



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 310 204**

51 Int. Cl.:

A01H 1/00 (2006.01)	A01H 5/00 (2006.01)
A23D 9/00 (2006.01)	A61K 31/20 (2006.01)
C07C 53/00 (2006.01)	C07H 21/04 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)	C12N 1/20 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)	C12N 15/00 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02731579 .5**

96 Fecha de presentación : **02.05.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1401259**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2004**

54 Título: **Genes de Δ 4-desaturasa y usos de los mismos.**

30 Prioridad: **04.05.2001 US 849199**
11.04.2002 US 120637

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.01.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.01.2009

73 Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
D377/AP6D 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-6050, US

72 Inventor/es: **Mukerji, Pradip;**
Huang, Yung-Sheng;
Das, Tapas;
Thurmond, Jennifer, M.;
Leonard, Amanda, Eun-Yeong y
Pereira, Suzette, L.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 310 204 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

Genes de Δ -4-desaturasa y usos de los mismos.

5 **Antecedentes de la invención****Campo técnico**

La presente invención se refiere a la identificación y aislamiento de genes que codifican enzimas (por ejemplo, Δ 4-desaturasa de *Thraustochytrium aureum*, Δ 4-desaturasa de *Schizochytrium aggregatum* y Δ 4-desaturasa de *Isochrysis galbana*) implicadas en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados y a los usos de los mismos. En particular, la Δ 4-desaturasa cataliza la conversión de, por ejemplo, ácido adrenico (22:4n-6) en ácido ω 6-docosapentaenoico (22:5n-6) y la conversión del ácido ω 3-docosapentaenoico (22:5n-3) en ácido docosahexaenoico (22:6n-3). Después, los productos convertidos pueden utilizarse como sustratos en la producción de otros ácidos grasos poliinsaturados (AGP). El producto u otros ácidos grasos poliinsaturados pueden añadirse a composiciones farmacéuticas, composiciones nutricionales, piensos animales, así como a otros productos tales como cosméticos.

Información antecedente

Las desaturasas son críticas en la producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que tienen muchas funciones importantes. Por ejemplo, los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) son componentes importantes de la membrana plasmática de una célula, donde se encuentran en forma de fosfolípidos. También sirven como precursores para prostaciclina, eicosanoides, leucotrienos y prostaglandinas de mamíferos.

Además, los AGP son necesarios para el desarrollo apropiado del cerebro del lactante en desarrollo, así como para la formación y reparación de tejidos. En vista de la importancia biológica de los AGP, se han realizado intentos de producirlos, así como intermedios que conducen a su producción de una forma eficaz.

El documento WO 98/46764 describe la producción de AGP de cadena larga, tales como DHA, usando células vegetales recombinantes que expresan desaturasas de ácidos grasos, por ejemplo, Δ 5-, Δ 6- y Δ 12-desaturasa de *Mortierella alpina*. Dicho documento describe aceites vegetales producidos por las células recombinantes y composiciones que comprenden el aceite o una fracción del mismo, por ejemplo, fórmulas para lactantes, complementos dietéticos y sustitutos dietéticos. La Patente de Estados Unidos N° 5.340.742 describe la producción de lípidos con elevadas concentraciones de ácido ω 3-docosapentaenoico y DHA mediante el cultivo de *Thraustochytrium* y *Schizochytrium* y el uso de estos lípidos como aditivos alimentarios o en productos farmacéuticos.

Varias enzimas, más particularmente desaturasas y elongasas, están implicadas en la biosíntesis de AGP (véase la Figura 1). Por ejemplo, la elongasa (elo) cataliza la conversión del ácido γ -linolénico (GLA) en ácido dihomo- γ -linolénico (DGLA) y del ácido estearidónico (18:4n-3) en ácido (n-3)-eicosatetraenoico (20:4n-3). El ácido linoleico (LA, 18:2n-9,12 ó 18:2n-6) se produce a partir del ácido oleico (18:1- Δ 9) por una Δ 12-desaturasa. El GLA (18:3n-6,9,12) se produce a partir del ácido linoleico por una Δ 6-desaturasa.

Debe señalarse que los animales no pueden desaturar más allá de la posición Δ 9 y, por lo tanto, no pueden convertir el ácido oleico en ácido linoleico. Asimismo, el ácido γ -linolénico (ALA, 18:3n-9,12,15) no puede sintetizarse por mamíferos. Sin embargo, el ácido γ -linolénico puede convertirse en ácido estearidónico (STA, 18:4n-6,9,12,15) por una Δ 6-desaturasa (véase la publicación PCT WO 96/13591 y The FASEB Journal, Resúmenes, Parte 1, Resumen 3093, página A532 (Experimental Biology 98, San Francisco, CA, 18-22 de abril de 1998); véase también la Patente de Estados Unidos N° 5.552.306), seguido de su elongación en ácido (n-3)-eicosatetraenoico (20:4n-8,11,14,17) en mamíferos y algas. Después, este ácido graso poliinsaturado (es decir, 20:4n-8,11,14,17) puede convertirse en ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-5,8,11,14,17) por una Δ 5-desaturasa. Después, el EPA puede convertirse a su vez en ácido ω 3-docosapentaenoico (22:5n-3) por una elongasa. Nunca se ha descrito el aislamiento de una enzima, o de su gen codificante, responsable de la conversión del ácido ω 3-docosapentaenoico en ácido docosahexaenoico (22:6n-3). Se han propuesto dos rutas para esta conversión (véase la Figura 1 y Sprecher, H., Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, Vol. 2, págs. 135-138, 1999). Una de ellas implica a una sola enzima, una Δ 4-desaturasa tal como la de la presente invención. En la ruta de n-6, el ácido linoleico de la dieta puede convertirse en ácido adrenico a través de una serie de etapas de desaturación y elongación en mamíferos (véase la Figura 1). Se postula que la producción del ácido ω 6-docosapentaenoico a partir del ácido adrenico está mediada por la Δ 6-desaturasa que se ha analizado anteriormente.

En el documento WO 98/46764 y Sprecher H. *et al.*, J. Lipid Research, vol. 36, n° 12, diciembre de 1995, págs. 2471-2477, se ha propuesto, pero no se ha demostrado, la existencia de una Δ 4-desaturasa que cataliza la conversión del ácido ω 3-docosapentaenoico en DHA y/o del ácido adrenico en ω 6-docosapentaenoico. Sprecher H. *et al.* concluyen que la biosíntesis de DHA en animales implica la elongación del ácido adrenico y/o docosapentaenoico en el ácido de 24 carbonos correspondiente, la desaturación por una Δ 6-desaturasa y la β -oxidación, en lugar de la desaturación directa por una Δ 4-desaturasa.

Otros eucariotas, incluyendo hongos y plantas, tienen enzimas que desaturan en el carbono 12 (véase la publicación PCT WO 94/11516 y la Patente de Estados Unidos N° 5.443.974) y en el carbono 15 (véase la publicación PCT WO 93/11245). Por lo tanto, los ácidos grasos poliinsaturados fundamentales de animales proceden de la dieta y/o de la

desaturación y elongación del ácido linoleico o del ácido γ -linolénico. En vista de estas dificultades, es de un interés significativo aislar genes implicados en la síntesis de AGP a partir de especies que producen de forma natural estos ácidos grasos y expresar estos genes en un sistema microbiano, vegetal o animal que puede alterarse para proporcionar la producción de cantidades comerciales de uno o más AGP.

5

En vista de la discusión anterior, existe una clara necesidad para la enzima $\Delta 4$ -desaturasa, los genes respectivos que codifican esta enzima, así como para los métodos recombinantes de producción de esta enzima. Además, existe la necesidad de aceites que contengan niveles de AGP por encima de los presentes de forma natural, así como los enriquecidos en nuevos AGP. Dichos aceites pueden prepararse solamente por aislamiento y expresión del gen o genes de la $\Delta 4$ -desaturasa.

10

Sumario de la invención

La presente invención incluye una secuencia de nucleótidos aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad $\Delta 4$ -desaturasa. La secuencia de aminoácidos del polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 46 y SEC ID N°: 55. Además, en particular, la presente invención incluye una secuencia de nucleótidos aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad $\Delta 4$ -desaturasa, en la que la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido tiene una identidad de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 55.

15

20

Además, la presente invención incluye una secuencia de nucleótidos aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 36, SEC ID N°: 45 y SEC ID N°: 54. En particular, la presente invención incluye una secuencia de nucleótidos aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 70% con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 54.

25

Cada una de las secuencias descritas anteriormente codifica una $\Delta 4$ -desaturasa funcionalmente activa que utiliza un ácido graso monoinsaturado o poliinsaturado como sustrato. Las secuencias de nucleótidos pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de un hongo o un alga. En particular, cuando la secuencia de nucleótidos comprende la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17 o SEC ID N°: 45, puede obtenerse, por ejemplo, del hongo *Thraustochytrium aureum*. La secuencia que comprende la SEC ID N°: 36 puede obtenerse, por ejemplo, del hongo *Schizochytrium aggregatum*. La secuencia que comprende la SEC ID N°: 54 puede obtenerse, por ejemplo, del alga *Isochrysis galbana*. La presente invención también incluye una proteína purificada codificada por las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente.

30

35

En particular, la presente invención también incluye un polipéptido purificado que desatura ácidos grasos poliinsaturados en el carbono 4 y tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 70% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 46 y SEC ID N°: 55. En particular, la presente invención también incluye un polipéptido purificado que desatura ácidos grasos poliinsaturados en el carbono 4 y tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 55.

40

45

Además, la presente invención incluye un Método de producción de una $\Delta 4$ -desaturasa que comprende las etapas de: aislar una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 70% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 46 y SEC ID N°: 55 (o una identidad de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 55) o que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 36, SEC ID N°: 45 y SEC ID N°: 54 (o que tiene, en particular, una identidad de secuencia de al menos el 70% con la SEC ID N°: 54); construir un vector que comprende: i) la secuencia de nucleótidos aislada unida operativamente a ii) un promotor; e introducir dicho vector en una célula hospedadora durante un tiempo y en condiciones suficientes para la expresión de la desaturasa. La célula hospedadora puede ser, por ejemplo, una célula eucariota o una célula procariota. En particular, la célula procariota puede ser, por ejemplo, de *E. coli*, cianobacterias o *B. subtilis*. La célula eucariota puede ser, por ejemplo, una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula vegetal o una célula de hongo (por ejemplo, una célula de levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Candida spp.*, *Lipomyces starkey*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces spp.*, *Hansenula spp.*, *Trichoderma spp.* o *Pichia spp.*).

50

55

60

Además, la presente invención también incluye un vector que comprende: una secuencia de nucleótidos aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 46 y SEC ID N°: 55 (o, en particular, una identidad de aminoácidos de al menos el 70% con la SEC ID N°: 55) o que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido

65

ES 2 310 204 T3

por la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 36, SEC ID N°: 45 y SEC ID N°: 54 (o, en particular, una identidad de al menos el 70% con la SEC ID N°: 54), unida operativamente a un promotor. La invención también incluye una célula hospedadora que comprende este vector. La célula hospedadora puede ser, por ejemplo, una célula eucariota o una célula procariota. Las células eucariotas y células procariotas adecuadas son como se han definido anteriormente.

Además, la presente invención también incluye una célula vegetal, planta o tejido vegetal que comprende el vector anterior, en la que la expresión de la secuencia de nucleótidos del vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado por la célula vegetal, planta o tejido vegetal. El ácido graso poliinsaturado puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo constituido por ácido ω 6-docosapentaenoico o ácido docosahexaenoico.

Además, la presente invención también incluye una planta transgénica que comprende el vector anterior, en la que la expresión de la secuencia de nucleótidos del vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado en las semillas de la planta transgénica.

La presente invención también incluye un método (“primer método”) para producir un ácido graso poliinsaturado que comprende las etapas de: aislar una secuencia de nucleótidos que comprende o que es complementaria a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 70% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 46 y SEC ID N°: 55 (y, en particular, una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 70% con la SEC ID N°: 55) o que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16 y SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 36, SEC ID N°: 45 y SEC ID N°: 54 (y, en particular, de al menos el 70% con respecto a la SEC ID N°: 54); construir un vector que comprende la secuencia de nucleótidos aislada; introducir el vector en el interior de una célula hospedadora durante un tiempo y en condiciones suficientes para la expresión de la Δ 4-desaturasa; y exponer la Δ 4-desaturasa expresada a un ácido graso poliinsaturado sustrato para convertir el sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto. El ácido graso poliinsaturado sustrato puede ser, por ejemplo, ácido adrenico o ácido ω 3-docosapentaenoico y el ácido graso poliinsaturado producto puede ser, por ejemplo, ácido ω 6-docosapentaenoico o ácido docosahexaenoico, respectivamente. Este método puede comprender además la etapa de exponer el ácido graso poliinsaturado producto a otra enzima (por ejemplo, una Δ 4-desaturasa, una elongasa u otra desaturasa) para convertir el ácido graso poliinsaturado producto en otro ácido graso poliinsaturado (es decir, “segundo” método). En este método que contiene la etapa adicional (es decir, “segundo” método), el ácido graso poliinsaturado producto puede ser, por ejemplo, ácido ω 6-docosapentaenoico y el “otro” ácido graso poliinsaturado puede ser ácido docosahexaenoico.

Además, la presente invención incluye un método de producción de un ácido graso poliinsaturado que comprende las etapas de: exponer un ácido graso poliinsaturado sustrato a una o más enzimas seleccionadas del grupo constituido por una desaturasa y una elongasa para convertir el sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto; y exponer el ácido graso poliinsaturado producto a una Δ 4-desaturasa que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 46 y SEC ID N°: 55, para convertir el ácido graso poliinsaturado producto en un ácido graso poliinsaturado producto final.

