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 7  
 ttctaaattc ctcgactgaa gccatgccag atoccaatcc atttgctagt tttgcctc 59  
  
 <210> 8  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 8  
 ttaatttgta accataggaa tgctatg 27  
  
 <210> 9  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 9  
 cgggatccat ggcgccacaa gaacaagcag tttc 34  
  
 <210> 10  
 <211> 36

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 10  
 cccaagcttt taatttgtaa ccataggaat gctatg 36  
  
  
 <210> 11  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (22)..(22)  
 <223> n e s a , c , g , o t  
  
 <400> 11  
 tttttttttt tttttttttt vn 22  
  
  
 <210> 12  
 <211> 1074  
 <212> ADN  
 <213> Vitis vinifera  
  
 <400> 12  
 atggatttgg caaacggtgt gatatcagct gagctgcttc atgctcaagc tcatgtctgg 60  
 aatcatatat tcaacttcat aaagtctatg tcaactaaaat gtgctattca actaggcatac 120  
 ccagacatca tccacaacca tggcaagccc atgactcttc ctgagctagt cgctaagctc 180  
 ccagtcacacc ctaaaaggag tcagtgcgtg taccgtctca tgcgcattct tgttcattct 240  
 ggcttccttg ctgcgcaaag agtccaacaa ggtaaggaag aggaggggta tgtgcttaca 300  
 gatgcctcta ggctccttct aatggatgac tccttgagca taaggccctt ggtgcttgcc 360  
 atgctcgacc caattttaac taaacatgg cattatctga gtgcttggtt tcaaaatgat 420  
 gatcccactc cgttccacac tgctcatgag cggtcatttt gggattatgc cggccatgaa 480  
 cccagctca acaattcctt caatgaagcc atggctagcg atgctcgctt actcaccagc 540  
 gtgctgctta aggagggcca gggcgtatth gcggggttga actcattagt tgatgtaggg 600  
 ggtggcaccg gaaaagtggc caaggccatt gctaacgctt tcccacattt gaactgcacc 660  
 gtgttagatc tccccacgt ggttgctggc ttgcaaggga gcaagaactt gaactacttt 720  
 gcaggtgata tgtttgaggc aattcctcct gcagacgcaa ttttactcaa gtggatactg 780  
 cacgactgga gcgatgaaga atgcgtgaag atactaaagc gatgcagggga agcaattccg 840  
 agcaaggaaa acggaggaaa ggtgattatc atagacatga tcatgatgaa gaatcaagga 900

ES 2 745 092 T3

gactacaagt ccacagaaac acagctgttc tttgatatga cgatgatgat tttcgccccg 960  
 ggtagagaga gggacgagaa cgaatgggag aagctattct tggatgctgg tttcagtcac 1020  
 tacaagataa ctcccatttt gggtttgagg tccctcattg aggtttatcc ttga 1074

<210> 13  
 <211> 357  
 <212> PRT  
 <213> Vitis vinifera

<400> 13

Met Asp Leu Ala Asn Gly Val Ile Ser Ala Glu Leu Leu His Ala Gln  
 1 5 10 15

Ala His Val Trp Asn His Ile Phe Asn Phe Ile Lys Ser Met Ser Leu  
 20 25 30

Lys Cys Ala Ile Gln Leu Gly Ile Pro Asp Ile Ile His Asn His Gly  
 35 40 45

Lys Pro Met Thr Leu Pro Glu Leu Val Ala Lys Leu Pro Val His Pro  
 50 55 60

Lys Arg Ser Gln Cys Val Tyr Arg Leu Met Arg Ile Leu Val His Ser  
 65 70 75 80

Gly Phe Leu Ala Ala Gln Arg Val Gln Gln Gly Lys Glu Glu Glu Gly  
 85 90 95

Tyr Val Leu Thr Asp Ala Ser Arg Leu Leu Leu Met Asp Asp Ser Leu  
 100 105 110

Ser Ile Arg Pro Leu Val Leu Ala Met Leu Asp Pro Ile Leu Thr Lys  
 115 120 125

Pro Trp His Tyr Leu Ser Ala Trp Phe Gln Asn Asp Asp Pro Thr Pro  
 130 135 140

Phe His Thr Ala His Glu Arg Ser Phe Trp Asp Tyr Ala Gly His Glu  
 145 150 155 160

Pro Gln Leu Asn Asn Ser Phe Asn Glu Ala Met Ala Ser Asp Ala Arg  
 165 170 175

Leu Leu Thr Ser Val Leu Leu Lys Glu Gly Gln Gly Val Phe Ala Gly  
 180 185 190

ES 2 745 092 T3

Leu Asn Ser Leu Val Asp Val Gly Gly Gly Thr Gly Lys Val Ala Lys  
 195 200 205

Ala Ile Ala Asn Ala Phe Pro His Leu Asn Cys Thr Val Leu Asp Leu  
 210 215 220

Pro His Val Val Ala Gly Leu Gln Gly Ser Lys Asn Leu Asn Tyr Phe  
 225 230 235 240

Ala Gly Asp Met Phe Glu Ala Ile Pro Pro Ala Asp Ala Ile Leu Leu  
 245 250 255

Lys Trp Ile Leu His Asp Trp Ser Asp Glu Glu Cys Val Lys Ile Leu  
 260 265 270

Lys Arg Cys Arg Glu Ala Ile Pro Ser Lys Glu Asn Gly Gly Lys Val  
 275 280 285

Ile Ile Ile Asp Met Ile Met Met Lys Asn Gln Gly Asp Tyr Lys Ser  
 290 295 300

Thr Glu Thr Gln Leu Phe Phe Asp Met Thr Met Met Ile Phe Ala Pro  
 305 310 315 320

Gly Arg Glu Arg Asp Glu Asn Glu Trp Glu Lys Leu Phe Leu Asp Ala  
 325 330 335

Gly Phe Ser His Tyr Lys Ile Thr Pro Ile Leu Gly Leu Arg Ser Leu  
 340 345 350

Ile Glu Val Tyr Pro  
 355

- <210> 14
- <211> 1686
- <212> ADN
- <213> Arabidopsis thaliana

<400> 14  
 atggcgccac aagaacaagc agtttctcag gtgatggaga aacagagcaa caacaacaac 60  
 agtgacgtca ttttccgatc aaagttaccg gatatttaca tcccgaacca cctatctctc 120  
 cacgactaca tcttccaaaa catctccgaa ttcgccacta agccttgccct aatcaacgga 180  
 ccaaccggcc acgtgtacac ttactccgac gtccacgtca tctcccgcc aatcgccgcc 240  
 aattttcaca aactcggcgt taaccaaaac gacgtcgtca tgctcctcct cccaaactgt 300  
 cccgaattcg tcctctcttt cctcgcgcc tccttccgcy gcgcaaccgc caccgcccga 360  
 aaccctttct tcaactccggc ggagatagct aaacaagcca aagcctccaa caccaaactc 420