Por ejemplo, un ácido graso poliinsaturado sustrato (por ejemplo, ácido eicosapentaenoico) puede exponerse a una elongasa o desaturasa (por ejemplo, MEL04 u otras elongasas o desaturasas de importancia en la ruta biosintética) para convertir el sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto (por ejemplo, ácido ω 3-docosapentaenoico). Después, el ácido graso poliinsaturado producto puede convertirse en un ácido graso poliinsaturado producto “final” (por ejemplo, ácido docosahexaenoico) por exposición a la Δ 4-desaturasa de la presente invención (véase la Figura 1). Por lo tanto, la Δ 4-desaturasa se utiliza en la última etapa del método para generar el producto deseado “final”. Como otro ejemplo, se puede exponer ácido linoleico a una Δ 6-desaturasa para generar ácido γ -linolénico (GLA) y, después, exponer el GLA a una elongasa y después a una Δ 5-desaturasa para generar el ácido araquidónico (AA). Después, el AA puede exponerse a una elongasa para convertirlo en ácido adrenico. Por último, el ácido adrenico puede exponerse a una Δ 4-desaturasa para convertirlo en ácido ω 6-docosapentaenoico (véase la Figura 1). Por lo tanto, el método implica la utilización de un sustrato de ácido linoleico y una serie de enzimas desaturasa y elongasa, además de la Δ 4-desaturasa, para lograr el producto final. Mediante el uso de un método similar, también se puede convertir el AGP sustrato, ácido γ -linolénico, en ácido docosahexaenoico. De nuevo, se usan diversas desaturasas y elongasas para lograr, en última instancia, el ácido ω 3-docosapentaenoico que después se expone a una o más Δ 4-desaturasas de la presente invención para convertirlo en ácido docosahexaenoico. (Los sustratos posibles incluyen los que se muestran en la Figura 1, por ejemplo, ácido linoleico, ácido γ -linolénico, ácido estearidónico, ácido araquidónico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido adrenico, ácido eicosapentaenoico y ácido eicosatetraenoico).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la ruta biosintética de ácidos grasos y el papel de la Δ 4-desaturasa en esta ruta.

La Figura 2 ilustra una comparación de aminoácidos de Δ 4-desaturasas producidas por cuatro plásmidos diferentes (SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20 y SEC ID N°: 21).

ES 2 310 204 T3

La Figura 3 ilustra la secuencia de nucleótidos que codifica la $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) del plásmido pRTA5 (SEC ID N°: 14).

5 La Figura 4 ilustra la secuencia de nucleótidos que codifica la $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) del plásmido pRTA6 (SEC ID N°: 15).

La Figura 5 ilustra la secuencia de nucleótidos que codifica la $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) del plásmido pRTA7 (SEC ID N°: 16).

10 La Figura 6 ilustra la secuencia de nucleótidos que codifica la $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) del plásmido pRTA8 (SEC ID N°: 17).

15 La Figura 7 ilustra la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) del plásmido pRTA5 (SEC ID N°: 18).

La Figura 8 ilustra la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) del plásmido pRTA6 (SEC ID N°: 19).

20 La Figura 9 ilustra la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) del plásmido pRTA7 (SEC ID N°: 20).

La Figura 10 ilustra la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) del plásmido pRTA8 (SEC ID N°: 21).

25 La Figura 11 ilustra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos descritas en la presente memoria.

La Figura 12 ilustra la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la elongasa MEL04 de un ratón.

30 La Figura 13 ilustra la secuencia de ADN de la supuesta $\Delta 4$ -desaturasa de ssa.con (SEC ID N°: 24) generada a partir de los clones saa9 y saa5 de *S. aggregatum* (ATCC 28209) (véase el Ejemplo VI).

La Figura 14 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 25) de la supuesta $\Delta 4$ -desaturasa codificada por la secuencia de ADN de ssa.con de *S. aggregatum* (ATCC 28209) (véase el Ejemplo VI).

35 La Figura 15 ilustra el alineamiento de los aminoácidos procedentes de la traducción de las fases de lectura abierta del ADN de ssa.con de *S. aggregatum* (ATCC 28209) (SEC ID N°: 25) y pRTA7 (SEC ID N°: 68) (véase el Ejemplo VI).

40 La Figura 16 ilustra la secuencia de ADN de la $\Delta 4$ -desaturasa de pRSA 1 (SEC ID N°: 36) de *S. aggregatum* (ATCC 28209) (véase el Ejemplo VII).

La Figura 17 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 37) de la $\Delta 4$ -desaturasa codificada por la secuencia de ADN de pRSA1 de *S. aggregatum* (ATCC 28209) (véase Ejemplo VII).

45 La Figura 18 ilustra la secuencia de ADN de la $\Delta 4$ -desaturasa de pRTA11 (SEC ID N°: 45) de *T. aureum* (BICC 7091) (véase el Ejemplo VII).

La Figura 19 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 46) de la supuesta $\Delta 4$ -desaturasa codificada por la secuencia de ADN de pRTA11 de *T. aureum* (BICC 7091) (véase el Ejemplo VII).

50 La Figura 20 ilustra la secuencia de ADN de la $\Delta 4$ -desaturasa de *Isochrysis galbana* (CCMP1323) (SEC ID N°: 54) presente en el clon pRIG6 (véase el Ejemplo IX).

55 La Figura 21 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 55) de la $\Delta 4$ -desaturasa codificada por la secuencia de ADN de pRIG6 de *Isochrysis galbana* (CCMP1323) (véase el Ejemplo IX).

La Figura 22 ilustra el porcentaje de identidad entre la nueva $\Delta 4$ -desaturasa de *I. galbana* (CCMP 1323) (SEC ID N°: 69) y la $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) (SEC ID N°: 70).

60 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos traducidas del gen de la $\Delta 4$ -desaturasa procedente del hongo *Thraustochytrium aureum* (BICC 7091), del hongo *Schizochytrium aggregatum* y del alga *Isochrysis galbana*. Además, la presente invención también incluye usos de estos genes y de las enzimas codificadas por estos genes. Por ejemplo, los genes y las enzimas correspondientes pueden usarse en la producción de ácidos grasos poliinsaturados tales como, por ejemplo, ácido $\omega 6$ -docosapentaenoico y/o ácido docosahexaenoico, que pueden añadirse a composiciones farmacéuticas, composiciones nutricionales y otros productos valiosos.

Los genes de $\Delta 4$ -desaturasa y las enzimas codificadas por los mismos

Como se ha indicado anteriormente, las enzimas codificadas por los genes de $\Delta 4$ -desaturasa de la presente invención son esenciales en la producción de ácidos grasos poliinsaturados altamente insaturados que tienen una longitud superior a 22 carbonos. Las secuencias de nucleótidos de los genes de $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* aislados, que se diferenciaban en base al plásmido generado (véase el Ejemplo III), se muestran en las Figuras 3-6, y las secuencias de aminoácidos de las proteínas purificadas correspondientes se muestran en la Figura 7-10. Se muestra una secuencia de nucleótidos de *T. aureum* aislada adicional en la Figura 18 (véase el Ejemplo VII), y la secuencia de aminoácidos codificada se muestra en la Figura 19. Las secuencias de nucleótidos de las secuencias de $\Delta 4$ -desaturasa de *Schizochytrium aggregatum* aisladas se muestran en las Figuras 13 y 16, y las secuencias de aminoácidos codificadas se muestran en las Figuras 14 y 17, respectivamente. Además, las secuencias de nucleótidos de la secuencia de la $\Delta 4$ -desaturasa de *Isochrysis galbana* aislada se muestran en la Figura 20, y la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos se muestra en la Figura 21.

Como un ejemplo de la importancia de los genes de la presente invención, los genes de $\Delta 4$ -desaturasa aislados convierten el ácido adrélico en ácido $\omega 6$ -docosapentaenoico o convierten el ácido $\omega 3$ -docosapentaenoico en ácido docosaheptaenoico.

Debe señalarse que la presente invención también incluye secuencias de nucleótidos aisladas (y las correspondientes proteínas codificadas) que tienen secuencias que comprenden, se corresponden con, son idénticas a o complementarias a, con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 70%, más preferiblemente de al menos aproximadamente el 80% y, más preferiblemente, de al menos aproximadamente el 90%, la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16 o SEC ID N°: 17 (es decir, las secuencias de nucleótidos del gen de la $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304), la SEC ID N°: 36 (es decir, la secuencia de nucleótidos del gen de la $\Delta 4$ -desaturasa de *Schizochytrium aggregatum* (ATCC 28209) o la SEC ID N°: 45 (es decir, la secuencia de nucleótidos del gen de la $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (BICC 7091)) o la SEC ID N°: 54 (es decir, la secuencia de nucleótidos del gen de la $\Delta 4$ -desaturasa de *Isochrysis galbana*), todas descritas en la presente memoria. Con respecto a la secuencia de *I. galbana*, en particular, la presente invención también incluye secuencias de nucleótidos (y las proteínas codificadas correspondientes) que tienen secuencias que comprenden, se corresponden con, son idénticas a o complementarias a al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80% y, más preferiblemente, al menos el 90% de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 54. (Todos los números enteros entre el 70% y el 100% también se considera que están dentro del alcance de la presente invención con respecto al porcentaje de identidad). Dichas secuencias pueden obtenerse de cualquier fuente, aislarse a partir de una fuente natural o producirse mediante una ruta semisintética o sintetizarse *de novo*. En particular, dichas secuencias pueden aislarse u obtenerse a partir de otras fuentes distintas de las descritas en los ejemplos (por ejemplo, bacterias, hongos, algas, *C. elegans*, ratones o seres humanos).

Además, la presente invención también describe fragmentos y derivados de las secuencias de nucleótidos de la presente invención (es decir, la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 36, SEC ID N°: 45 o SEC ID N°: 54), así como de las secuencias obtenidas a partir de otras fuentes, y que tienen la complementariedad, identidad o correspondencia descritas anteriormente y que tienen actividad $\Delta 4$ -desaturasa.

Para los fines de la presente invención, un “fragmento” de una secuencia de nucleótidos se define como una secuencia contigua de aproximadamente al menos 6, preferiblemente de al menos aproximadamente 8, más preferiblemente de al menos aproximadamente 10 nucleótidos y, aun más preferiblemente, de al menos aproximadamente 15 nucleótidos que se corresponden con una región de la secuencia de nucleótidos especificada.

La invención también incluye un polipéptido purificado que desatura ácidos grasos poliinsaturados en la posición del carbono 4 y tiene una similitud o identidad de aminoácidos de al menos aproximadamente el 70%, preferiblemente una similitud o identidad de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80% y, más preferiblemente, una similitud o identidad de aminoácidos de al menos el 90% con las secuencias de aminoácidos (es decir, SEC ID N°: 18 (que se muestra en la Figura 7), SEC ID N°: 19 (que se muestra en la Figura 8), SEC ID N°: 20 (que se muestra en la Figura 9), SEC ID N°: 21 (que se muestra en la Figura 10), SEC ID N°: 37 (que se muestra en la Figura 17), SEC ID N°: 46 (que se muestra en la Figura 19) y SEC ID N°: 55 (que se muestra en la Figura 21) de las proteínas señaladas anteriormente que, a su vez, están codificadas por las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente. En particular, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 4$ -desaturasa de *I. galbana*, la presente invención incluye un polipéptido purificado que desatura ácidos grasos poliinsaturados en la posición del carbono 4 y tiene una similitud o identidad de aminoácidos de al menos aproximadamente el 70% y, preferiblemente, una similitud o identidad de aminoácidos de al menos aproximadamente el 90% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 55 (es decir, la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 4$ -desaturasa de *I. galbana* que se muestra en la Figura 21). (Todos los números enteros entre el 70% y el 100% de similitud o identidad también se incluyen dentro del alcance de la presente invención).

El término “identidad” se refiere a la relación entre dos secuencias en base a nucleótido por nucleótido a lo largo de una ventana o segmento de comparación en particular. Por lo tanto, la identidad se define como el grado de igualdad, correspondencia o equivalencia entre las mismas cadenas (con sentido o antisentido) de dos segmentos de ADN (o dos secuencias de aminoácidos). El “porcentaje de identidad de secuencia” se calcula por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una región particular, determinación del número de posiciones en las que aparecen bases o aminoácidos idénticos en ambas secuencias para dar el número de posiciones

emparejadas, división del número de dichas posiciones por el número total de posiciones en el segmento que se esté comparando y multiplicación del resultado por 100. El alineamiento óptimo de secuencias puede realizarse mediante el algoritmo de Smith y Waterman, *Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante el método de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 2444 (1988) y mediante programas informáticos que aplican los algoritmos pertinentes (por ejemplo, Clustal Macaw Pileup (<http://cmgm.stanford.edu/biochem218/11Multiple.pdf>; Higgins *et al.*, *CABIOS*. 5L151-153 (1989)), FASTDB (Intelligence Genetics), BLAST (National Center for Biomedical Information; Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402 (1997)), PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI) o GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI). (Véase la Patente de Estados Unidos N° 5.912.120).

Para los fines de la presente invención, la “complementariedad” se define como el grado de relación entre dos segmentos de ADN. Se determina por medición de la capacidad de la cadena con sentido de un segmento de ADN para hibridar con la cadena antisentido del otro segmento de ADN en condiciones apropiadas para formar una doble hélice. Un “complementario” se define como una secuencia que se empareja con una secuencia dada en base a las reglas canónicas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, una secuencia A-G-T en una cadena de nucleótidos es “complementaria” a T-C-A en la otra cadena.

En la doble hélice, si aparece adenina en una cadena, aparece timina en la otra cadena. De forma similar, allí donde se encuentra guanina en una cadena, se encuentra citosina en la otra. Cuanto mayor sea la relación entre las secuencias de nucleótidos de dos segmentos de ADN, mayor será la capacidad de formar dúplex híbridos entre las cadenas de los dos segmentos de ADN.

La “similitud” entre dos secuencias de aminoácidos se define como la presencia de una serie de restos aminoácidos idénticos, así como conservados, en ambas secuencias. Cuando mayor sea el grado de similitud entre dos secuencias de aminoácidos, mayor será la correspondencia, igualdad o equivalencia de las dos secuencias. (La “identidad” entre dos secuencias de aminoácidos se define como la presencia de una serie de restos aminoácidos exactamente iguales o invariables en ambas secuencias). Las definiciones de “complementariedad”, “identidad” y “similitud” son bien conocidas por los especialistas en la técnica.

La expresión “codificado por” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica, en la que la secuencia polipeptídica o una porción de la misma contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 3 aminoácidos, más preferiblemente de al menos 8 aminoácidos y, aún más preferiblemente, de al menos 15 aminoácidos de un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico.

La presente invención también describe una secuencia de nucleótidos aislada que codifica una actividad desaturasa de AGP y que es hibridable en condiciones moderadamente rigurosas con un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende o que es complementaria a las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente. Una molécula de ácido nucleico es “hibridable” con otra molécula de ácido nucleico cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede hibridar con la otra molécula de ácido nucleico en las condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica (véase Sambrook *et al.*, “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*”, Segunda Edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la “rigurosidad” de la hibridación. La “hibridación” requiere que dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias. Sin embargo, dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, pueden aparecer emparejamientos erróneos entre bases. La rigurosidad apropiada para la hibridación de ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementariedad. Dichas variables se conocen bien en la técnica. Más específicamente, cuanto mayor sea el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de la T_m para híbridos de ácidos nucleicos que tengan esas secuencias. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han obtenido ecuaciones para el cálculo de la T_m (véase Sambrook *et al.*, anteriormente). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, la posición de los emparejamientos erróneos se vuelve más importante y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook *et al.*, anteriormente).

Como se usa en la presente memoria, un “fragmento o secuencia de ácido nucleico aislado” es un polímero de ARN o ADN que es monocatenario o bicatenario, que opcionalmente contiene bases de nucleótidos sintéticos, no naturales o modificados. Un fragmento de ácido nucleico aislado en la forma de un polímero de ADN puede estar compuesto por uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético. (Un “fragmento” de un polinucleótido determinado se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia contigua de aproximadamente al menos aproximadamente 6 nucleótidos, preferiblemente de al menos aproximadamente 8 nucleótidos, más preferiblemente de al menos aproximadamente 10 nucleótidos y, aún más preferiblemente, de al menos aproximadamente 15 nucleótidos y, más preferiblemente, de al menos aproximadamente 25 nucleótidos idénticos o complementarios a una región de la secuencia de nucleótidos determinada.) Se hace referencia a los nucleótidos (que habitualmente se encuentran en su forma 5'-monofosfato) por su denominación de una sola letra de la forma siguiente: “A” para adenilato o desoxiadenilato (para ARN o ADN, respectivamente), “C” para citidilato o desoxicitidilato, “G” para guanilato o desoxiguanilato, “U” para uridilato, “T” para desoxitimidilato, “R” para purinas (A o G), “Y” para pirimidinas (C o T), “K” para G o T, “H” para A o C o T, “I” para inosina y “N” para cualquier nucleótido.

Las expresiones “fragmento o subfragmento que es funcionalmente equivalente” y “fragmento o subfragmento funcionalmente equivalente” se usan indistintamente en la presente memoria. Estas expresiones se refieren a una

ES 2 310 204 T3

porción o subsecuencia de un fragmento de ácido nucleico aislado en el que se conserva la capacidad de modificar la expresión génica o producir un fenotipo determinado independientemente de que el fragmento o subfragmento codifique una enzima activa. Por ejemplo, el fragmento o subfragmento puede usarse en el diseño de construcciones quiméricas para producir el fenotipo deseado en una planta transformada. Pueden diseñarse construcciones quiméricas para el uso en la cosupresión o terapia antisentido por unión a un fragmento de ácido nucleico o subfragmento del mismo, independientemente de que codifique o no una enzima activa, en la orientación apropiada con respecto a una secuencia promotora vegetal.

Los términos “homología”, “homólogo”, “sustancialmente similar” y “que se corresponde sustancialmente” se usan indistintamente en la presente memoria. Se refieren a fragmentos de ácido nucleico en los que los cambios en uno o más bases nucleotídicas no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico para mediar la expresión génica o producir un fenotipo determinado. Estos términos también se refieren a modificaciones de los fragmentos de ácido nucleico descritos en la presente invención, tales como delección o inserción de uno o más nucleótidos, que no alteran sustancialmente las propiedades funcionales del fragmento de ácido nucleico resultante con respecto a fragmento inicial no modificado. Por lo tanto se entiende, como apreciarán los especialistas en la técnica, que la invención describe más que las secuencias ejemplares específicas.

El término “gen” se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, incluyendo las secuencias reguladoras que preceden (secuencias 5' no codificantes) y que siguen (secuencias 3' no codificantes) a la secuencia codificante.

La expresión “gen nativo” se refiere a un gen como se encuentra en la naturaleza, con sus propias secuencias reguladoras. Por el contrario, la expresión “construcción quimérica” se refiere a una combinación de fragmentos de ácidos nucleicos que normalmente no se encuentran juntos en la naturaleza. Por consiguiente, una construcción quimérica puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que proceden de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes que proceden de la misma fuente, pero organizadas de una forma diferente a la que se encuentra normalmente en la naturaleza. (El término “aislada” significa que la secuencia se retira de su entorno natural).

Un gen “extraño” se refiere a un gen que normalmente no se encuentra en el organismo hospedador, pero que se introduce en el organismo hospedador por transferencia génica. Los genes extraños pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo o construcciones quiméricas. Un “transgén” es un gen que se ha introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación.

La “secuencia codificante” se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos específica. Las “secuencias reguladoras” se refieren a secuencias de nucleótidos localizadas cadena arriba (secuencias 5' no codificantes), en el interior o cadena abajo (secuencias 3' no codificantes) de una secuencia codificante y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN, o en la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir, pero sin limitación, promotores, secuencias líder de la traducción, intrones y secuencias de reconocimiento de poliadenilación.

El término “promotor” se refiere a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o de ARN funcional. La secuencia promotora consiste en los elementos cadena arriba proximales y más distales, los últimos elementos denominados con frecuencia potenciadores. Por consiguiente, un “potenciador” es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad promotora y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o la especificidad de tejido de un promotor. También pueden localizarse secuencias promotoras en el interior de las porciones transcritas de genes y/o cadena abajo de las secuencias transcritas. Los promotores pueden proceder en su totalidad de un gen nativo o estar compuestos por diferentes elementos procedentes de diferentes promotores que se encuentran en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintético. Se entiende por los especialistas en la técnica que promotores diferentes pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos celulares, o en fases del desarrollo diferentes, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de tipos celulares hospedadores casi todo el tiempo se denominan comúnmente como “promotores constitutivos”. Constantemente se están descubriendo nuevos promotores de diversos tipos útiles en células vegetales; pueden encontrarse numerosos ejemplos en la recopilación de Okamura y Goldberg (1989) *Biochemistry of Plants* 15: 1-82. Se reconoce además que, puesto que la mayoría de los casos no se han definido completamente los límites exactos de las secuencias reguladoras, fragmentos de ADN con alguna variación pueden tener una actividad promotora idéntica.

Un “intrón” es una secuencia intermedia en un gen que no codifica una porción de la secuencia proteica. Por lo tanto, dichas secuencias se transcriben en un ARN pero después se escinden y no se traducen. El término también se usa para las secuencias de ARN escindidas. Un “exón” es una porción de la secuencia génica que se transcribe y que se encuentra en el ARN mensajero maduro procedente del gen, pero que no es necesariamente una parte de la secuencia que codifica el producto génico final.

La “secuencia líder de traducción” se refiere a una secuencia de ADN localizada entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia codificante. La secuencia líder de traducción está presente en el ARNm completamente procesado cadena arriba de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia líder de traducción puede afectar al procesamiento del transcrito primario en ARNm, a la estabilidad del ARNm o a la eficacia de la traducción. Se han

ES 2 310 204 T3

descrito ejemplos de secuencias líder de traducción (Tuner, R. y Foster, G. D. (1995) *Molecular Biotechnology* 3: 225).

Las “secuencias 3’ no codificantes” se refieren a secuencias de ADN localizadas cadena debajo de una secuencia codificante e incluyen sitios de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del ARNm o a la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza habitualmente por que afecta a la adición de extensiones de ácido poliadenílico en el extremo 3’ del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias 3’ no codificantes se ejemplifica por Ingelbrecht *et al.*, (1989) *Plant Cell* 1: 671-680.

La expresión “transcrito de ARN” se refiere al producto resultante de la transcripción catalizada por ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Cuando el transcrito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN, se denomina como transcrito primario, o puede ser una secuencia de ARN procedente del procesamiento post-transcripcional del transcrito primario y se denomina como ARN maduro. La expresión “ARN mensajero (ARNm)” se refiere al ARN que carece de intrones y que puede traducirse en una proteína por la célula. El “ADNc” se refiere a un ADN que es complementario a y se sintetiza a partir de un molde de ARNm usando la enzima transcriptasa inversa. El ADNc puede ser monocatenario o convertirse en la forma bicatenaria usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. El ARN “con sentido” se refiere al transcrito de ARN que incluye el ARNm y que puede traducirse en una proteína en el interior de una célula o *in vitro*. El “ARN antisentido” se refiere a un transcrito de ARN que es complementario a todo o a una parte de un transcrito primario diana o ARNm y que bloquea la expresión de un gen diana (Patente de Estados Unidos N° 5.107.065). La complementariedad de un ARN antisentido puede ser con cualquier parte del transcrito génico específico, es decir, en la secuencia 5’ no codificante, secuencia 3’ no codificante, intrones o en la secuencia codificante. La expresión “ARN funcional” se refiere a ARN antisentido, ARN de ribozima u otro ARN que puede no traducirse pero que aún así tiene un efecto sobre los procesos celulares. Las expresiones “complementario” y “complementario inverso” se usan indistintamente en la presente memoria con respecto a los transcritos de ARNm y pretenden definir al ARN antisentido del mensaje.

La expresión “ARN endógeno” se refiere a cualquier ARN que está codificado por cualquier secuencia de ácido nucleico presente en el genoma del hospedador antes de la transformación con la construcción recombinante de la presente invención, ya sea de origen natural o no natural, es decir, introducido por medios recombinantes, mutagénesis, etc.

La expresión “de origen no natural” significa artificial, que no concuerda con el que se encuentra normalmente en la naturaleza.

La expresión “unido operativamente” se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico, de tal modo que la función de uno esté regulada por el otro. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificante cuando es capaz de regular la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden estar unidas operativamente a secuencias reguladoras en una orientación con sentido o antisentido. En otro ejemplo, las regiones de ARN complementarias de la invención pueden estar unidas operativamente, directamente o indirectamente, al 5’ de la ARNm diana o al 3’ del ARNm diana, o en el interior del ARNm diana, o una primera región complementaria es 5’ y su complementario es 3’ al ARNm diana.

El término “expresión”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la producción de un producto final funcional. La expresión de un gen implica la transcripción del gen y la traducción del ARNm en una proteína precursora o madura. La “inhibición antisentido” se refiere a la producción de transcritos de ARN antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína diana. La “cosupresión” se refiere a la producción de transcritos de ARN con sentido capaces de suprimir la expresión de genes extraños o endógenos idénticos o sustancialmente similares (Patente de Estados Unidos N° 5.231.020).

La proteína “madura” se refiere a un polipéptido procesado postraduccionalmente; es decir, uno del que se ha eliminado cualquier prepéptido o propéptido presente en el producto de traducción primario. La proteína “precursora” se refiere al producto primario de la traducción de ARNm; es decir, con prepéptidos y propéptidos todavía presentes. Los prepéptidos y propéptidos pueden ser, pero sin limitación, señales de localización intracelular.

La expresión “transformación estable” se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico al interior de un genoma de un organismo hospedador que da como resultado una herencia genéticamente estable. Por el contrario, la expresión “transformación transitoria” se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico al interior del núcleo o de un orgánulo que contiene ADN de un organismo hospedador que da como resultado la expresión génica sin integración o herencia estable. Los organismos hospedadores que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan como organismos “transgénicos”. El método preferido de transformación de células de arroz, maíz y otras monocotiledóneas es el uso de la tecnología de transformación de partículas aceleradas o “pistola génica” (Klein *et al.*, (1987) *Nature* (Londres) 327: 70-73; Patente de Estados Unidos N° 4.945.050) o un método mediado por *Agrobacterium* usando un plásmido Ti apropiado que contiene el transgén (Ishida Y. *et al.*, 1996, *Nature Biotech.* 14: 745-750). El término “transformación”, como se usa en la presente memoria, se refiere tanto a la transformación estable como a la transformación transitoria.

ES 2 310 204 T3

Las técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular convencionales usadas en la presente memoria son bien conocidas en la técnica y se describen más completamente en Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989 (en lo sucesivo, “Sambrook”).

El término “recombinante” se refiere a una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante la manipulación de segmentos de ácidos nucleicos aislados por técnicas de ingeniería genética.

La “PCR” o “reacción en cadena de la polimerasa” es una técnica para la síntesis de grandes cantidades de segmentos de ADN específicos que consiste en una serie de ciclos repetitivos (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Típicamente, el ADN bicatenario se desnaturaliza por calor, los dos cebadores complementarios a los límites 3' del segmento de diana se hibridan a baja temperatura y después se extienden a una temperatura intermedia. Un conjunto de estas tres etapas consecutivas se denomina como ciclo.

La reacción en cadena de la polimerasa (“PCR”) es una técnica potente usada para amplificar ADN millones de veces mediante la replicación repetida de un molde en un corto periodo de tiempo. (Mullis *et al.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273 (1986); Erlich *et al.*, Solicitud de Patente Europea 50.424; Solicitud de Patente Europea 84.796; Solicitud de Patente Europea 258.017, Solicitud de Patente Europea 237.362, Mullis, Solicitud de Patente Europea 201.184; Mullis *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 4.683.202; Erlich, Patente de Estados Unidos N° 4.582.788; y Saiki *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 4.683.194). El proceso utiliza conjuntos de oligonucleótidos sintetizados *in vitro* específicos para cebar la síntesis de ADN. El diseño de los cebadores depende de las secuencias de ADN que se desea analizar. La técnica se lleva a cabo mediante muchos ciclos (habitualmente 20-50) de fusión del molde a una temperatura elevada, permitiendo que los cebadores hibriden con las secuencias complementarias dentro del molde y, después, replicación del molde con ADN polimerasa.

Los productos de las reacciones de PCR se analizan por separación en geles de agarosa seguida de tinción con bromuro de etidio y visualización con transiluminación UV. Como alternativa, pueden añadirse dNTP radiactivos a la PCR para incorporar un marcador en los productos. En este caso, los productos de PCR se visualizan por exposición del gel a una película de rayos x. La ventaja añadida del radiomarcaje de productos de PCR es que pueden cuantificarse los niveles de productos de amplificación individuales.

Las expresiones “construcción recombinante”, “construcción de expresión” y “construcción de expresión recombinante” se usan indistintamente en la presente memoria. Estas expresiones se refieren a una unidad funcional de material genético que puede insertarse en el genoma de una célula usando una metodología convencional bien conocida por un especialista en la técnica. Dicha construcción puede usarse en solitario o junto con un vector. Si se usa un vector, entonces la elección del vector depende del método que se usará para transformar plantas hospedadoras, como bien saben los especialistas en la técnica. Por ejemplo, puede usarse un vector plasmídico. El especialista es bien consciente de los elementos genéticos que deben estar presentes en el vector para transformar, seleccionar y propagar con éxito células hospedadoras que comprendan cualquiera de los fragmentos de ácido nucleico aislados de la invención. El especialista también reconocerá que diferentes acontecimientos de transformación independientes darán como resultado niveles y patrones de expresión diferentes (Jones *et al.*, (1985) EMBO J. 4: 2411-2418; De Almeida *et al.*, (1989) Mol. Gen. Genetics 218: 78-86) y, por lo tanto, que deben explorarse múltiples acontecimientos para obtener líneas que presenten el nivel y el patrón de expresión deseado. Dicha exploración puede llevarse a cabo mediante análisis de Southern de ADN, análisis de Northern de la expresión de ARNm, análisis de Western de la expresión proteica o análisis fenotípico.