ES 2 745 092 T3

ataatcaccg aagctcgтта cgtcgacaaa atcaaaccac ttcaaaacga cgacggagta 480  
 gtcacгtct gcatcgacga caacgaatcc gtgccaatcc ctgaaggctg cctccgcttc 540  
 accgagttga ctcaгtcgac aaccgaggca tcagaagtca tcgactcggt ggagatttca 600  
 ccggacgacg tggтggcact accttactcc tctggcacga cgggattacc aaaaggagtg 660  
 atgctgactc acaaggгact agtcacgagc gttgctcagc aagtcgacgg cgagaaccgg 720  
 aatctttatt tccacagcga tgacгtcata ctctgtgttt tgcccatgtt tcatatctac 780  
 gctttgaaсt cgatcatgtt gtgtggtctt agagttggтg cggcgattct gataatgсcg 840  
 aagtttgaga tcaatctgct attggagctg atccagaggt gtaaagtgac ggtggctccg 900  
 atggttccgc cgattgtgtt ggccattgсg aagtcctcgg agacggagaa gtatgatttg 960  
 agctcgataa gagtggtgaa atctggtgct gctcctcttg gtaaagaact tgaagatgcc 1020  
 gttaatgcca agtttcctaa tgccaaactc ggtcagggat acggaatgac ggaagcaggt 1080  
 ccagtgctag caatgtcgtt aggttttgca aaggaaсctt ttccggttaa gtcaggagct 1140  
 tgtggtactg ttgтааgaaa tgctgagatg aaaatagttg atccagacac cggagattct 1200  
 ctttcgagga atcaaccсgg tgagatttgt attcgtggtc accagatcat gaaaggttac 1260  
 ctcaacaatc cggcagctac agcagagacc attgataaag acggttggtc tcatactgga 1320  
 gatattggat tgatcgatga cgatgacgag cttttcatcg ttgatcgatt gaaagaactt 1380  
 atcaagtata aaggttttca ggtagctccg gctgagctag aggctttgct catcggtcat 1440  
 cctgacatta ctgatgttgс tgttgtcgca atgaaagaag aagcagctgg tgaagttcct 1500  
 gttgcatttg tggтgaaatc gaaggattcg gagttatcag aagatgatgt gaagcaattc 1560  
 gtgtcgaaac aggttggtt ttacaagaga atcaacaaag tgttcttcac tgaatccatt 1620  
 cctaaagctc catcagggaa gatattgagg aaagatctga gggcaaaact agcaaatgga 1680  
 ttgtga 1686

<210> 15  
 <211> 561  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 15

Met Ala Pro Gln Glu Gln Ala Val Ser Gln Val Met Glu Lys Gln Ser  
 1 5 10 15

Asn Asn Asn Asn Ser Asp Val Ile Phe Arg Ser Lys Leu Pro Asp Ile  
 20 25 30

Tyr Ile Pro Asn His Leu Ser Leu His Asp Tyr Ile Phe Gln Asn Ile  
 35 40 45

ES 2 745 092 T3

Ser Glu Phe Ala Thr Lys Pro Cys Leu Ile Asn Gly Pro Thr Gly His  
50 55 60

Val Tyr Thr Tyr Ser Asp Val His Val Ile Ser Arg Gln Ile Ala Ala  
65 70 75 80

Asn Phe His Lys Leu Gly Val Asn Gln Asn Asp Val Val Met Leu Leu  
85 90 95

Leu Pro Asn Cys Pro Glu Phe Val Leu Ser Phe Leu Ala Ala Ser Phe  
100 105 110

Arg Gly Ala Thr Ala Thr Ala Ala Asn Pro Phe Phe Thr Pro Ala Glu  
115 120 125

Ile Ala Lys Gln Ala Lys Ala Ser Asn Thr Lys Leu Ile Ile Thr Glu  
130 135 140

Ala Arg Tyr Val Asp Lys Ile Lys Pro Leu Gln Asn Asp Asp Gly Val  
145 150 155 160

Val Ile Val Cys Ile Asp Asp Asn Glu Ser Val Pro Ile Pro Glu Gly  
165 170 175

Cys Leu Arg Phe Thr Glu Leu Thr Gln Ser Thr Thr Glu Ala Ser Glu  
180 185 190

Val Ile Asp Ser Val Glu Ile Ser Pro Asp Asp Val Val Ala Leu Pro  
195 200 205

Tyr Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Met Leu Thr His  
210 215 220

Lys Gly Leu Val Thr Ser Val Ala Gln Gln Val Asp Gly Glu Asn Pro  
225 230 235 240

Asn Leu Tyr Phe His Ser Asp Asp Val Ile Leu Cys Val Leu Pro Met  
245 250 255

Phe His Ile Tyr Ala Leu Asn Ser Ile Met Leu Cys Gly Leu Arg Val  
260 265 270

Gly Ala Ala Ile Leu Ile Met Pro Lys Phe Glu Ile Asn Leu Leu Leu  
275 280 285

Glu Leu Ile Gln Arg Cys Lys Val Thr Val Ala Pro Met Val Pro Pro

ES 2 745 092 T3

290						295									300
Ile	Val	Leu	Ala	Ile	Ala	Lys	Ser	Ser	Glu	Thr	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu
305					310					315					320
Ser	Ser	Ile	Arg	Val	Val	Lys	Ser	Gly	Ala	Ala	Pro	Leu	Gly	Lys	Glu
				325					330					335	
Leu	Glu	Asp	Ala	Val	Asn	Ala	Lys	Phe	Pro	Asn	Ala	Lys	Leu	Gly	Gln
			340					345					350		
Gly	Tyr	Gly	Met	Thr	Glu	Ala	Gly	Pro	Val	Leu	Ala	Met	Ser	Leu	Gly
		355					360					365			
Phe	Ala	Lys	Glu	Pro	Phe	Pro	Val	Lys	Ser	Gly	Ala	Cys	Gly	Thr	Val
	370					375					380				
Val	Arg	Asn	Ala	Glu	Met	Lys	Ile	Val	Asp	Pro	Asp	Thr	Gly	Asp	Ser
385					390					395					400
Leu	Ser	Arg	Asn	Gln	Pro	Gly	Glu	Ile	Cys	Ile	Arg	Gly	His	Gln	Ile
				405					410					415	
Met	Lys	Gly	Tyr	Leu	Asn	Asn	Pro	Ala	Ala	Thr	Ala	Glu	Thr	Ile	Asp
			420					425					430		
Lys	Asp	Gly	Trp	Leu	His	Thr	Gly	Asp	Ile	Gly	Leu	Ile	Asp	Asp	Asp
		435					440					445			
Asp	Glu	Leu	Phe	Ile	Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Lys
	450					455					460				
Gly	Phe	Gln	Val	Ala	Pro	Ala	Glu	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Ile	Gly	His
465					470					475					480
Pro	Asp	Ile	Thr	Asp	Val	Ala	Val	Val	Ala	Met	Lys	Glu	Glu	Ala	Ala
				485					490					495	
Gly	Glu	Val	Pro	Val	Ala	Phe	Val	Val	Lys	Ser	Lys	Asp	Ser	Glu	Leu
			500					505					510		
Ser	Glu	Asp	Asp	Val	Lys	Gln	Phe	Val	Ser	Lys	Gln	Val	Val	Phe	Tyr
		515					520					525			
Lys	Arg	Ile	Asn	Lys	Val	Phe	Phe	Thr	Glu	Ser	Ile	Pro	Lys	Ala	Pro
	530					535					540				

ES 2 745 092 T3

Ser Gly Lys Ile Leu Arg Lys Asp Leu Arg Ala Lys Leu Ala Asn Gly  
 545 550 555 560

Leu

<210> 16  
 <211> 1179  
 <212> ADN  
 <213> Vitis vinifera

<400> 16  
 atggcttcag tcgaggaatt tagaaacgct caacgtgccca aggggtccggc caccatccta 60  
 gccattggca cagctacccc cgaccactgt gtctaccagt ctgattatgc tgattactat 120  
 ttcaagggtca ctaagagcga gcacatgact gcggtgaaga agaagttcaa tcgcatatgt 180  
 gacaaatcca tgatcaagaa gcgttacatt catttgaccg aagaaatgct tgaggagcac 240  
 ccaaacattg gtgcttatat ggctccatct cttaacatac gccaaagagat tatcactgct 300  
 gaggtaccca agctcggtaa ggaagcagca ttgaaggctc ttaaagagtg gggtcagcct 360  
 aatcgaaga tcaccacact tgtatcttgt accacctcag gtgtagaaat gcctgggtgca 420  
 gattataaac tcgctaactt tttaggcctc gaaccatctg tcagaagagt gatgttgtac 480  
 catcaagggt gctatgcagg tggaaactgtc cttcgaaccg ctaaggatct tgcagagaat 540  
 aatgcaggag cacgagttct tgtggtgtgc tctgagatca cagttgttac atttcgcggc 600  
 ccttccgaag atgcttttga ctcttttagt ggccaagccc tttttggtga tggttctgca 660  
 gctgtaatcg taggatcaga tccggatata tcaattgaac gaccactctt ccagcttgtc 720  
 tcagcagccc aacatttat tcctaattct gcaggtgccca ttgcaggaaa cttacgtgag 780  
 gtgggactca cctttcattt gtggcccaat gtgccactt taatttctga gaacgtagag 840  
 aatgtttga ctcaggcttt tgaccactt ggtattagcg attggaactc gttatcttgg 900  
 attgctcacc caggtggccc tgcaattctt gatgcagttg aagcaaaact caatttagat 960  
 aaaaagaaac tcgaagcaac gaggcagtgt ttaagtgagt atggaaacat gtcaagtgca 1020  
 tgtgtgttgt ttatcttggga tgagatgaga aagaaatccc ttaaggggga gagggccacc 1080  
 acgggtgaag gattggattg gggagtatta ttcggttttg gaccaggctt gactattgaa 1140  
 actggtgtgt tgcatagcat tcctatggtt acaaattaa 1179

<210> 17  
 <211> 392  
 <212> PRT  
 <213> Vitis vinifera

<400> 17

Met Ala Ser Val Glu Glu Phe Arg Asn Ala Gln Arg Ala Lys Gly Pro



ES 2 745 092 T3

Asn Leu Arg Glu Val Gly Leu Thr Phe His Leu Trp Pro Asn Val Pro  
 260 265 270

Thr Leu Ile Ser Glu Asn Val Glu Lys Cys Leu Thr Gln Ala Phe Asp  
 275 280 285

Pro Leu Gly Ile Ser Asp Trp Asn Ser Leu Phe Trp Ile Ala His Pro  
 290 295 300

Gly Gly Pro Ala Ile Leu Asp Ala Val Glu Ala Lys Leu Asn Leu Asp  
 305 310 315 320

Lys Lys Lys Leu Glu Ala Thr Arg His Val Leu Ser Glu Tyr Gly Asn  
 325 330 335

Met Ser Ser Ala Cys Val Leu Phe Ile Leu Asp Glu Met Arg Lys Lys  
 340 345 350

Ser Leu Lys Gly Glu Arg Ala Thr Thr Gly Glu Gly Leu Asp Trp Gly  
 355 360 365

Val Leu Phe Gly Phe Gly Pro Gly Leu Thr Ile Glu Thr Val Val Leu  
 370 375 380

His Ser Ile Pro Met Val Thr Asn  
 385 390

<210> 18  
 <211> 2871  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> gen de fusión

<400> 18  
 atggcgccac aagaacaagc agtttctcag gtgatggaga aacagagcaa caacaacaac 60  
 agtgacgtca ttttccgac aaagttaccg gatatttaca tccgaacca cctatctctc 120  
 cagactaca tcttccaaa catctccgaa ttcgccacta agccttgctt aatcaacgga 180  
 ccaaccggcc acgtgtacac ttactccgac gtccacgtca tctcccgcc aatcgccgcc 240  
 aattttcaca aactcggcgt taacccaaac gacgtcgtca tgctcctcct cccaaactgt 300  
 cccgaattcg tcctctcttt cctcgcgcc tccttccgcg gcgcaaccgc caccgccgca 360  
 aaccctttct tcaactccggc ggagatagct aaacaagcca aagcctccaa caccaaactc 420  
 ataatcaccg aagctcgtta cgtcgacaaa atcaaaccac ttcaaaacga cgacggagta 480  
 gtcacgtctt gcatcgacga caacgaatcc gtgccaatcc ctgaaggctg cctccgcttc 540

ES 2 745 092 T3

accgagttga ctcagtcgac aaccgaggca tcagaagtca tcgactcggg ggagatttca 600  
 ccggacgacg tgggtggcact accttactcc tctggcacga cgggattacc aaaaggagtg 660  
 atgctgactc acaagggact agtcacgagc gttgctcagc aagtcgacgg cgagaacccg 720  
 aatctttatt tccacagcga tgacgtcata ctctgtgttt tgcccatggt tcatatctac 780  
 gctttgaact cgatcatggt gtgtggctct agagttgggtg cggcgattct gataatgccg 840  
 aagtttgaga tcaatctgct attggagctg atccagaggt gtaaagtgac ggtggctccg 900  
 atggttccgc cgattgtggt gccattgcg aagtcttcgg agacggagaa gtatgatttg 960  
 agctcgataa gagtggtgaa atctgggtgct gctcctcttg gtaaagaact tgaagatgcc 1020  
 gttaatgcca agtttcctaa tgccaaactc ggtcagggat acggaatgac ggaagcaggt 1080  
 ccagtgctag caatgtcgtt aggttttgca aaggaacctt ttccggttaa gtcaggagct 1140  
 tgtggtactg ttgtaagaaa tgctgagatg aaaatagttg atccagacac cggagattct 1200  
 ctttcgagga atcaaccggt tgagatttgt attcgtggtc accagatcat gaaaggttac 1260  
 ctcaacaatc cggcagctac agcagagacc attgataaag acggttggct tcatactgga 1320  
 gatattggat tgatcgatga cgatgacgag cttttcatcg ttgatcgatt gaaagaactt 1380  
 atcaagtata aaggttttca ggtagctccg gctgagctag aggctttgct catcggtcat 1440  
 cctgacatta ctgatgttgc tgttgtcgca atgaaagaag aagcagctgg tgaagttcct 1500  
 gttgcatttg tggtgaaatc gaaggattcg gagttatcag aagatgatgt gaagcaatc 1560  
 gtgtcgaaac aggttgtggt ttacaagaga atcaacaaag tgttcttcac tgaatccatt 1620  
 cctaaagctc catcagggaa gatattgagg aaagatctga gggcaaaact agcaaagga 1680  
 ttgggatctg gcatggcttc agtcgaggaa tttagaaacg ctcaacgtgc caaggggtccg 1740  
 gccaccatcc tagccattgg cacagctacc cccgaccact gtgtctacca gtctgattat 1800  
 gctgattact atttcaaggt cactaagagc gagcacatga ctgcgttgaa gaagaagttc 1860  
 aatcgcatat gtgacaaatc catgatcaag aagcgttaca ttcatttgac cgaagaaatg 1920  
 cttgaggagc acccaaacat tggtgcttat atggctccat ctcttaacat acgccaagag 1980  
 attatcactg ctgaggtacc caagctcggg aaggaagcag cattgaaggc tcttaagag 2040  
 tggggtcagc ctaaactgaa gatcaccac cttgtatfff gtaccacctc aggtgtagaa 2100  
 atgctgggtg cagattataa actcgctaact cttttaggcc tcgaaccatc tgtcagaaga 2160  
 gtgatgttgt accatcaagg gtgctatgca ggtggaactg tccttogaac cgctaaggat 2220  
 cttgcagaga ataatgcagg agcacgagtt cttgtgggtg gctctgagat cacagttggt 2280  
 acatttcgcg gcccttccga agatgctttg gactctttag ttggccaagc cctttttggt 2340  
 gatggttctg cagctgtaat cgtaggatca gatccggata tctcaattga acgaccactc 2400  
 ttccagcttg tctcagcagc ccaaactttt attcctaatt ctgcaggtgc cattgcagga 2460