Producción de la enzima $\Delta 4$ -desaturasa

Una vez que se ha aislado el gen que codifica la enzima $\Delta 4$ -desaturasa, puede introducirse después en una célula hospedadora procariota o eucariota mediante el uso de un vector o construcción. El vector, por ejemplo, un bacteriófago, cósmido o plásmido, puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima $\Delta 4$ -desaturasa, así como cualquier secuencia reguladora (por ejemplo, promotora) que sea funcional en la célula hospedadora y que sea capaz de provocar la expresión de la desaturasa codificada por la secuencia de nucleótidos. La secuencia reguladora (por ejemplo, un promotor) está en una asociación operativa con o unida operativamente a la secuencia de nucleótidos. (Se dice que un promotor está “unido operativamente” con una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante). Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, los de genes que codifican la alcohol deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglucoisomerasa, fosfoglicerato quinasa, fosfatasa ácida, T7, TPI, lactasa, metalotioneína, promotor inmediato temprano de citomegalovirus, proteína ácida del suero, glucoamilasa y promotores activados en presencia de galactosa, por ejemplo, GAL1 y GAL10. Además, también pueden incluirse dentro del vector secuencias de nucleótidos que codifican otras proteínas, oligosacáridos, lípidos, etc., así como otras secuencias reguladoras tales como una señal de poliadenilación (por ejemplo, la señal de poli A del antígeno SV-40T, ovoalbúmina u hormona del crecimiento bovino). La selección de las secuencias presentes en la construcción depende de los productos de expresión deseados, así como de la naturaleza de la célula hospedadora.

Como se ha señalado anteriormente, una vez que se ha construido el vector, entonces puede introducirse en la célula hospedadora de elección por métodos conocidos por los especialistas en la técnica que incluyen, por ejemplo,

ES 2 310 204 T3

transfección, transformación y electroporación (véase *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Después, la célula hospedadora se cultiva en condiciones adecuadas que permitan la expresión de los genes que conducen a la producción del AGP deseado, que después se recupera y se purifica.

5

Los ejemplos de células hospedadoras procariotas adecuadas incluyen, por ejemplo, bacterias tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, así como *Cyanobacteria*, tal como *Spirulina* spp. (es decir, algas verdeazuladas). Los ejemplos de células hospedadoras eucariotas adecuadas incluyen, por ejemplo, células de mamífero, células vegetales, células de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Lipomyces starkey*, *Candida* spp., tales como *Yarrowia* (*Candida*) *lipolytica*, *Kluyveromyces* spp., *Pichia* spp., *Trichoderma* spp o *Hansenula* spp., o células de hongos tales como células de hongos filamentosos, por ejemplo, *Aspergillus*, *Neurospora* y *Penicillium*. Preferiblemente, se utilizan células de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería).

La expresión en una célula hospedadora puede lograrse de una forma transitoria o estable. La expresión transitoria puede producirse a partir de construcciones introducidas que contengan señales de expresión funcionales en la célula hospedadora, pero de construcciones que no se repliquen y que rara vez se integren en la célula hospedadora, o cuando la célula hospedadora no esté proliferando. La expresión transitoria también puede lograrse por inducción de la actividad de un promotor regulable unido operativamente al gen de interés, aunque tales sistemas inducibles presentan frecuentemente un bajo nivel de expresión basal. La expresión estable puede lograrse por introducción de una construcción que puede integrarse en el genoma hospedador o que se replique de forma autónoma en la célula hospedadora. La expresión estable del gen de interés puede seleccionarse mediante el uso de un marcador de selección localizado en o transfectedo con la construcción de expresión, seguido de la selección para las células que expresen el marcador. Cuando la expresión estable es el resultado de la integración, el lugar de la integración de la construcción puede suceder de forma aleatoria dentro del genoma hospedador o puede estar dirigido por el uso de construcciones que contienen regiones de homología con el genoma hospedador suficientes para dirigir la recombinación con el locus hospedador. Cuando las construcciones se dirigen a un locus endógeno, todas o algunas de las regiones reguladoras de la transcripción y traducción pueden proporcionarse por el locus endógeno.

También puede usarse un mamífero transgénico para expresar la enzima de interés (es decir, la $\Delta 4$ -desaturasa) y, en última instancia, el o los AGP de interés. Más específicamente, una vez que se genera la construcción descrita anteriormente, puede insertarse en el pronúcleo de un embrión. Después, el embrión puede implantarse en una hembra receptora. Como alternativa, también podría utilizarse un método de transferencia nuclear (Schnieke *et al.*, *Science* 278: 2130-2133 (1997)). Después se permite la gestación y el nacimiento (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.750.176 y la Patente de Estados Unidos N° 5.700.671). Después, la leche, el tejido u otras muestras de fluido de la descendencia deberían contener niveles alterados de AGP en comparación con los niveles que normalmente se encuentran en el animal no transgénico. Pueden controlarse las generaciones posteriores para determinar la producción de los niveles alterados o aumentados de AGP y, por lo tanto, la incorporación del gen que codifica la enzima desaturasa deseada en sus genomas. El mamífero utilizado como el hospedador puede seleccionarse del grupo constituido por, un ratón, una rata, un conejo, un cerdo, una cabra, una oveja, un caballo y una vaca. Sin embargo, puede usarse cualquier mamífero con tal de que tenga la capacidad de incorporar el ADN que codifica la enzima de interés en su genoma.

Para la expresión de un polipéptido de desaturasa, las regiones funcionales de inicio y terminación de la transcripción y de la traducción están unidas operativamente al ADN que codifica el polipéptido de desaturasa. Las regiones de inicio y terminación de la transcripción y de la traducción proceden de una diversidad de fuentes no excluyentes, que incluyen el ADN que se va a expresar, genes que se sabe o se sospecha que son capaces de la expresión en el sistema deseado, vectores de expresión, síntesis química o de un locus endógeno en una célula hospedadora. La expresión en un tejido vegetal y/o parte de una planta presenta unos rendimientos determinados, particularmente cuando el tejido o parte es uno que se recoge de forma temprana, tal como semillas, hojas, frutos, flores, raíces, etc. La expresión puede dirigirse a esa localización dentro de la planta mediante la utilización de una secuencia reguladora específica tal como las de las Patentes de Estados Unidos N° 5.463.174, 4.943.674, 5.106.739, 5.175.095, 5.420.034, 5.188.958 y 5.589.379. Como alternativa, la proteína expresada puede ser una enzima que produzca un producto que puede incorporarse, directamente o después de modificaciones adicionales, en una fracción fluida de la planta hospedadora. La expresión de un gen de desaturasa o de transcritos de desaturasa antisentido puede alterar los niveles de AGP específicos o de derivados de los mismos que se encuentran en partes de plantas y/o en tejidos vegetales. La región codificante del polipéptido de desaturasa puede expresarse en solitario o con otros genes para producir tejidos y/o partes de plantas que contienen mayores proporciones de los AGP deseados, o en los que la composición de AGP se asemeja más a la de la leche materna humana (Prieto *et al.*, publicación PCT WO 95/24494). La región de terminación puede proceder de la región 3' del gen del que se obtuvo la región de inicio o de un gen diferente. Se sabe y se ha descubierto que un gran número de regiones de terminación son satisfactorias en una diversidad de hospedadores del mismo y de diferente género y especie. Habitualmente, la región de terminación se selecciona como una cuestión de conveniencia en lugar de por cualquier propiedad particular.

Como se ha indicado anteriormente, también puede utilizarse una planta (por ejemplo, *Glycine max* (soja) o *Brassica napus* (colza)) o tejido vegetal como un hospedador o célula hospedadora, respectivamente, para la expresión de la enzima desaturasa que, a su vez, puede utilizarse en la producción de ácidos grasos poliinsaturados. Más específicamente, los AGP deseados pueden expresarse en las semillas. Se conocen en la técnica métodos de aislamiento de aceites de semillas. Por lo tanto, además de proporcionar una fuente de AGP, los componentes de aceites de semillas

pueden manipularse mediante la expresión del gen de la desaturasa, así como de quizás otros genes de desaturasa y genes de elongasa, para proporcionar aceites de semillas que pueden añadirse a composiciones nutricionales, composiciones farmacéuticas, piensos animales y cosméticos. De nuevo, un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica la desaturasa unida operativamente a un promotor se introducirá en el tejido vegetal o planta durante un tiempo y en condiciones suficientes para la expresión del gen de la desaturasa. El vector también puede comprender uno o más genes que codifican otras enzimas, por ejemplo, $\Delta 5$ -desaturasa, elongasa, $\Delta 12$ -desaturasa, $\Delta 15$ -desaturasa, $\Delta 17$ -desaturasa y/o $\Delta 19$ -desaturasa. El tejido vegetal o planta puede producir el sustrato pertinente (por ejemplo, ácido adrenico o ácido $\omega 3$ -docosapentaenoico) sobre el que actúa la enzima, o un vector que codifica enzimas que producen dichos sustratos puede introducirse en el tejido vegetal, célula vegetal o planta. Además, el sustrato puede pulverizarse sobre tejidos vegetales que expresen las enzimas apropiadas. Usando estas diversas técnicas, se pueden producir AGP (por ejemplo, ácidos grasos n-6 insaturados tales como ácido $\omega 6$ -docosapentaenoico, o ácidos grasos n-3 tales como ácido docosahexaenoico) mediante el uso de una célula vegetal, tejido vegetal o planta. Debería señalarse que la invención también incluye una planta transgénica que comprende el vector descrito anteriormente, en el que la expresión de la secuencia de nucleótidos del vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado, por ejemplo, en las semillas de la planta transgénica.

Se conoce bien en la técnica la regeneración, desarrollo y cultivo de plantas a partir de transformantes de protoplastos vegetales individuales o de diversos explantes transformados (Weissbach y Weissbach, en: *Methods for Plant Molecular Biology* (Eds.), Academic Press, Inc., San Diego, CA (1988)). Este proceso de regeneración y crecimiento típicamente incluye las etapas de selección de células transformadas, cultivo de las células individualizadas a través de las fases habituales de desarrollo embrionario hasta la fase de plántula enraizada. Los embriones y semillas transgénicos se regeneran de forma similar. Los brotes enraizados transgénicos resultantes se plantan después en un medio de crecimiento de plantas apropiado, tal como suelo.

Se conoce bien en la técnica el desarrollo o la regeneración de plantas que contienen el gen exógeno extraño que codifica una proteína de interés. Preferiblemente, las plantas regeneradas se autopolinizan para proporcionar plantas transgénicas homocigotas. De otra forma, el polen obtenido a partir de las plantas regeneradas se cruza con plantas cultivadas a partir de semillas de líneas agrícolamente importantes. Por el contrario, el polen de plantas de estas líneas importantes se usa para polinizar las plantas regeneradas. Una planta transgénica de la presente invención que contiene un polipéptido deseado se cultiva usando métodos bien conocidos por un especialista en la técnica.

Existe una diversidad de métodos para regeneración de plantas a partir de tejido vegetal. El método particular de regeneración dependerá del tejido vegetal de partida y de la especie vegetal particular que se vaya a regenerar.

Se han publicado métodos para transformar dicotiledóneas, principalmente mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, y obtener plantas transgénicas para algodón (Patentes de Estados Unidos N° 5.004.863, Patente de Estados Unidos N° 5.159.135, Patente de Estados Unidos N° 5.518.908); soja (Patente de Estados Unidos N° 5.569.834, Patente de Estados Unidos N° 5.416.011, McCabe *et al.*, *Biol Technology* 6: 923 (1988), Christou *et al.*, *Plant Physiol.* 87: 671-674 (1988)); crucíferas (Patente de Estados Unidos N° 5.463.174); cacahuete (Cheng *et al.*, *Plant Cell Rep.* 15: 653-657 (1996), McKenty *et al.*, *Plant Cell Rep.* 14: 699-703 (1995)); papaya; y guisante (Grant *et al.*, *Plant Cell Rep.* 15: 254-258, (1995)).

También se ha descrito la transformación de monocotiledóneas usando electroporación, bombardeo de partículas y *Agrobacterium*. Se ha conseguido la transformación y la regeneración de plantas en espárragos (Bytebier *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84: 5354, (1987)); cebada (Wan y Lemaux, *Plant Physiol* 104: 37 (1994)); *Zea mays* (Rhodes *et al.*, *Science* 240: 204 (1988), Gordon-Kamm *et al.*, *Plant Cell* 2: 603-618 (1990), Fromm *et al.*, *Biol Technology* 8: 833 (1990), Koziel *et al.*, *Biol Technology* 11: 194, (1993), Armstrong *et al.*, *Crop Science* 35: 550-557 (1995)); avena (Somers *et al.*, *Biol Technology* 10: 1589 (1992)); dátilo (Horn *et al.*, *Plant Cell Rep.* 7: 469 (1988)); arroz (Toriyama *et al.*, *Theor Appl. Genet.* 205: 34 (1986); Part *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 32: 1135-1148, (1996); Abedinia *et al.*, *Aust. J. Plant Physiol.* 24: 133-141 (1997); Zhang y Wu, *Theor. Appl. Genet.* 76: 835 (1988); Zhang *et al.* *Plant Cell Rep.* 7: 379, (1988); Battraw y Hall, *Plant Sci.* 86: 191-202 (1992); Christou *et al.*, *Bio/Technology* 9: 957 (1991)); centeno (De la Pena *et al.*, *Nature* 325: 274 (1987)); caña de azúcar (Bower y Birch, *Plant J.* 2: 409 (1992)); festuca alta (Wang *et al.*, *Biol Technology* 10: 691 (1992)) y trigo (Vasil *et al.*, *Biol Technology* 10: 667 (1992); Patente de Estados Unidos N° 5.631.152).

Se han desarrollado ensayos para la expresión génica basados en la expresión transitoria de construcciones de ácidos nucleicos clonados mediante la introducción de las moléculas de ácido nucleico en las células vegetales por tratamiento con polietilenglicol, electroporación o bombardeo de partículas (Marcotte *et al.*, *Nature* 335: 454-457 (1988); Marcotte *et al.*, *Plant Cell* 1: 523-532 (1989); McCarty *et al.*, *Cell* 66: 895-905 (1991); Hattori *et al.*, *Genes Dev.* 6: 609-618 (1992); Goff *et al.*, *EMBO J.* 9: 2517-2522 (1990)).

Pueden usarse sistemas de expresión transitoria para diseccionar funcionalmente construcciones génicas (véase, en general, Maliga *et al.*, *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Press (1995)). Se entiende que cualquiera de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención puede introducirse en una célula vegetal de una forma permanente transitoria en combinación con otros elementos genéticos tales como vectores, promotores, potenciadores, etc.