ES 2 745 092 T3

aacttacgtg aggtgggact cacctttcat ttgtggccca atgtgccac ttttaatttct 2520  
gagaacgtag agaaatgttt gactcaggct tttgaccac ttggtattag cgattggaac 2580  
tcgttatttt ggattgctca cccaggtggc cctgcaattc ttgatgcagt tgaagcaaaa 2640  
ctcaatttag ataaaaagaa actogaagca acgaggcatg tgtaagtga gtatggaaac 2700  
atgtcaagtg catgtgtgtt gtttattttg gatgagatga gaaagaaatc ccttaagggg 2760  
gagagggcca ccacgggtga aggattggat tggggagtat tattcggttt tggaccaggc 2820  
ttgactattg aaactgttgt gttgcatagc attcctatgg ttacaaatta a 2871

<210> 19  
<211> 956  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> proteína de fusión

<400> 19

Met Ala Pro Gln Glu Gln Ala Val Ser Gln Val Met Glu Lys Gln Ser  
1 5 10 15

Asn Asn Asn Asn Ser Asp Val Ile Phe Arg Ser Lys Leu Pro Asp Ile  
20 25 30

Tyr Ile Pro Asn His Leu Ser Leu His Asp Tyr Ile Phe Gln Asn Ile  
35 40 45

Ser Glu Phe Ala Thr Lys Pro Cys Leu Ile Asn Gly Pro Thr Gly His  
50 55 60

Val Tyr Thr Tyr Ser Asp Val His Val Ile Ser Arg Gln Ile Ala Ala  
65 70 75 80

Asn Phe His Lys Leu Gly Val Asn Gln Asn Asp Val Val Met Leu Leu  
85 90 95

Leu Pro Asn Cys Pro Glu Phe Val Leu Ser Phe Leu Ala Ala Ser Phe  
100 105 110

Arg Gly Ala Thr Ala Thr Ala Ala Asn Pro Phe Phe Thr Pro Ala Glu  
115 120 125

Ile Ala Lys Gln Ala Lys Ala Ser Asn Thr Lys Leu Ile Ile Thr Glu  
130 135 140

Ala Arg Tyr Val Asp Lys Ile Lys Pro Leu Gln Asn Asp Asp Gly Val



ES 2 745 092 T3

Leu Ser Arg Asn Gln Pro Gly Glu Ile Cys Ile Arg Gly His Gln Ile  
 405 410 415  
 Met Lys Gly Tyr Leu Asn Asn Pro Ala Ala Thr Ala Glu Thr Ile Asp  
 420 425 430  
 Lys Asp Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Leu Ile Asp Asp Asp  
 435 440 445  
 Asp Glu Leu Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Glu Leu Ile Lys Tyr Lys  
 450 455 460  
 Gly Phe Gln Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ala Leu Leu Ile Gly His  
 465 470 475 480  
 Pro Asp Ile Thr Asp Val Ala Val Val Ala Met Lys Glu Glu Ala Ala  
 485 490 495  
 Gly Glu Val Pro Val Ala Phe Val Val Lys Ser Lys Asp Ser Glu Leu  
 500 505 510  
 Ser Glu Asp Asp Val Lys Gln Phe Val Ser Lys Gln Val Val Phe Tyr  
 515 520 525  
 Lys Arg Ile Asn Lys Val Phe Phe Thr Glu Ser Ile Pro Lys Ala Pro  
 530 535 540  
 Ser Gly Lys Ile Leu Arg Lys Asp Leu Arg Ala Lys Leu Ala Asn Gly  
 545 550 555 560  
 Leu Gly Ser Gly Met Ala Ser Val Glu Glu Phe Arg Asn Ala Gln Arg  
 565 570 575  
 Ala Lys Gly Pro Ala Thr Ile Leu Ala Ile Gly Thr Ala Thr Pro Asp  
 580 585 590  
 His Cys Val Tyr Gln Ser Asp Tyr Ala Asp Tyr Tyr Phe Lys Val Thr  
 595 600 605  
 Lys Ser Glu His Met Thr Ala Leu Lys Lys Lys Phe Asn Arg Ile Cys  
 610 615 620  
 Asp Lys Ser Met Ile Lys Lys Arg Tyr Ile His Leu Thr Glu Glu Met  
 625 630 635 640  
 Leu Glu Glu His Pro Asn Ile Gly Ala Tyr Met Ala Pro Ser Leu Asn  
 645 650 655

ES 2 745 092 T3

Ile Arg Gln Glu Ile Ile Thr Ala Glu Val Pro Lys Leu Gly Lys Glu  
660 665 670

Ala Ala Leu Lys Ala Leu Lys Glu Trp Gly Gln Pro Lys Ser Lys Ile  
675 680 685

Thr His Leu Val Phe Cys Thr Thr Ser Gly Val Glu Met Pro Gly Ala  
690 695 700

Asp Tyr Lys Leu Ala Asn Leu Leu Gly Leu Glu Pro Ser Val Arg Arg  
705 710 715 720

Val Met Leu Tyr His Gln Gly Cys Tyr Ala Gly Gly Thr Val Leu Arg  
725 730 735

Thr Ala Lys Asp Leu Ala Glu Asn Asn Ala Gly Ala Arg Val Leu Val  
740 745 750

Val Cys Ser Glu Ile Thr Val Val Thr Phe Arg Gly Pro Ser Glu Asp  
755 760 765

Ala Leu Asp Ser Leu Val Gly Gln Ala Leu Phe Gly Asp Gly Ser Ala  
770 775 780

Ala Val Ile Val Gly Ser Asp Pro Asp Ile Ser Ile Glu Arg Pro Leu  
785 790 795 800

Phe Gln Leu Val Ser Ala Ala Gln Thr Phe Ile Pro Asn Ser Ala Gly  
805 810 815

Ala Ile Ala Gly Asn Leu Arg Glu Val Gly Leu Thr Phe His Leu Trp  
820 825 830

Pro Asn Val Pro Thr Leu Ile Ser Glu Asn Val Glu Lys Cys Leu Thr  
835 840 845

Gln Ala Phe Asp Pro Leu Gly Ile Ser Asp Trp Asn Ser Leu Phe Trp  
850 855 860

Ile Ala His Pro Gly Gly Pro Ala Ile Leu Asp Ala Val Glu Ala Lys  
865 870 875 880

Leu Asn Leu Asp Lys Lys Lys Leu Glu Ala Thr Arg His Val Leu Ser  
885 890 895

Glu Tyr Gly Asn Met Ser Ser Ala Cys Val Leu Phe Ile Leu Asp Glu  
900 905 910

ES 2 745 092 T3

Met Arg Lys Lys Ser Leu Lys Gly Glu Arg Ala Thr Thr Gly Glu Gly  
915 920 925

Leu Asp Trp Gly Val Leu Phe Gly Phe Gly Pro Gly Leu Thr Ile Glu  
930 935 940

Thr Val Val Leu His Ser Ile Pro Met Val Thr Asn  
945 950 955

**REIVINDICACIONES**

1. Un método biosintético para preparar pteroestilbeno que comprende:
  - 5                   expresar una 4-cumarato:coenzima A ligasa (4CL) en un sistema celular;
  - expresar una estilbeno sintasa (STS) en el sistema celular;
  - expresar una resveratrol O-metiltransferasa (ROMT) en el sistema celular;
  - alimentar ácido p-cumárico al sistema celular;
  - 10                  cultivar el sistema celular en un medio; y
  - producir pteroestilbeno.
2. El método biosintético para preparar pteroestilbeno de la reivindicación 1, en donde la 4-cumarato:coenzima A ligasa se expresa a partir de un gen *4CL* clonado de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia-0).
- 15 3. El método biosintético para preparar pteroestilbeno de la reivindicación 2, en donde la 4-cumarato:coenzima A ligasa se expresa a partir de un gen que tiene una identidad de secuencia de al menos 66 % con el gen *4CL* clonado de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia- 0) representado gráficamente en la Id. de sec. n.º:14.
- 20 4. El método biosintético para preparar pteroestilbeno de la reivindicación 2, en donde la 4-cumarato:coenzima A ligasa se expresa a partir de un gen que tiene una similitud de secuencia de al menos 90 % con el gen *4CL* clonado de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia- 0) representado gráficamente en la Id. de sec. n.º:14.
- 25 5. El método biosintético para preparar pteroestilbeno de la reivindicación 1, en donde la estilbeno sintasa se expresa a partir de un gen *STS* clonado de uva (*Vitis vinifera*).
- 30 6. El método biosintético para preparar pteroestilbeno de la reivindicación 5, en donde la estilbeno sintasa se expresa a partir de un gen que tiene una identidad de secuencia de al menos 66 % con el gen *STS* clonado de uva (*Vitis vinifera*) representado gráficamente en la Id. de sec. n.º:16.
- 35 7. El método biosintético para preparar pteroestilbeno de la reivindicación 5, en donde la estilbeno sintasa se expresa a partir de un gen que tiene una similitud de secuencia de al menos 90 % con el gen *STS* clonado de uva (*Vitis vinifera*) representado gráficamente en la Id. de sec. n.º:16.
- 40 8. El método biosintético para preparar pteroestilbeno de la reivindicación 1, en donde la resveratrol O-metiltransferasa se expresa a partir de un gen clonado de uva (*Vitis vinifera*).
- 45 9. El método biosintético para preparar pteroestilbeno de la reivindicación 8, en donde la resveratrol O-metiltransferasa se expresa a partir de un gen que tiene una identidad de secuencia de al menos 66 % con el gen *ROMT* clonado de uva (*Vitis vinifera*) representado gráficamente en la Id. de sec. n.º:12.
- 50 10. El método biosintético para preparar pteroestilbeno de la reivindicación 8, en donde la resveratrol O-metiltransferasa se expresa a partir de un gen que tiene una similitud de secuencia de al menos 90 % con el gen *ROMT* clonado de uva (*Vitis vinifera*) representado gráficamente en la Id. de sec. n.º:12.
- 55 11. El método biosintético para preparar pteroestilbeno de la reivindicación 8, en donde la resveratrol O-metiltransferasa expresada se modifica en uno o más de sus restos seleccionados de la lista que consiste en los restos 167, 174, 258, 261 de la Id. de sec. n.º: 13, y una combinación de los mismos, por un aminoácido alternativo o un aminoácido modificado, y en donde la resveratrol O-metiltransferasa modificada presenta mayor actividad para convertir el resveratrol en pteroestilbeno con respecto a una resveratrol O-metiltransferasa no modificada.
- 60 12. El método biosintético para preparar pteroestilbeno de la reivindicación 1, en donde la expresión de la 4-cumarato:coenzima A ligasa y la expresión de la estilbeno sintasa comprende transfectar un gen de fusión *4CL::STS*.
13. El método biosintético para preparar pteroestilbeno de la reivindicación 1, en donde la expresión de la 4-cumarato:coenzima A ligasa comprende transfectar un gen *4CL*.
14. El método biosintético para preparar pteroestilbeno de la reivindicación 1, en donde la expresión de la estilbeno sintasa comprende transfectar un gen *STS*.
15. El método biosintético para preparar pteroestilbeno de la reivindicación 1, en donde la expresión de resveratrol O-metiltransferasa comprende transfectar un gen *ROMT*.

16. El método biosintético para preparar pteroestilbano de la reivindicación 1, en donde el sistema celular se selecciona del grupo que consiste en al menos bacterias, levaduras, células vegetales, células animales y una combinación de las mismas.
- 5 17. El método biosintético para preparar pteroestilbano de la reivindicación 1, en donde el sistema celular permite una reacción biosintética ectópica.
18. El método biosintético para preparar pteroestilbano de la reivindicación 1, en donde el sistema celular comprende un sistema de traducción in vitro.