Además de los procedimientos analizados anteriormente, los facultativos están familiarizados con los materiales de recurso convencionales que describen condiciones y procedimientos específicas para la construcción, manipulación y aislamiento de macromoléculas (por ejemplo, moléculas de ADN, plásmidos, etc.), la generación de organismos recombinantes y la detección y aislamiento de clones (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1989); Maliga *et al.*, Methods in Plant Molecular Biology, Cold Spring Harbor Press (1995); Birren *et al.*, Genome Analysis: Detecting Genes, 1, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988); Birren *et al.*, Genome Analysis: Analyzing DNA, 2, Cold Spring Harbor, Nueva York (1998), Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual, eds. Clark, Springer, Nueva York (1997)).

Los sustratos que pueden producirse por la célula hospedadora de forma natural o transgénicamente, así como las enzimas que pueden codificarse por secuencias de ADN presentes en el vector que se introduce posteriormente en la célula hospedadora, se muestran en la Figura 1.

Usos del gen de la $\Delta 4$ -desaturasa y de la enzima codificada por el mismo

Como se ha indicado anteriormente, los genes de desaturasa aislados y las enzimas desaturasa codificadas por los mismos tienen muchos usos. Por ejemplo, el gen y la enzima correspondiente pueden usarse indirectamente o directamente en la producción de ácidos grasos poliinsaturados, por ejemplo, la $\Delta 4$ -desaturasa puede usarse en la producción de ácido $\omega 6$ -docosapentaenoico o ácido docosahexaenoico. El término “directamente” pretende incluir la situación en la que la enzima convierte directamente el ácido en otro ácido, utilizándose este último en una composición (por ejemplo, la conversión de ácido adrenico en ácido $\omega 6$ -docosapentaenoico). La expresión “indirectamente” pretende incluir la situación en la que un ácido se convierte en otro ácido (es decir, una ruta intermedia) mediante la desaturasa (por ejemplo, ácido adrenico en ácido $\omega 6$ -docosapentaenoico) y después este último ácido se convierte en otro ácido mediante el uso de una desaturasa o enzima no desaturasa (por ejemplo, ácido $\omega 6$ -docosapentaenoico en ácido docosahexaenoico mediante una $\Delta 19$ -desaturasa). Además, la presente invención incluye situaciones “indirectas”, en las que el AGP se convierte primero en otro ácido graso poliinsaturado mediante una enzima que no es $\Delta 4$ -desaturasa (por ejemplo, una elongasa u otra desaturasa) y después se convierte en un producto final mediante una $\Delta 4$ -desaturasa. Por ejemplo, el ácido eicosapentaenoico puede convertirse en ácido $\omega 3$ -docosapentaenoico mediante una elongasa y después convertirse en ácido docosahexaenoico mediante una $\Delta 4$ -desaturasa. Estos ácidos grasos poliinsaturados (es decir, los producidos directa o indirectamente mediante la actividad de la enzima desaturasa) pueden añadirse a, por ejemplo, composiciones nutricionales, composiciones farmacéuticas, cosméticos y piensos animales, incluyéndose todos en la presente invención. Estos usos se describen con detalle a continuación.

Composiciones nutricionales

La presente invención incluye métodos para producir un ácido graso poliinsaturado que puede usarse en composiciones nutricionales. Dichas composiciones incluyen cualquier alimento o preparación para consumo humano, incluyendo para consumo enteral o parenteral, que cuando se suministra al cuerpo (a) sirve para nutrir o construir tejidos o suministrar energía y/o (b) conservar, restaurar o mantener un estado nutricional o una función metabólica adecuados.

La composición nutricional comprende al menos un aceite o ácido producido directa o indirectamente mediante el uso del gen de la desaturasa, de acuerdo con la presente invención, y puede estar en una forma sólida o líquida. Además, la composición puede incluir macronutrientes, vitaminas y minerales comestibles en cantidades deseadas para un uso particular. La cantidad de dichos ingredientes variará dependiendo de si la composición se desea para uso con lactantes o niños sanos normales o adultos que tienen necesidades especiales, tales como las que acompañan a determinadas afecciones metabólicas (por ejemplo trastornos metabólicos).

Los ejemplos de macronutrientes que pueden añadirse a la composición incluyen, pero sin limitación, grasas, hidratos de carbono y proteínas comestibles. Los ejemplos de dichas grasas comestibles incluyen, pero sin limitación, aceite de coco, aceite de borraja, aceite de hongos, aceite negro corriente, aceite de soja y monoglicéridos y diglicéridos. Los ejemplos de dichos hidratos de carbono incluyen, pero sin limitación, glucosa, lactosa comestible y almidón hidrolizado. Además, los ejemplos de proteínas que pueden utilizarse en la composición nutricional incluyen, pero sin limitación, proteínas de soja, suero electrodiálizado, leche desnatada electrodiálizada, suero de la leche o los hidrolizados de estas proteínas.

Con respecto a las vitaminas y minerales, pueden añadirse los siguientes a las composiciones nutricionales:

calcio, fósforo, potasio, sodio, cloro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, selenio, yodo y vitaminas A, E, D, C y el complejo B. También pueden añadirse otras vitaminas y minerales de este tipo. Los componentes utilizados en las composiciones nutricionales serán de origen semipurificado o purificado. Por semipurificado o purificados se entiende un material que se ha preparado por purificación de un material natural o por síntesis. Los ejemplos de composiciones nutricionales incluyen, pero sin limitación, fórmulas para lactantes, complementos dietéticos (por ejemplo, productos nutricionales para adultos y aceite), sustitutos dietéticos y composiciones de rehidratación. Las composiciones nutricionales de particular interés incluyen, pero sin limitación, las utilizadas para la suplementación enteral y parenteral en lactantes, fórmulas para lactantes especiales, suplementos para personas mayores y suplementos para los que tienen dificultades gastrointestinales y/o malabsorción.

ES 2 310 204 T3

La composición nutricional también puede añadirse al alimento aún cuando no sea necesaria la suplementación de la dieta. Por ejemplo, la composición puede añadirse a un alimento de cualquier tipo incluyendo, pero sin limitación, margarinas, mantequillas modificadas, quesos, leche, yogur, chocolate, caramelos, aperitivos, aceites para ensalada, aceites de cocina, grasas de cocina, carnes, pescado y bebidas.

En una realización preferida, la composición nutricional es un producto nutricional enteral, más preferiblemente, un producto nutricional enteral para adultos o pediátrico. Esta composición puede administrarse a adultos o niños que padezcan estrés o que tengan unas necesidades especiales debido a patologías crónicas o agudas. La composición puede comprender, además de ácidos grasos poliinsaturados producidos de acuerdo con la presente invención, macronutrientes, vitaminas y minerales, como se han descrito anteriormente. Los macronutrientes pueden estar presentes en cantidades equivalentes a las presentes en la leche humana o en una base energética, es decir, en base a calorías.

Se conocen bien en la técnica métodos para formular fórmulas nutricionales enterales y parenterales líquidas o sólidas (véanse también los Ejemplos a continuación).

La fórmula enteral, por ejemplo, puede esterilizarse y posteriormente utilizarse en una forma lista para usar (RTF) o conservarse en un líquido o polvo concentrado. El polvo puede prepararse mediante secado por pulverización de la fórmula preparada como se ha indicado anteriormente y reconstitución de la misma por rehidratación del concentrado. Se conocen bien en la técnica fórmulas nutricionales pediátricas y para adultos y están disponibles en el mercado (por ejemplo, Similac[®], Ensure[®], Jevity[®] y Alimentum[®] de Ross Products Division, Abbott Laboratories, Columbus, Ohio). Puede añadirse a cualquiera de estas fórmulas un aceite o ácido producido de acuerdo con la presente invención.

La densidad energética de las composiciones nutricionales, cuando están en forma líquida, puede variar de aproximadamente 0,6 Kcal a aproximadamente 3 Kcal por ml. Cuando están en forma sólida o en polvo, los complementos nutricionales pueden contener de aproximadamente 1,2 a más de 9 Kcal por gramo, preferiblemente de aproximadamente 3 a 7 Kcal por g. En general, la osmolaridad de un producto líquido debería ser inferior a 700 mOsm y, más preferiblemente, inferior a 660 mOsm.

La fórmula nutricional puede incluir macronutrientes, vitaminas y minerales, como se ha indicado anteriormente, además de los AGP producidos de acuerdo con la presente invención. La presencia de estos componentes adicionales ayuda al individuo a ingerir los requerimientos mínimos diarios de estos elementos. Además de suministrar AGP, también puede ser deseable añadir cinc, cobre, ácido fólico y antioxidantes a la composición. Se piensa que estas sustancias refuerzan un sistema inmune estresado y, por lo tanto, proporcionarán beneficios adicionales al individuo que recibe la composición. También puede suplementarse una composición farmacéutica con estos elementos.

En una realización más preferida, la composición nutricional comprende, además de los antioxidantes y de al menos un AGP, una fuente de hidratos de carbono en la que al menos el 5 por ciento en peso de los hidratos de carbono sean un oligosacárido no digestible. En una realización más preferida, la composición nutricional comprende además una proteína, taurina y carnitina.

Como se ha indicado anteriormente, los AGP producidos de acuerdo con la presente invención, o derivados de los mismos, pueden añadirse a un sustituto o complemento dietético, particularmente una fórmula para lactantes, para pacientes que están bajo alimentación intravenosa o para prevenir o tratar una malnutrición u otras afecciones o patologías. Como antecedentes, debería señalarse que la leche materna humana tiene un perfil de ácidos grasos que comprende de aproximadamente el 0,15% a aproximadamente el 0,36% como DHA, de aproximadamente el 0,03% a aproximadamente el 0,13% como EPA, de aproximadamente el 0,30% a aproximadamente el 0,88% como AA, de aproximadamente el 0,22% a aproximadamente el 0,67% como DGLA y de aproximadamente el 0,27% a aproximadamente el 1,04% como GLA. Por lo tanto, pueden usarse ácidos grasos tales como AA, EPA y/o ácido docosahexaenoico (DHA), producidos de acuerdo con la presente invención, para modificar, por ejemplo la composición de fórmulas para lactantes para reproducir mejor el contenido de AGP de la leche materna humana o para modificar la presencia de los AGP que normalmente se encuentran en una leche de mamíferos no humanos. En particular, una composición para usar en un complemento farmacéutico o alimenticio, particularmente un sustituto o suplemento de la leche materna, comprenderá preferiblemente uno o más de AA, DGLA y GLA. Mas preferiblemente, el aceite comprenderá de aproximadamente el 0,3 al 30% de AA, de aproximadamente el 0,2 al 30% de DGLA y/o de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 30% de GLA.

Se contemplan composiciones nutricionales parenterales que comprenden de aproximadamente el 2 a aproximadamente el 30 por ciento en peso de ácidos grasos calculados como triglicéridos. La composición preferida tiene de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 25 por ciento en peso de la composición de AGP total como GLA (Patente de Estados Unidos N° 5.196.198). Pueden incluirse opcionalmente otras vitaminas, particularmente vitaminas liposolubles tales como vitamina A, D, E y L-carnitina. Cuando se desee, puede añadirse un conservante tal como alfa-tocoferol en una cantidad de aproximadamente el 0,1% en peso.

Además, las proporciones de AA, DGLA y GLA pueden adaptarse para un uso final dado particular. Cuando se formula como un suplemento o sustituto de la leche materna, una composición que comprende uno o más de AA, DGLA y GLA se proporcionará en una proporción de aproximadamente 1:19:30 a aproximadamente 6:1:0,2, respectivamente. Por ejemplo, la leche materna de animales puede variar en proporciones de AA:DGLA:GLA que varían de 1:19:30 a 6:1:0,2 que incluye proporciones intermedias que son preferiblemente de aproximadamente 1:1:1,

1:2:1 y 1:1:4. Cuando se producen juntos en una célula hospedadora, puede usarse el ajuste del índice y del porcentaje de conversión de un sustrato precursor tal como GLA y DGLA en AA para controlar con precisión las proporciones de AGP. Por ejemplo, puede usarse un índice de conversión del 5% al 10% de DGLA en AA para producir una proporción de AA con respecto a DGLA de aproximadamente 1:19, mientras que puede usarse un índice de conversión de aproximadamente el 75% al 80% para producir una proporción de AA con respecto a DGLA de aproximadamente 6:1. Por lo tanto, ya sea en un sistema de cultivo celular o en un animal hospedador, la regulación del momento, grado y especificidad de la expresión de la desaturasa, así como de la expresión de otras desaturasas y elongasas, puede usarse para modular los niveles y proporciones de AGP. Después, los AGP producidos de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, AA y EPA) pueden combinarse con otros AGP/ácidos (por ejemplo, GLA) en las concentraciones y proporciones deseadas.

Además, los AGP producidos de acuerdo con la presente invención o las células hospedadoras que los contienen también pueden usarse como complementos alimenticios animales para modificar la composición de ácidos grasos en el tejido o la leche de un animal por una más deseable para consumo humano o animal.

Composiciones farmacéuticas

También se contempla una composición farmacéutica que comprende uno o más de los ácidos y/o aceites resultantes producidos usando los genes de desaturasa, de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Más específicamente, una composición farmacéutica de este tipo puede comprender uno o más de los ácidos y/o aceites, así como un vehículo, adyuvante o excipiente convencional bien conocido no tóxico y farmacéuticamente aceptable tal como, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, agua, etanol, polioles, aceites vegetales, un agente humectante o una emulsión, tal como una emulsión de agua en aceite. La composición puede estar en una forma líquida o sólida. Por ejemplo, la composición puede estar en la forma de un comprimido, cápsula, líquido o polvo ingerible, inyectable o pomada o crema tópica. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, cloruro sódico y similares. A parte de dichos diluyentes inertes, la composición también puede incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes y agentes perfumantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden comprender agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, sorbitol de polioxietileno y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto o mezclas de estas sustancias.

Pueden prepararse formas de dosificación sólidas, tales como comprimidos y cápsulas, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los AGP producidos de acuerdo con la presente invención pueden conformarse en comprimidos con bases para comprimidos convencionales tales como lactosa, sacarosa y almidón de maíz, en combinación con aglutinantes tales como goma arábiga, almidón de maíz o gelatina, agentes disgregantes tales como almidón de patata o ácido algínico y un lubricante tal como ácido esteárico o estearato de magnesio. Pueden prepararse cápsulas por incorporación de estos excipientes en una cápsula de gelatina junto con antioxidantes y el o los AGP pertinentes. El antioxidante y los componentes de AGP deberían ajustarse las directrices presentadas anteriormente.