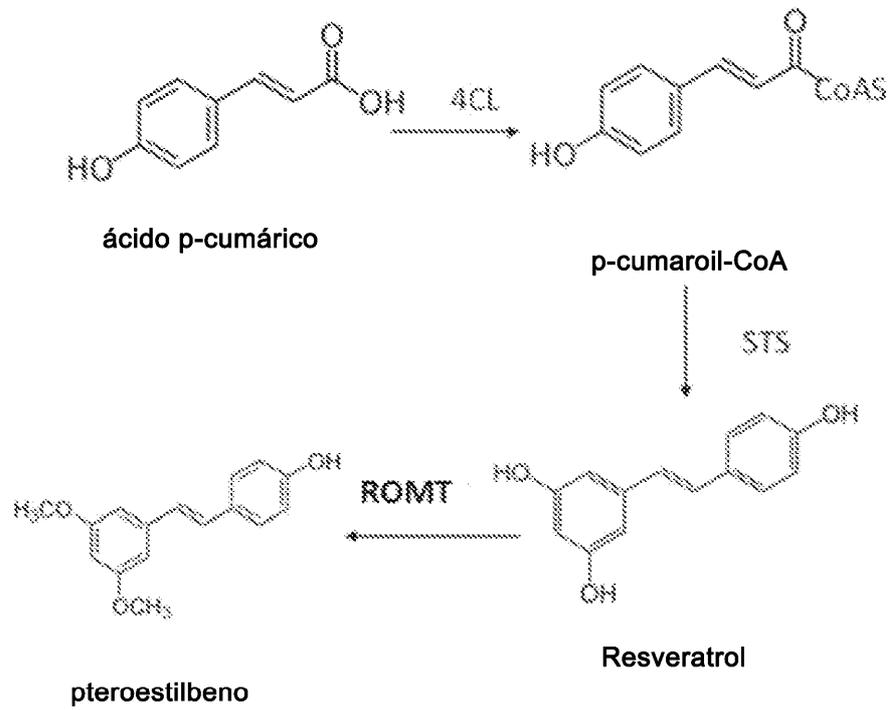


FIG. 1

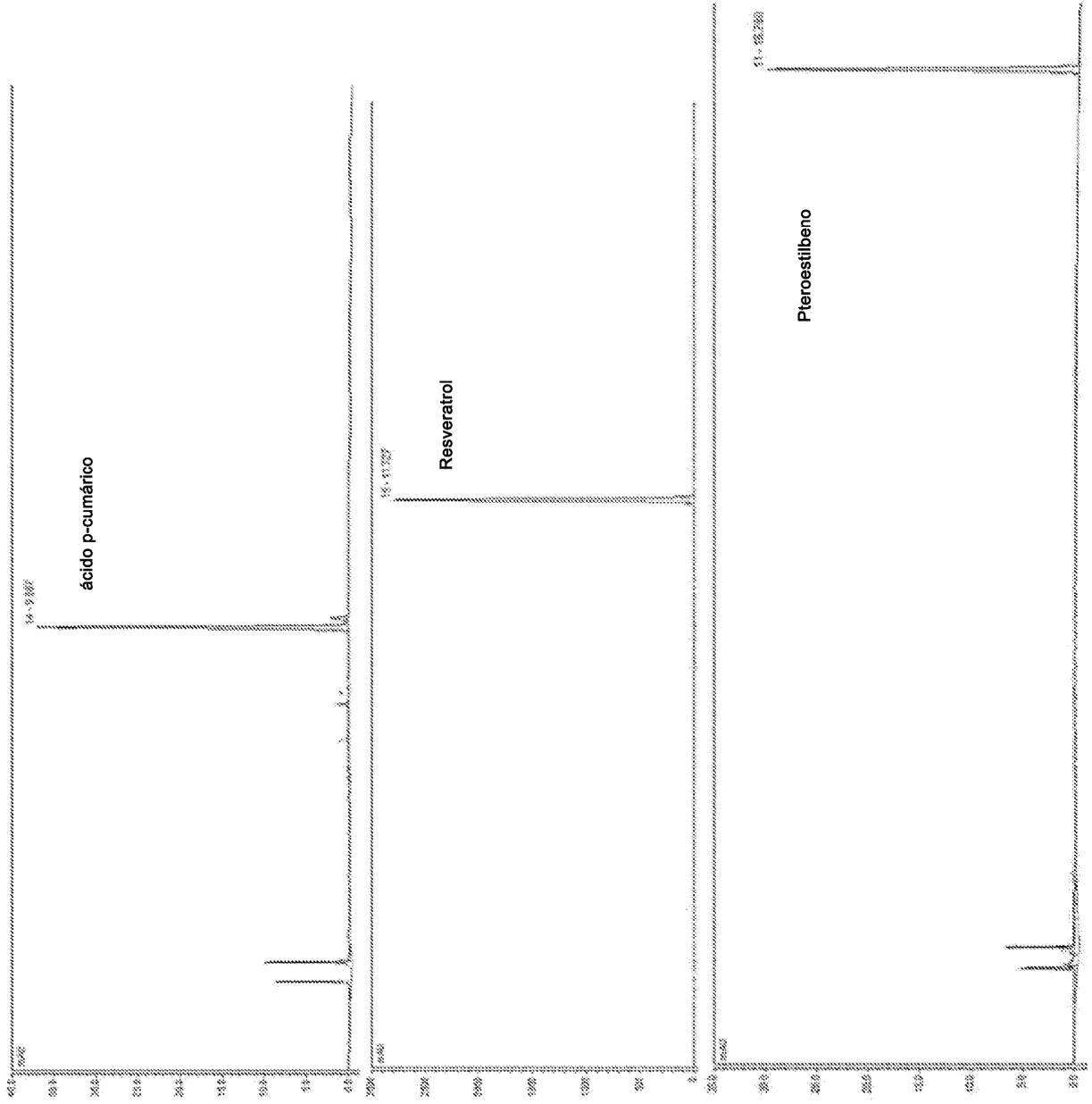


FIG. 2

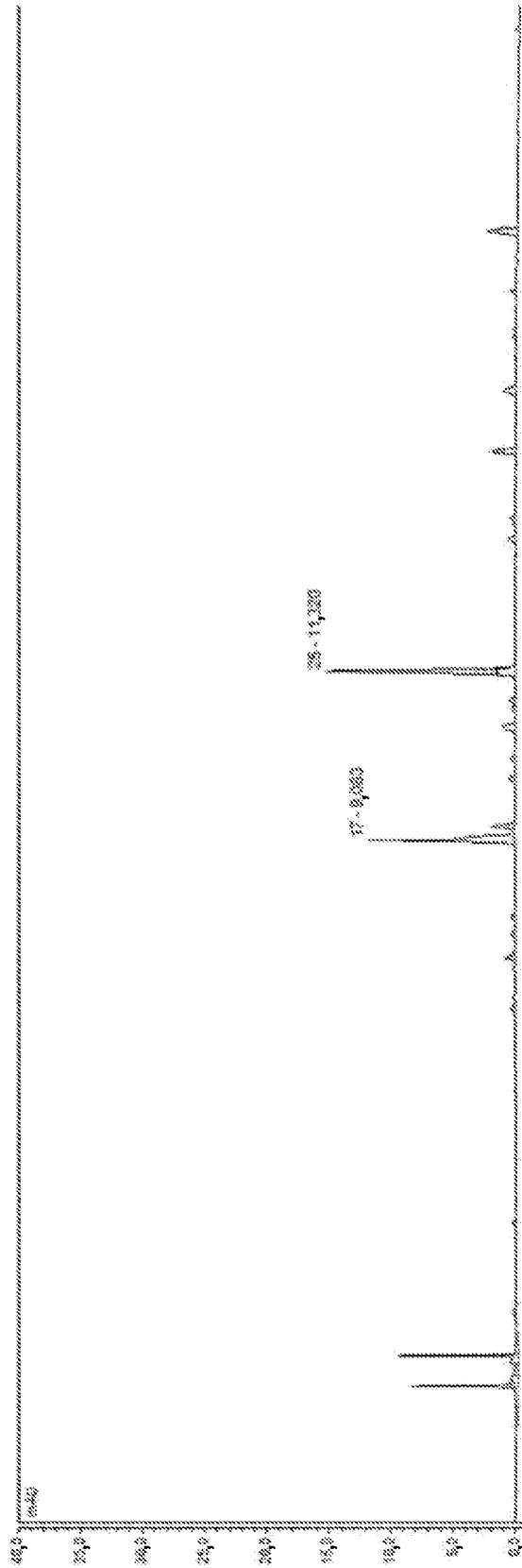


FIG. 3

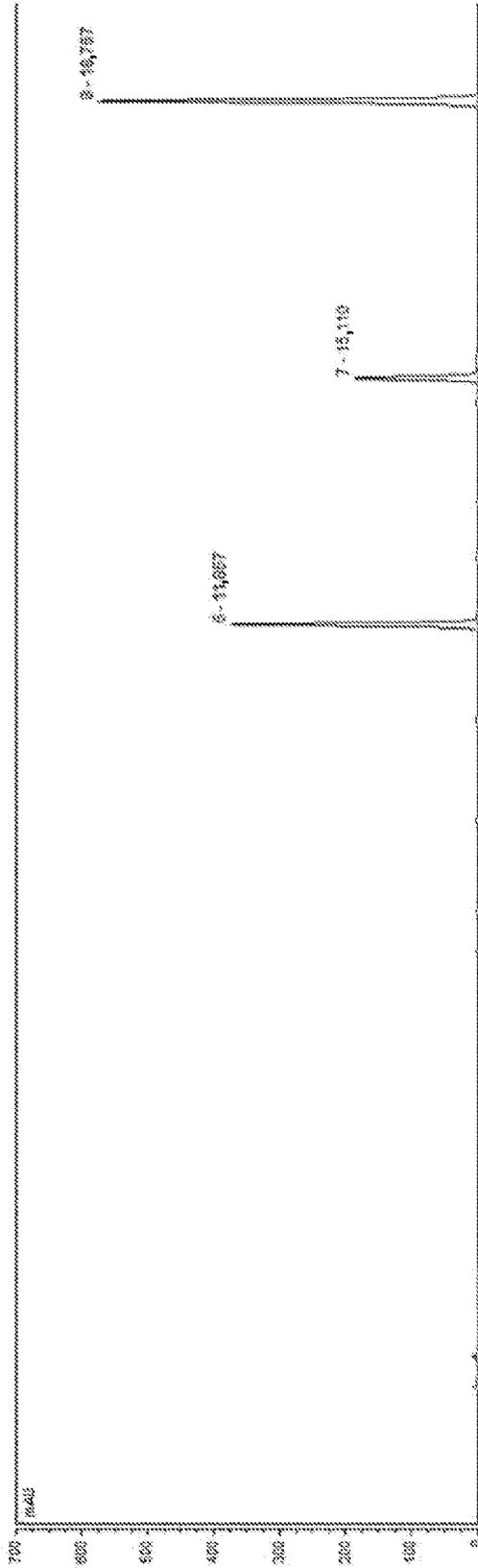


FIG. 4

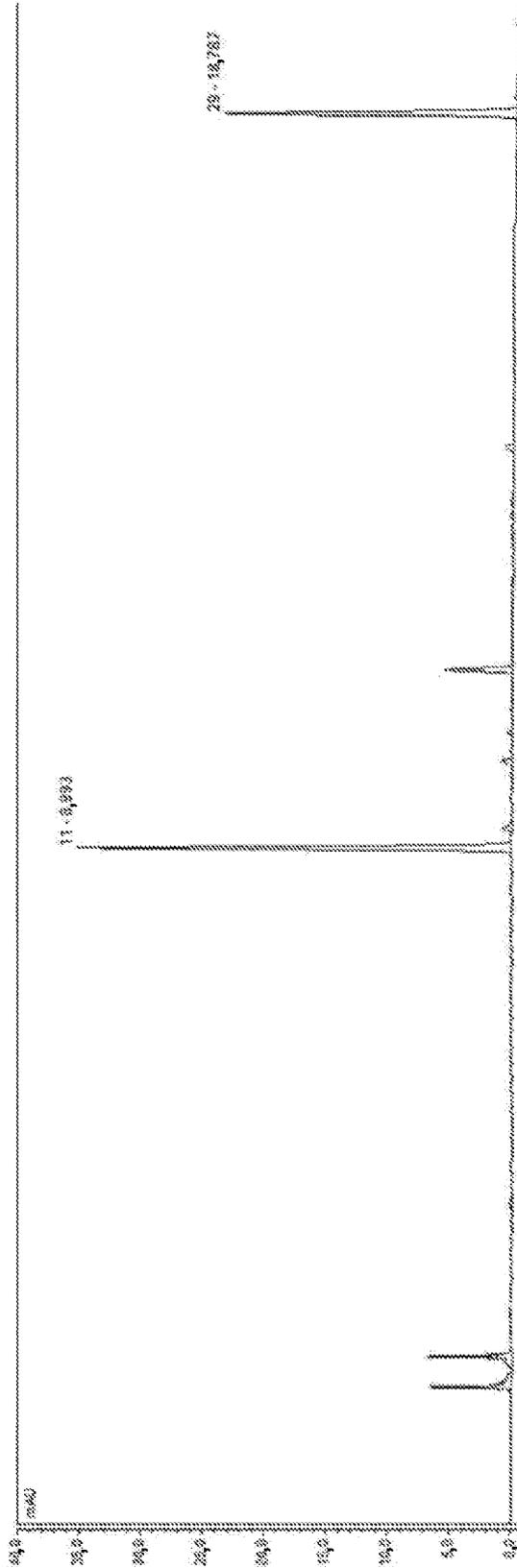


FIG. 5

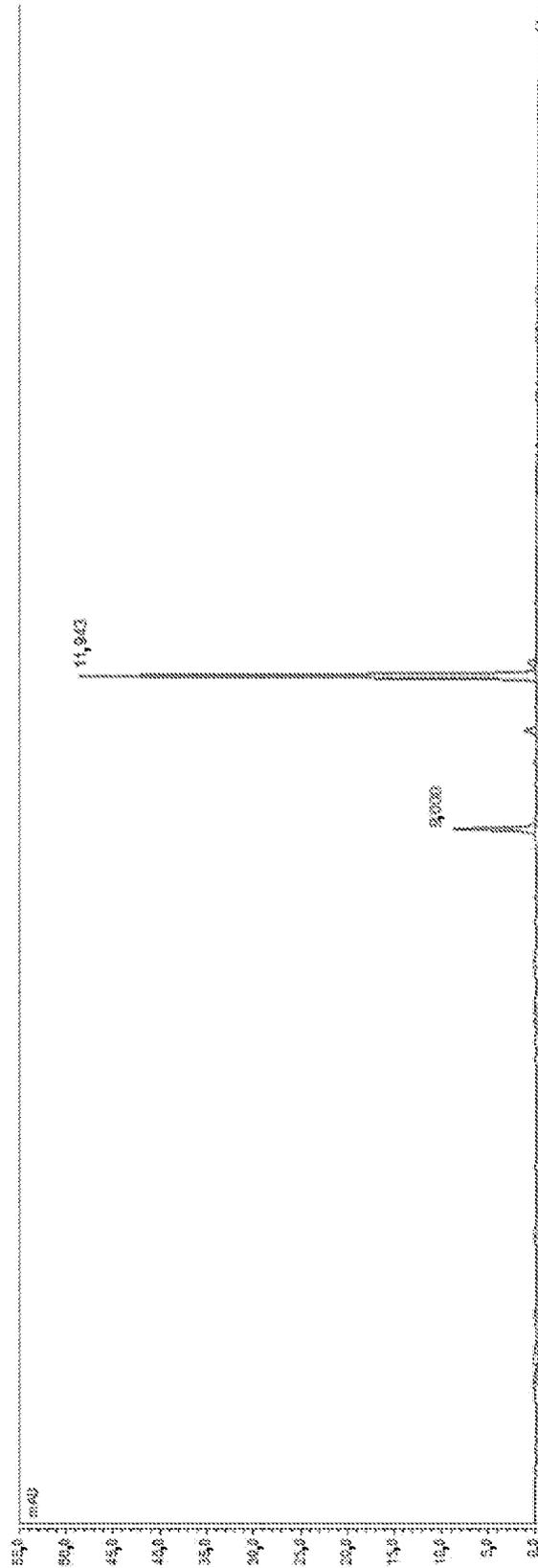


FIG. 6

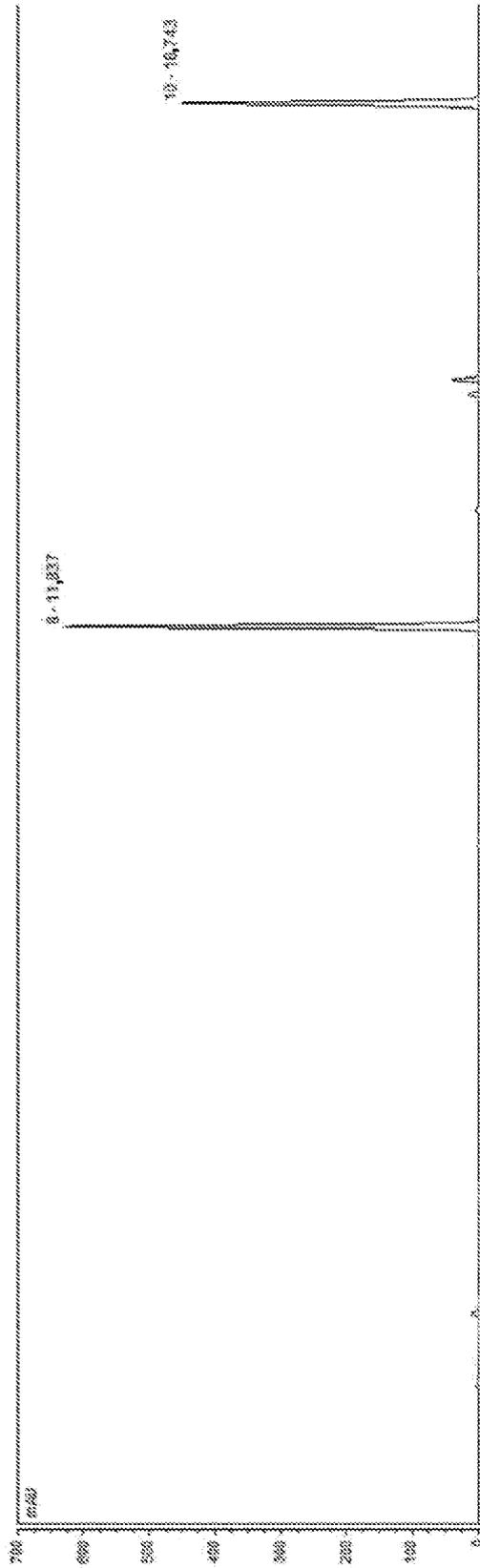