Para la administración por vía intravenosa los AGP producidos de acuerdo con la presente invención o derivados de los mismos pueden incorporarse en formulaciones comerciales, tales como Intralipids™. El perfil típico de ácidos grasos en plasma de un adulto normal comprende del 6,64 al 9,46% de AA, del 1,45 al 3,11% de DGLA y del 0,02 al 0,08% de GLA. Estos AGP o sus precursores metabólicos pueden administrarse solos o en combinación con otros AGP para conseguir un perfil de ácidos grasos normal en un paciente. Cuando se desee, los componentes individuales de las formulaciones pueden proporcionarse de forma individual, en forma de kit, para un solo uso o usos múltiples. Una dosificación típica de un ácido graso en particular es de 0,1 mg a 20 g (hasta 100 g) diariamente y es preferiblemente de 10 mg a 1, 2, 5 ó 10 g diarios.

Las posibles vías de administración de las composiciones farmacéuticas incluyen, por ejemplo, vías enterales (por ejemplo, oral y rectal) y parenterales. Por ejemplo, una preparación líquida puede administrarse, por ejemplo, por vía oral o rectal. Además, una mezcla homogénea puede dispersarse completamente en agua, mezclarse en condiciones estériles con diluyentes, conservantes, tampones o propulsores fisiológicamente aceptables para formar una pulverización o un inhalador. Por supuesto, la vía de administración dependerá del efecto deseado. Por ejemplo, si la composición se está utilizando para tratar la piel áspera, seca o el envejecimiento, para tratar piel lesionada o quemada o para tratar piel o pelo afectados por una enfermedad o afección, quizá pueda aplicarse por vía tópica.

La dosificación de la composición que se va administrar al paciente puede determinarse por un especialista en la técnica y depende de diversos factores tales como el peso del paciente, la edad del paciente, el estado inmune del paciente, etc.

Con respecto a la forma, la composición puede ser, por ejemplo, una solución, una dispersión, una suspensión, una emulsión o un polvo estéril que después se reconstituye.

También se contempla el tratamiento de diversos trastornos mediante el uso de las composiciones farmacéuticas y/o nutricionales descritas en la presente memoria. En particular, las composiciones pueden usarse para tratar la reestenosis

ES 2 310 204 T3

después de una angioplastia. Además, también pueden tratarse con las composiciones síntomas de inflamación, artritis reumatoide, asma y psoriasis. Las pruebas también indican que los AGP pueden estar implicados en el metabolismo del calcio; por lo tanto, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse, quizá, en el tratamiento o la prevención de la osteoporosis y de piedras en el riñón o en el tracto urinario.

Además, las composiciones también pueden usarse en el tratamiento del cáncer. Se ha demostrado que las células malignas tienen composiciones de ácidos grasos alteradas. Se ha demostrado que la adición de ácidos grasos ralentiza su crecimiento, provoca muerte celular y aumenta su susceptibilidad a agentes quimioterápicos. Además, las composiciones también pueden ser útiles para el tratamiento de la caquexia asociada con el cáncer.

Las composiciones también pueden usarse para tratar la diabetes (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.826.877 y Horrobin *et al.*, Am. J. Clin. Nutr. Vol. 57 (Supl.) 732S-737S). Se ha demostrado un metabolismo y una composición de ácidos grasos alterada en animales diabéticos.

Además, las composiciones que comprenden AGP producidos directa o indirectamente mediante el uso de las enzimas desaturasas, también pueden usarse en el tratamiento de eccemas, en la reducción de la presión sanguínea y en la mejora de las puntuaciones en los exámenes de matemáticas. Además, las composiciones pueden usarse en la inhibición de la agregación plaquetaria, la inducción de la vasodilatación, la reducción de los niveles de colesterol, la inhibición de la proliferación de tejido fibroso y muscular liso de las paredes de los vasos (Brenner *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol. Vol. 83, págs. 85-101, 1976), la reducción o la prevención del sangrado gastrointestinal y otros efectos secundarios de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.666.701), la prevención o el tratamiento de la endometriosis y del síndrome premenstrual (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.758.592) y el tratamiento de la encefalomiелitis miálgica y de la fatiga crónica después de infecciones virales (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.116.871).

Los usos adicionales de las composiciones incluyen el uso en el tratamiento del SIDA, la esclerosis múltiple y los trastornos cutáneos inflamatorios, así como para el mantenimiento de la salud en general.

Además, la composición puede utilizarse con fines cosméticos. Puede añadirse a composiciones cosméticas preexistentes de tal modo que se forme una mezcla o puede usarse como una composición única.

Aplicaciones veterinarias

Debe señalarse que las composiciones farmacéuticas y nutricionales descritas anteriormente pueden utilizarse en relación con animales (es decir, domésticos o no domésticos) así como en seres humanos, puesto que los animales experimentan muchas de las mismas necesidades y afecciones que los seres humanos. Por ejemplo, el aceite o los ácidos producidos por los métodos de la presente invención pueden utilizarse en suplementos de piensos animales, sustitutos de piensos animales, vitaminas para animales o en pomadas tópicas para animales.

Ejemplo I

Diseño de oligonucleótidos degenerados para el aislamiento de desaturasas de *Thraustochytrium aureum* y construcción de una genoteca de ADNc

El análisis de la composición de ácidos grasos del hongo marino *Thraustochytrium aureum* (*T. aureum*) (ATCC 34304) se investigó para determinar los tipos y cantidades de ácidos grasos poliinsaturados (AGP). Este hongo tenía cantidades importantes de AGP de cadena larga, tales como ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) y ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3). Sin embargo, el *T. aureum* también producía AGP tales como ácido adrenico (ADA, 22:4n-6), ácido ω 6-docosapentaenoico (ω 6-DPA, 22:5n-6), ω 3-docosapentaenoico (ω 3-DPA, 22:5n-3), siendo la mayor cantidad de ácido graso el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) (véase la Figura 1). Por lo tanto, además de la Δ 6, Δ 5 y Δ 17-desaturasa, el *T. aureum* probablemente contiene una Δ 19-desaturasa que convierte el ADA en ω 3-DPA o el ω 6-DPA en DHA y/o una Δ 4-desaturasa que desatura el ADA en ω 6-DPA o el ω 3-DPA en DHA. Por lo tanto, el objetivo era intentar aislar los genes de desaturasa predichos de *T. aureum* y verificar la funcionalidad de las enzimas por expresión en un hospedador alternativo.

Para aislar genes que codifican enzimas desaturasas funcionales, se construye una genoteca de ADNc. Se cultivaron células de *T. aureum* (ATCC 34304) en medios BY+ (N° 790, Difco, Detroit, MI) a temperatura ambiente durante 4 días en presencia de luz y con agitación constante (250 rpm) para obtener la máxima biomasa. Estas células se recogieron por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos y se aclararon en agua helada sin ARNasa. Estas células se lisaron después en una prensa francesa a 10.000 psi y las células lisadas se recogieron directamente en fenol tamponado con TE. Se retiraron las proteínas del lisado celular mediante extracción repetida con fenol:cloroformo (1:1 v/v) seguida de una extracción con cloroformo. Los ácidos nucleicos de la fase acuosa se precipitaron a -70°C durante 30 minutos usando acetato de sodio 0,3 M (concentración final) (pH 5,6) y un volumen de isopropanol. Los ácidos nucleicos precipitados se recogieron por centrifugación a 15.000 rpm durante 30 minutos a 4°C, se secaron al vacío durante 5 minutos y después se trataron con ADNasa I (sin ARNasa) en tampón de ADNasa 1X (Tris-Cl 20 mM, pH 8,0, MgCl₂ 5 mM) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió con EDTA 5 mM (pH 8,0) y el ARN se purificó adicionalmente usando el Qiagen RNeasy Maxi kit (Qiagen, Valencia, CA) según el protocolo de fabricante.

ES 2 310 204 T3

Se aisló el ARN mensajero a partir del ARN total usando resina de oligo dT celulosa y se usó el kit de construcción de genotecas pBluescript II XR (Stratagene, La Jolla, CA) para sintetizar ADNc bicatenario que después se clonó direccionalmente (5' *EcoRI*/3' *XhoI*) en el vector pBluescript II SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA). La genoteca de *T. aureum* contenía aproximadamente 2,5 x 10⁶ clones, cada uno con un tamaño de inserto medio de aproximadamente 700 pb. Se aisló el ADN genómico de cultivos de *T. aureum* que producían AGP por trituración del cultivo en nitrógeno líquido y se purificó usando el Qiagen Genomic DNA Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA).

La estrategia que se adoptó consistía en diseñar oligonucleótidos (cebadores) degenerados que representan motivos aminoacídicos que están conservados en desaturasas conocidas. Estos cebadores podían usarse después en una reacción de PCR para identificar un fragmento que contenía las regiones conservadas en los genes de desaturasa predichos de hongos. Puesto que las únicas desaturasas fúngicas que se habían identificado eran los genes de la $\Delta 5$ y $\Delta 6$ -desaturasa de *Mortierella alpina* (números de acceso de Genbank AF067650, AB020032, respectivamente), se tuvieron en cuenta las secuencias de desaturasas de plantas así como de animales durante el diseño de estos cebadores degenerados. En particular, se usaron secuencias de $\Delta 5$ y $\Delta 6$ -desaturasas conocidas de los siguientes organismos para el diseño de estos cebadores degenerados: *Mortierella alpina*, *Borago officinalis*, *Helianthus annuus*, *Brassica napus*, *Dictyostelium discoideum*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* y *Ricinus communis*. Los cebadores degenerados usados fueron los siguientes, usando el programa CODE-HOP Blockmaker (<http://bloccas.fhcr.org/codehop.html>):

a. Motivo proteico 1: NH₃-VYDVTEWVVKRHPGG-COOH (SEC ID N°: 56)

Cebador RO 834 (SEC ID N°: 1):

5'GTBTAYGAYGTBACCGARTGGGTBAAGCGYCAYCCBGHGGH-3'

B. Motivo proteico 2: NH₃-GASANWWKHQHNVHH-COOH (SEC ID N°: 57)

Cebador RO835 (Directo) (SEC ID N°: 2):

5'-GGHGCYTCCGCYAACTGGTGAAGCAYCAGCAYAACGTBCAYCAY-3'

Cebador RO836 (Inverso) (SEC ID N°: 3):

5'-RTGRTGVACGTTTRTGCTGRTGCTTCCACCAGTTRGCGGARGCDCC-3'

C. Motivo proteico 3: NH₃-NYQIEHHLFPTM-COOH (SEC ID N°: 58)

Cebador RO838 (Inverso) (SEC ID N°: 4)

5'-TTGATRGCTARCTYGTGTRGASAARGGVGTGGTAC-3'

Además, se diseñaron dos cebadores más en base a la 2^a y 3^a "cajas de histidina" conservadas que se encuentran en las $\Delta 6$ -desaturasas conocidas. Estos eran:

Cebador RO753 (SEC ID N°: 5) 5'-CATCATCATXGGRAAXARRTGRTG-3'

Cebador RO754 (SEC ID N°: 6) 5'-CTACTACTACTACAYCAYACXTAY ACXAAAY-3'.

El código de degeneración para las secuencias oligonucleotídicas era: B = C, G, T; H = A, C, T; S = C, G; R = A, G; V = A, C, G; Y = C, T; D = A, T, C; X = A, C, G, T

Ejemplo II

Uso de oligonucleótidos degenerados para el aislamiento de una desaturasa de un hongo

Para aislar supuestos genes de desaturasa, se aisló el ARN total usando el método de cloruro de litio (Hoge *et al.*, (1982) Exp. Mycol. 6: 225-232). Se realizó una transcripción inversa de aproximadamente 5 μ g usando el sistema Superscript Preamplification (Life Technologies, Rockville, MD) para producir la primera cadena de ADNc. Se usaron las siguientes combinaciones de cebadores: RO834/836, RO834/838, RO835/836, RO835/838 y RO753/754 en varias reacciones de PCR con diferentes parámetros de termociclado y Taq polimerasa a temperaturas de hibridación inferiores a 60°C, pero no se produjeron bandas.

En intentos adicionales para aislar fragmentos de desaturasas, se usaron los cebadores degenerados RO834/838 (diseñados con el programa Blockmaker) y RO753/754 en una reacción de 50 μ l. Se combinaron los siguientes componentes: 2 μ l del molde de la primera cadena de ADNc, Tris-HCl 20 mM a pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 200 μ M de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 0,2 pmoles de concentración final de cada cebador y ADNc polimerasa

ES 2 310 204 T3

(Clontech, Palo Alto, CA). El termociclado se llevó a cabo de la forma siguiente: una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos seguida de 35 ciclos de; desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 60°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. Esto se siguió de una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Se detectaron dos bandas débiles de aproximadamente 1000 pb para los cebadores RO834/838, mientras que se descubrió una banda ligeramente más pequeña pero más intensa de 800-900 pb con la pareja de cebadores RO753/754. Las reacciones se separaron en un gel de agarosa al 1%, se escindieron y se purificaron con el QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). Los extremos escalonados de estos fragmentos se "rellenaron" usando una ADN polimerasa T4 (Life Technologies, Rockville, MD), según las especificaciones del fabricante, y estos fragmentos de ADN se clonaron en el vector PCR-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los plásmidos recombinantes se usaron para transformar células supercompetentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y los clones se secuenciaron parcialmente.

Posteriormente, se descubrió que las secuencias del clon 30-3 (reacción con RO834/838) y del clon 17-1 (reacción con RO753/754) se solapaban para generar un fragmento de 1313 pb. El fragmento se tradujo y se usó Tfasta para hacer una búsqueda en la base de datos de GenBank. Las mayores coincidencias eran la Δ 5-desaturasa de *Mortierella alpina* (Nº de Acceso de GenBank AF067654) (homología del 27% en 202 aminoácidos), Δ 6-desaturasa de *Spirulina platensis* (número de acceso de GenBank X87094) (homología del 30% en 121 aminoácidos), Δ 5-desaturasa de *Dictyostelium discoideum* (número de acceso de GenBank AB02931) (homología del 26% en 131 aminoácidos) y Δ 6-desaturasa de *M. alpina* (número de acceso AF110510) (homología del 30% en 86 aminoácidos). Puesto que existía un grado razonable de homología de aminoácidos con desaturasas conocidas, se buscó un gen de longitud completa que codificara una desaturasa potencial para determinar su actividad cuando se expresaba en levaduras.

Ejemplo III

Aislamiento de la secuencia génica de longitud completa de *T. aureum* (ATCC 34304)

Para encontrar el gen de longitud completa se llevaron a cabo dos reacciones de PCR separadas, en un intento por determinar los dos extremos de una supuesta desaturasa de la genoteca de ADNc. Para el extremo 3' del gen, se usó RO898 (SEC ID Nº: 7) (5'-CCCAGTCAC-GACGTTGTAACGACGGCCAG-3') (diseñado en base a la secuencia del vector pBluescript SK(+)) (Stratagene, La Jolla, CA) en una reacción de amplificación por PCR junto con un cebador específico de gen RO930 (SEC ID Nº: 8) (5'-GACGATTAACAAGGTGATTTCCCAGGATGTC). En este caso, se usó el kit Advantage-GC cDNA PCR (Clontech, Palo Alto, CA) para superar los problemas de la amplificación por PCR que aparecían con secuencias ricas en GC (61% para el fragmento de 1313 pb). Las condiciones de termociclado de la PCR fueron las siguientes: el molde se desnaturalizó inicialmente a 94°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de [94°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto] y, por último, un ciclo de extensión a 72°C durante 7 minutos con 20 pmoles de cada cebador. Los productos de PCR obtenidos de este modo se resolvieron en un gel de agarosa al 1%, se escindieron y se purificaron en gel usando el Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). Los extremos escalonados en el fragmento se "rellenaron" usando una ADN polimerasa T4 (Life Technologies, Rockville, MD) según las especificaciones del fabricante y se clonaron en el vector PCR-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA), como se describe en el Ejemplo II. La secuencia del clon 93-3 se solapaba con el fragmento de 1313 pb original y se descubrió que contenía una fase de lectura abierta, un codón de terminación y una cola poli A que indicaba que éste era el extremo 3' del gen. Se diseñaron dos cebadores en base a la secuencia del clon 93-3 cerca de codón de terminación con un sitio generado para *XhoI* (subrayado), de la forma siguiente: RO973 (SEC ID Nº: 9) (5'-GACTAACTCGAGTCACGT-GGACCAGGCCGTGAGGTCCT-3') y RO974 (SEC ID Nº: 10) (5'-GACTAACTCGAGTTGACGAGGTTTGTAT GTTCGGCGGTTTGCTTG-3'). Se seleccionaron de forma deliberada dos cebadores porque RO973, que contenía el codón de terminación, era rico en GC (60%) y podía no amplificar bien. Por otro lado, RO974, cadena abajo del codón de terminación, tenía un contenido mucho menor de GC (48%).

Siguiendo el mismo protocolo que se ha descrito anteriormente para aislar el extremo 5' del gen, se usaron RO899 (SEC ID Nº: 11) (5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC-3') (diseñado en base a la secuencia del vector pBluescript SK(+)) y el oligonucleótido específico de gen RO1004 (SEC ID Nº: 12) (5'-TGGCTACCGTCGTGCTG GATGCAAGTTCCG-3') para la amplificación de la genoteca de ADNc. La amplificación se llevó a cabo usando 10 pmoles de cada cebador y el kit de ADNc polimerasa (Clontech, Palo Alto, CA). Las condiciones de reacción incluían una desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, seguida de 30 ciclos de [94°C durante 30 segundos, 68°C durante 3 minutos] y, por último, un ciclo de extensión a 68°C durante 5 minutos. Los productos de PCR obtenidos de este modo se clonaron en el vector PCR-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el mismo protocolo que se ha descrito anteriormente. Los plásmidos recombinantes se usaron para transformar células supercompetentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se secuenciaron los clones. El clon 1004-5 contenía una fase de lectura abierta, varios codones de inicio y se solapaba con la secuencia de 1313 pb original indicando que éste era el extremo 5' del gen.

Para aislar el gen de longitud completa, se diseñó un cebador para el extremo 5' de la supuesta desaturasa con un sitio EcoRI generado (subrayado), de la forma siguiente: RO1046 (SEC ID Nº: 13) (5'-CGCATGGAATTCATGACGGT CGGGTTTGACGAAACGGTG-3').

Para aislar un clon de longitud completa, se usaron tanto RO1046/973 como RO1046/974 con ADNc aislado a partir de la genoteca y del ADN genómico como diana. Se usaron tanto una ADNc polimerasa (Clontech, Palo Alto, CA) como una -GC Advantage Polymerase (Clontech, Palo Alto, CA) para amplificar sus respectivas dianas con 10 pmol de cebador, con las siguientes condiciones de reacción: una desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto,

ES 2 310 204 T3

seguida de 30 ciclos de [94°C durante 30 segundos, 68°C durante 3 minutos] y, por último, un ciclo de extensión a 68°C durante 5 minutos. Las reacciones se purificaron en gel, se cortaron con *EcoRI/XhoI* y se clonaron en un vector de expresión de levaduras pYX242 preparado con *EcoRI/XhoI* (Invitrogen, Carlsbad, CA) que se había tratado con fosfatasa alcalina de camarón (Roche, Indianápolis, IN) para evitar la recircularización. El análisis inicial de las secuencias de longitud completa demostró varios cambios de bases. Los clones 112-3 y 112-5 (denominados pRTA7 y 8, respectivamente) se obtuvieron de la amplificación con ADN genómico y polimerasa -GC Advantage usando los cebadores RO1046/974. El clon 110-3 (denominado pRTA5) se obtuvo a partir de una reacción con RO1046/973, diana de ADN genómico y ADNc polimerasa. El clon 111-1 (denominado pRTA6) se aisló a partir de la reacción que usaba RO1046/974, diana de ADNc y kit de polimerasa -GC Advantage. La secuencia de estos cuatro plásmidos, pRTA5 (SEC ID N°: 14), pRTA6 (SEC ID N°: 15), pRTA7 (SEC ID N°: 16) y pRTA8 (SEC ID N°: 17) se muestra en las Figuras 3-6, respectivamente. (Los plásmidos pRTA7 y pRTA8 se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 el 19 de abril de 2001 y se acordaron los números de acceso PTA-3301 y PTA-3300, respectivamente). Esta supuesta desaturasa de 1548 pb y 515 aminoácidos (véanse las Figuras 7-10 y las SEC ID N°: 18, 19, 20 y 21, respectivamente) tenía muchas de las características de las desaturasas descritas. Los aminoácidos que se corresponden con el extremo 5' de la enzima son homólogos al citocromo b5. También existen varias cajas de histidina en los siguientes aminoácidos: 178-183-(Q)HDGSH (SEC ID N°: 59); 213-219-(Q)HVLGHH (SEC ID N°: 60); 262-265-HPWH (SEC ID N°: 61), 271-275-HKFQH (SEC ID N°: 62); y 452-475(H)QIEHH (SEC ID N°: 63). Al menos una H o una Q precede a tres de estas cajas de histidina, algo que es poco habitual. El *Dictyostelium discoideum* (número de acceso de GenBank AB029311) tiene dos cajas similares [(Q)HVIGHH (SEC ID N°: 64) y (H)QVVHH] (SEC ID N°: 65), mientras que *M. alpina* (número de acceso de GenBank AF067654) tiene (Q)HMLGHH (SEC ID N°: 66) y *Synechocystis* sp. sólo tiene una (H)QVTHH (SEC ID N°: 67). Las secuencias de las diversas supuestas desaturasas diferían entre sí. Varios de estos cambios de bases dieron como resultado un cambio de aminoácido, como se muestra en la Tabla 1. Estas diferencias podían ser variantes de origen natural, introducirse por un emparejamiento erróneo en la PCR durante la amplificación final o un error en la PCR cuando se producía el ADNc inicial. Hay siete cambios aminoacídicos individuales entre los cuatro plásmidos, ninguno de ellos compartido (véase la Figura 2A y B, aminoácidos subrayados y en negrita). Estas diferencias podían alterar la actividad de la enzima codificada.

TABLA 1

Diferencias de aminoácidos en clones diferentes				
Número de aminoácido	PRTA5	PRTA6	PRTA7	PRTA8
99	F	S	F	F
280	F	F	L	F
284	F	F	F	S
317	Y	Y	N	Y
332	T	M	M	M
410	T	T	T	A
513	R	W	W	W

Ejemplo IV

Expresión de plásmidos que contienen supuestas desaturasas en levaduras

Los cuatro plásmidos se usaron para transformar *Saccharomyces cerevisiae* de cepa 334 competentes. La transformación de levaduras se llevó a cabo usando el Alkali-Cation Yeast Transformation Kit (BIO 101, Vista, CA), de acuerdo con las condiciones especificadas por el fabricante. Se seleccionaron transformantes por auxotrofia para leucina en medios que carecían de leucina (DOB [-Leu]). Para detectar la actividad desaturasa específica de estos clones, los transformantes se cultivaron en presencia de 50 μ M de sustratos de ácidos grasos específicos, como se enumeran a continuación:

a. Ácido linoleico (18:2n-6) (la conversión en ácido alfa-linolénico indicaría actividad Δ 15-desaturasa y la conversión en ácido gamma-linolénico indicaría actividad Δ 6-desaturasa).

b. Ácido alfa-linolénico (18:3n-3) (la conversión en ácido estearidónico indicaría actividad Δ 6-desaturasa).

ES 2 310 204 T3

c. Ácido araquidónico (20:4n-6) (la conversión en ácido eicosapentaenoico indicaría actividad $\Delta 17$ -desaturasa).

d. Ácido adrénico (22:4n-6) (la conversión en ácido $\omega 3$ -docosapentaenoico indicaría actividad $\Delta 19$ o la conversión en ácido $\omega 6$ -docosapentaenoico indicaría actividad $\Delta 4$ -desaturasa).

e. Ácido $\omega 3$ -docosapentaenoico (22:5n-3) (la conversión en docosahexaenoico indicaría actividad $\Delta 4$ -desaturasa).

La cepa de control negativo era *S. cerevisiae* 334 que contenía el vector pYX242 no modificado, y éstas se cultivaron simultáneamente.

Los cultivos se agitaron vigorosamente (250 rpm) y se cultivaron durante 48 horas a 24°C en presencia de 50 μ M (concentración final) de los diversos sustratos en 50 ml de medios que carecían de leucina, después de la inoculación con cultivo de una noche de colonias individuales en caldo de extracto de levadura peptona dextrosa (YPD) a 30°C. Las células se sedimentaron y los sedimentos se agitaron vorticialmente en metanol; se añadió cloroformo junto con tritidecanoína (como un patrón interno). Estas mezclas se incubaron durante al menos una hora a temperatura ambiente o a 4°C durante una noche. La fase de cloroformo se extrajo y se filtró a través de un filtro Whatman con 1 g de sulfato de sodio anhidro para eliminar particulados y agua residual. Los disolventes orgánicos se evaporaron a 40°C bajo una corriente de nitrógeno. Después, los lípidos extraídos se derivatizaron a ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) para el análisis mediante cromatografía de gases (GC) por adición de 2 ml de hidróxido de potasio 0,5 N en metanol a un tubo cerrado. Las muestras se calentaron a 95°C-100°C durante 30 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente. Se añadieron aproximadamente 2 ml de trifluoruro de boro al 14% en metanol y se repitió el calentamiento. Después de enfriarse la mezcla de lípidos extraída, se añadieron 2 ml de agua y 1 ml de hexano para extraer los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) para el análisis por GC. Se calculó el porcentaje de conversión dividiendo el producto producido por la suma de (el producto producido + el sustrato añadido) y, después, multiplicando por 100.

Los resultados demostraron una conversión de ω -3DPA en DHA y de ADA en $\omega 6$ -DPA. Esto indicaría actividad $\Delta 4$ -desaturasa (véase la Tabla 2).

TABLA 2

Porcentaje de conversión de diferentes concentraciones de sustrato en producto						
Clon	22:4n-6 25 μM	22:4n-6 50 μM	22:4n-6 100 μM	22:5n-3 25 μM	22:5n-3 50 μM	22:5n-3 100 μM
PYX242 (control)	0	0	0	0	0	1,28
PRTA5	3,91	0,9	1,24	10	6,89	3,1
PRTA6	4,69	2,77	1,18	14,26	8,52	4,98
PRTA7	10,97	6,11	3,14	36,34	17,52	9,92
PRTA8	5,55	2,43	0,92	19,44	8,52	4,33
22:4n-6 en 22:5n-6 (ácido adrénico en ácido $\omega 6$ -docosapentaenoico)						
22:5n-3 en 22:6n-3 (ácido $\omega 3$ -docosapentaenoico en ácido docosahexaenoico)						

En particular, ésta es la primera demostración de un gen de $\Delta 4$ -desaturasa con datos de expresión *in vivo*. La conversión para los cuatro clones variaba del 3,91% al 10,97% para la producción de $\omega 6$ -DPA a partir de ADA y del 10% al 36,34% para la producción de DHA a partir de ω -3DPA. La enzima parecía ser mucho más activa en la producción de DHA que en la de $\omega 6$ -DPA como indicaba el porcentaje de conversión reducido, del 36,34% frente al 10,97%, respectivamente, para 25 μ M de sustrato para el clon pRTA7. A una concentración de 100 μ M de cualquier sustrato, el porcentaje de conversión (véase la Tabla 2), así como la cantidad de producto producido (no se muestran los datos) disminuían, indicando que puede existir una inhibición por retroalimentación de la etapa de desaturación por el sustrato. La cantidad de $\omega 3$ -DPA (22:5n-3) incorporado (como un porcentaje del lípido total) es similar para los cuatro plásmidos (véase la Tabla 3, a continuación). Sin embargo, la cantidad producida como un porcentaje del total varía desde el 2,74 (PRTA5) hasta el 8,11% (PRTA7). La diferencia en los índices de conversión y en le porcentaje producido podían deberse a la diferencia en la secuencia, por lo tanto, a la variación de aminoácidos de la enzima codificada en los cuatro plásmidos.

TABLA 3

Ácido graso como porcentaje de lípido total extraído de levadura				
Clon	22:4(n-6) Incorporado	22:5(n-3) Producido	22:5(n-6) Incorporado	22:6(n-3) Producido
PYX242 (control)	38,96	0	11,2	0
PRTA5	14,5	0,59	19,8	2,74
PRTA6	16,07	0,79	17,97	4,38
PRTA7	39,88	4,91	14,21	8,11
PRTA8	36,94	2,17	17,45	4,25

No se muestran los datos para 25 μ M de sustrato.

Clave:

22:4(n-6) = Ácido adrenico

22:5(n-3) = Ácido ω 3-docosapentaenoico

22:5(n-6) = Ácido ω 6-docosapentaenoico

22:6(n-3) = Ácido docosahexaenoico

Estos datos muestran de forma inequívoca que estos plásmidos codifican de hecho una Δ 4-desaturasa, que tiene una actividad preferida en la conversión de ω 3-DPA en DHA por encima de la conversión de ADA en ω 6-DPA.