FIG. 7

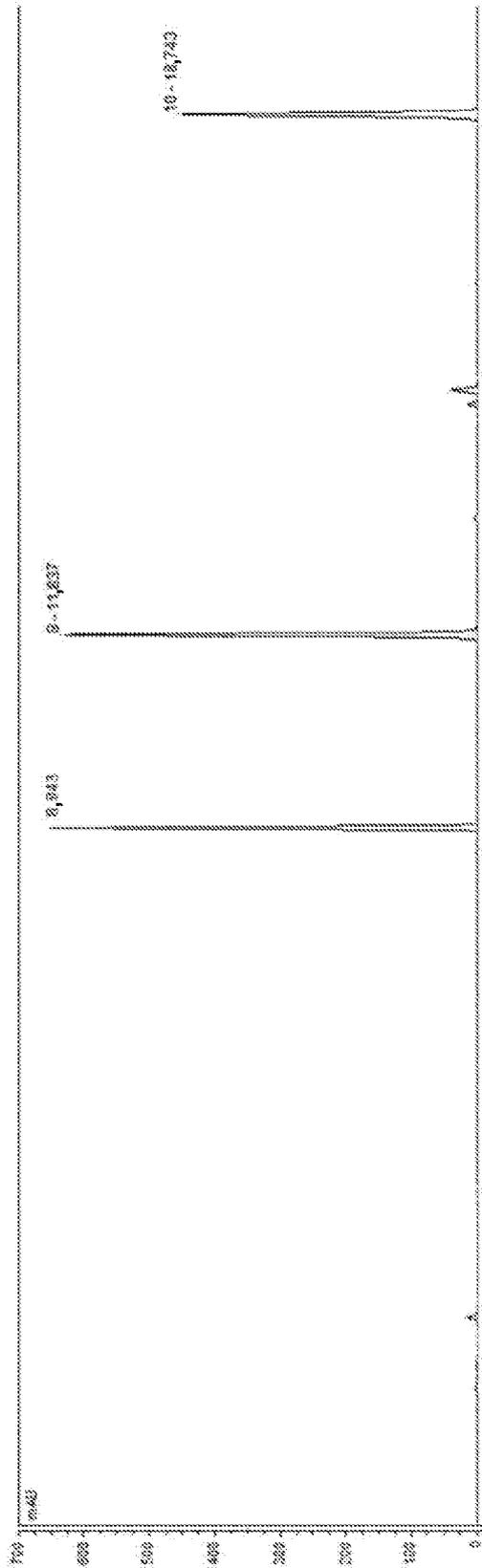


FIG. 8

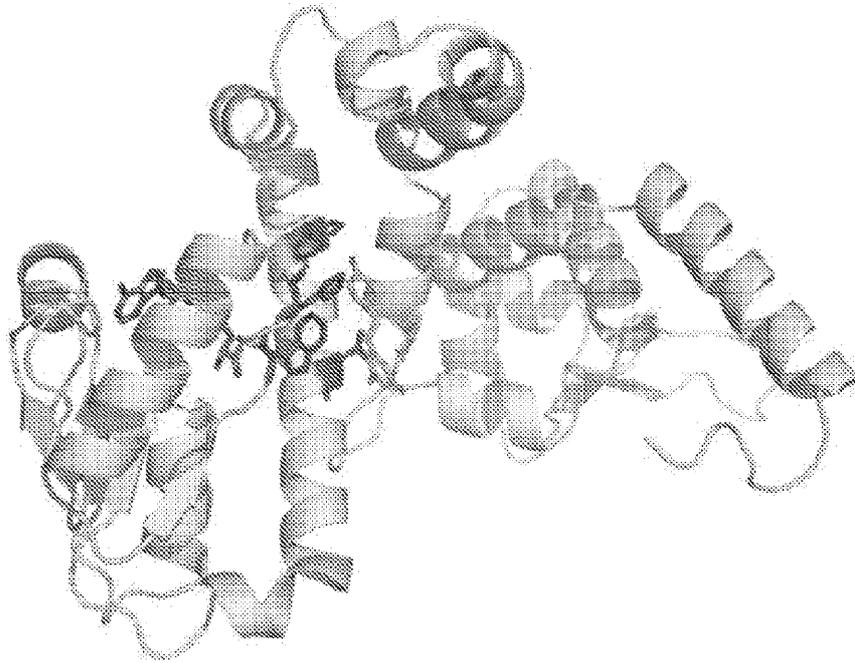


FIG. 9

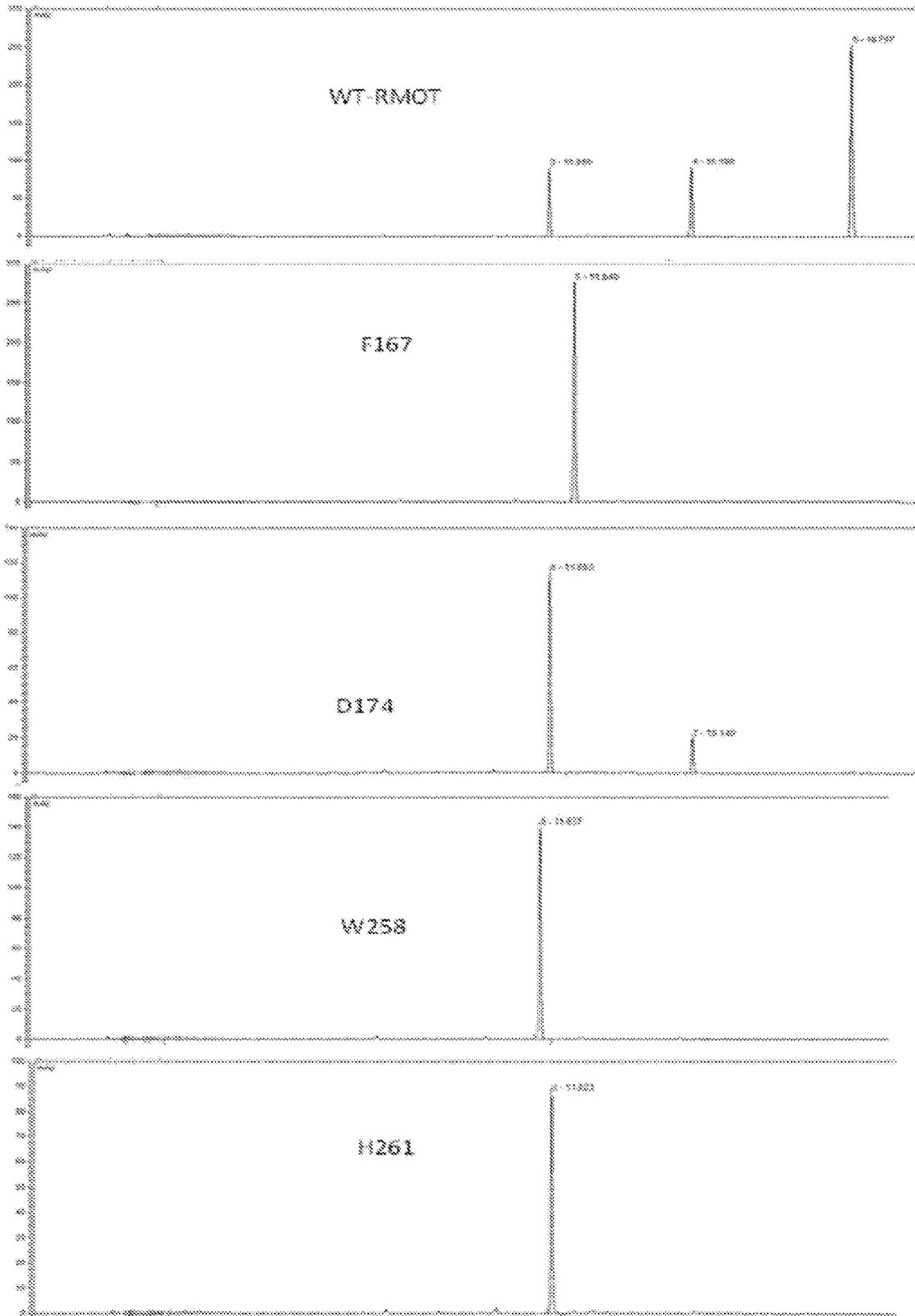


FIG. 10