Ejemplo V

Expresión de Δ 4-desaturasa con la elongasa de ratón en levadura

Los plásmidos pRTA7 y pRTA8 (que tenían los dos porcentajes de conversión más elevados) pueden cotransformarse de forma individual con pRMEL04, un clon que contiene un gen de elongasa de ratón de pRAE-84 (véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos de N° de Serie 09/624.670, incorporada en la presente memoria en su totalidad como referencia). La elongasa de ratón de 879 pares de bases (véase la Figura 11 (SEC ID N°: 22) y la Figura 12 (SEC ID N°: 23)) puede clonarse como un fragmento de EcoRI/SalI en el vector de expresión de levaduras pYES2 (Invitrogen, Carlsbad, CA) en los sitios EcoRI/XhoI. Esta elongasa de 292 aminoácidos cataliza varias de las etapas de elongación en la ruta de AGP, en concreto, de AA a ADA y de EPA a ω 3-DPA. El ADA y el ω 3-DPA son sustratos para la Δ 4-desaturasa. Pueden seleccionarse transformantes de levaduras sobre medios mínimos que carecen de leucina y uracilo (DOB [-Leu-Ura]) para la selección de Δ 4-desaturasa (pRTA7 o pRTA8) y pRMEL04 (elongasa de ratón). El cultivo y la expresión del cultivo de levaduras que contiene pRMEL04 y pRTA7 o pRTA8 en medios mínimos que carecen de uracilo y leucina y con galactosa al 2% puede dar como resultado la elongación del AA añadido exógenamente a ADA y la Δ 4-desaturación en ω 6-DPA. Además, la suplementación de EPA en el medio mínimo de levaduras puede dar como resultado la elongación en ω 3-DPA por la elongasa que, después, puede desaturarse por la Δ 4-desaturasa para producir DHA, como se muestra en la Figura 1. Esto se ha demostrado anteriormente con elongasas y otras desaturasa para producir AA y EPA (véase la solicitud PCT WO 00/12720) y proporciona datos experimentales paralelos para demostrar que la elongación de un sustrato y la posterior desaturación pueden tener lugar *in vivo* en un organismo tal como una levadura y, potencialmente, en otros organismos. Además, los presentes datos demuestran la capacidad de la Δ 4-desaturasa para trabajar con otra enzima en la ruta biosintética de los AGP para producir ω 6-DPA o DHA a partir de los precursores AA y EPA, respectivamente.

ES 2 310 204 T3

Ejemplo VI

Homólogo de $\Delta 4$ -desaturasa de Schizochytrium aggregatum (ATCC 28209)

5 En paralelo al Ejemplo II, se aisló ARN mediante el método de fenol ácido de *Schizochytrium aggregatum* (*S. aggregatum*) ATCC 28209. En resumen, se lavaron sedimentos de *S. aggregatum* con agua desionizada fría y se volvieron a sedimentar durante 5 minutos a 3000 rpm. Se usaron aproximadamente 10 ml de solución de TES (Tris-Cl 10 mM a pH 7,5, EDTA 10 mM y SDS al 0,5%) para resuspender el sedimento. Después, se añadieron 10 ml de fenol ácido y se siguió con la incubación durante una hora a 65°C. El sedimento se colocó en hielo durante 5 minutos, se centrifugó durante 5 minutos a 1000 x g a 4°C y la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo. Se añadieron 10 ml adicionales de fenol ácido a la fase acuosa, la mezcla se agitó vorticialmente y se separó como anteriormente. La fase acuosa que contenía los ácidos nucleicos se transfirió a un nuevo tubo. Se añadió aproximadamente 1 ml de acetato de sodio a pH 5,3 y 25 ml de etanol helado para una precipitación durante una noche a -70°C. Al día siguiente, los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C y el sobrenadante se decantó. El sedimento se lavó con 10 ml de etanol al 70% y se centrifugó como en la etapa anterior. El sedimento se secó y se resuspendió en 500 μ l de agua desionizada sin ARNasa. El ARN se purificó adicionalmente usando el Qiagen RNeasy Maxikit (Qiagen, Valencia, CA), según el protocolo del fabricante.

20 Se generó el ADNc usando oligo dT con el sistema SuperScript Preamplification (Life Technologies, Rockville, MD) con 5 μ g de ARN de *S. aggregatum*. Puesto que el *S. aggregatum* produce grandes cantidades de DHA, se requeriría una $\Delta 4$ -desaturasa para la producción de DHA. En un experimento idéntico, se usaron los cebadores RO753 (SEC ID N°: 5) y RO754 (SEC ID N°: 6) en la misma reacción que en el Ejemplo II para producir una banda de aproximadamente 800 pares de bases. Como anteriormente, el ADN generado a partir de la reacción de PCR se separó en un gel al 1%, se escindió, se purificó y se clonó en el vector PCR-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA). La secuencia de ADN generada a partir de los clones saa9 y saa5 se solapaba para generar la secuencia saa.con (SEC ID N°: 24 y Figura 13). La traducción de la fase de lectura abierta de la secuencia de ADN de saa.con en una secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 25 y Figura 14) alineada con pRTA7 se muestra en la Figura 15. La secuencia de aminoácidos de la $\Delta 4$ -desaturasa del clon pRTA7 tenía una identidad del 79,1% con la secuencia traducida de saa.con a lo largo de 249 aminoácidos. Esta secuencia, debido a su elevada identidad con una $\Delta 4$ -desaturasa conocida, es muy probablemente un fragmento de una $\Delta 4$ -desaturasa de *S. aggregatum*. Este ejemplo proporciona pruebas de que este procedimiento puede usarse para aislar $\Delta 4$ -desaturasas de otros organismos.

Ejemplo VII

Aislamiento de secuencias de nucleótidos de la $\Delta 4$ -desaturasa de Schizochytrium aggregatum (ATCC 28209) y Thraustochytrium aureum (BICC 7091)

Para aislar los extremos 5' y 3' se diseñaron nuevos cebadores basados en la secuencia interna del fragmento de *S. aggregatum* aislado que se muestra en el Ejemplo VI. Para el extremo 5 prima del gen, se usó RO1240 (SEC ID N°: 26) (5'-CCC TCG ATG ATG TGG TTG ACG ATG AAC-3') y posteriormente el cebador anidado 5 prima RO1239 (SEC ID N°: 27) (5'-CGG AGC ATG GGG TAG GTG CTG AAG AC-3'). Para el extremo 3 prima, se usó RO1236 (SEC ID N°: 28) (5'-CCA ACT GCC GTT ACG CCA GCA AGT-3') seguido del cebador anidado 3 prima RO1237 (SEC ID N°: 29) (5'-CAA GCT CTT CTT CAT CGC CCA CTT TTC G-3'), para una segunda reacción para aislar el otro extremo del gen. Se usó ADNc listo para RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc) como una diana para las reacciones. Para preparar este material, se usaron aproximadamente 5 μ g del ARN total, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con el kit GeneRacer™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y la enzima Superscript II™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) para la transcripción inversa para producir ADNc diana. Para la amplificación inicial de los extremos, se usó el siguiente protocolo de termociclado en un Perkin Elmer 9600: fusión inicial a 94°C durante 2 minutos seguida de 5 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos, 10 ciclos de 94°C 30 segundos, 70°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos y 20 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos, seguidos de una extensión de 72°C durante 10 minutos. La primera reacción de PCR se realizó con 10 pmol de RO1240 y 30 pmol de cebador 5 prima de GeneRacer™ (SEC ID N°: 30) (5'-CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA-3') o RO1236 y cebador 3 prima de GeneRacer™ (SEC ID N°: 31) (5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G-3'). La reacción contenía 1 μ l de ADNc en un volumen final de 50 μ l con Platimun Taq™ PCRx (Clonetech, Palo Alto, CA) usando MgSO₄ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó una reacción anidada con 1 μ l de la reacción inicial, 10 pmol de cebador anidado RO1239 y 30 pmol del cebador 5 prima anidado de GeneRacer™ (SEC ID N°: 32) (5'-GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA-3') o cebador 3 prima anidado de GeneRacer™ (SEC ID N°: 33) (5'-CGC TAC GTA ACG GCA TGA CAG TG-3') y cebador anidado RO1237, usando las mismas condiciones que en la primera reacción. El análisis en gel de agarosa de los productos de PCR mostraba una banda de aproximadamente 800 pares de bases para la reacción 5 prima y de aproximadamente 600 pares de bases para la reacción 3 prima. La posterior clonación en pCR Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA), la transformación en células competentes Top10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y la secuenciación reveló una fase de lectura abierta con tanto un codón de inicio como de terminación. Se usaron los cebadores RO1241 (SEC ID N°: 34) (5'-GAT ATC GAA TTC ATG ACG GTG GGC GGC GAT GAG G-3') y RO1242 (SEC ID N°: 35) (5'-GTA CTT AAG CTT TCA CTT GGA CTT GGG GTG GTC C-3') con sitios de restricción añadidos para la clonación (véanse los sitios EcoRI y HindIII subrayados, respectivamente) para aislar un gen de longitud completa. Como se ha mostrado anteriormente, se usaron 10 pmol de los cebadores RO1241 y 1242 con Platimun Taq™ PCRx (Clonetech, Palo Alto, CA) usando MgSO₄, de acuerdo con el protocolo del fabricante, con 2 μ l del ADNc como diana. Los

ES 2 310 204 T3

parámetros de termociclado fueron los siguientes: fusión inicial a 94°C durante 2 minutos seguida de 5 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos, 5 ciclos de 94°C 30 segundos, 70°C durante 2 minutos y 20 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos, seguidos de una extensión de 68°C durante 10 minutos. El gran producto de la reacción se purificó en gel usando el kit de purificación en gel de QiaQuick (Qiagen, Valencia, CA), se cortó con EcoRI y HindIII y se ligó con ADN linealizado con EcoRI/HindIII de pYX242 con el kit de ligación Rapid (Roche, Indianápolis, IN), y se denominó pRSA-1. El clon pRSA-1 contenía un gen de longitud completa de 1530 pb (SEC ID N°: 36, Figura 16) y una fase de lectura abierta de 509 aminoácidos (SEC ID N°: 37, Figura 17). (El plásmido pRSA-1 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 el 27 de marzo de 2002, y se acordó el número de acceso PTA-4186).

La segunda $\Delta 4$ -desaturasa se identificó mediante una secuencia parcial aislada usando la combinación de cebadores de RO1201 (SEC ID N°: 38) (5'-CGT GTT CGC TGC CTT TGT CGG AAC TTG CAT CC-3') y RO1202 (SEC ID N°: 39) (5'-TTG ACA ATA AAC ATG GAG GCG AGG ACC TCT CCG-3') basados en la secuencia de pRTA7 (SEC ID N°: 16), como se describe en el Ejemplo III. El ADN genómico (ADNg) se preparó como se describe en el Ejemplo I, a partir de *Thraustochytrium aureum* (BICC 7091) (Biocon India Ltd., Bangalore, India). Se llevó a cabo una amplificación por PCR en un volumen de 100 μ l que contenía: 5 μ l de ADNg de T7091 aislado, 1,0 U de ADNc polimerasa (Clontech, Palo Alto, CA) y 10 pmol de cebadores de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las condiciones de termociclado en Perkin Elmer 9600 fueron las siguientes: 94°C durante 3 min, después 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 1 min. La PCR se siguió de una extensión adicional a 72°C durante 7 minutos. Se purificó en gel un fragmento de 600 pb, se rellenaron los extremos usando un ADN polimerasa T4 (Life Technologies, Rockville, MD), se clonó en el vector pCR-Blunt (Invitrogen, Co., Carlsbad, CA) y los plásmidos recombinantes se usaron para transformar células supercompetentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La secuenciación de los clones reveló una elevada homología con pRTA7 (del 82,1% en 196 aminoácidos).

Para el aislamiento de un gen de longitud completa se generó una genoteca de ADNc con ARNm aislado a partir de ARN total usando una resina de oligo dT celulosa. Después se usó el kit de construcción de genotecas pBluescript II XR (Stratagene, La Jolla, CA) para sintetizar ADNc bicatenario que después se clonó direccionalmente (5'*NotI*/3'*EcoRI*) en el vector pBluescript II KS(+). La genoteca de *T. aureum* (BICC 7091) contenía aproximadamente 1,89 x 10⁸ clones, cada uno con un tamaño de inserto medio de aproximadamente 1300 pb.

Se diseñaron los cebadores RO1210 (SEC ID N°: 40) (5'-GCT GGT TGG ACT TTG GAC ATG ATT GGA TCC-3') y RO1211 (SEC ID N°: 41) (5'-TAC ATT GGC AGG CCA ACC ATG TAG AGA ACG-3') para amplificar las secuencias 5' y 3', respectivamente. Se prepararon RO1210/RO899 (SEC ID N°: 11) y RO1211/RO898 (SEC ID N°: 7) con ADNc polimerasa (Clontech, Palo Alto, CA), 5 μ l de ADNc de la genoteca en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente en este ejemplo para el aislamiento del fragmento original. Después de la clonación y de la secuenciación de los fragmentos, se usó un cebador interno adicional RO1214 (SEC ID N°: 42) (5'-GGA TTC AAT CAT GTC CAA AGT CCA ACC AGC-3') con RO898 a partir del vector para identificar el extremo 5' del gen. En una reacción de 50 μ l, se usaron 10 pmoles de cada cebador con 5 μ l de ADN de genoteca como diana con Platinum TaqTM PCRx (Clontech, Palo Alto, CA) con MgSO₄, de acuerdo con el protocolo del fabricante. El protocolo de ciclado fue el siguiente: una fusión inicial de 94°C durante 5 minutos seguida de 35 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 55°C durante 30 segundos, 68°C durante 2 minutos y un ciclo de extensión de 72°C durante 7 minutos.

Se aisló la $\Delta 4$ -desaturasa de longitud completa de *T. aureum* (BICC 7091) con el cebador 5' RO1223 (SEC ID N°: 43) (5'-TCT GAT GAA TTC ATG ACG GCC GGA TTT GAA GAA G-3') y el cebador 3' RO 1224 (SEC ID N°: 44) (5'-GTC TAG CTC GAG TTA GTT CTT GTC CCA GGC AGG CA-3') con sitios de restricción añadidos para EcoRI y XhoI (subrayados), respectivamente, añadidos con el fin de la clonación. En una reacción de 50 μ l, se usaron 10 pmoles de cada cebador, con 5 μ l de ADN de genoteca como diana con Platinum TaqTM PCRx (Clontech, Palo Alto, CA) con MgSO₄, de acuerdo con el protocolo del fabricante. El protocolo de ciclado fue el siguiente: una fusión inicial de 94°C durante 5 minutos seguida de 35 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 55°C durante 30 segundos, 68°C durante 2 minutos y un ciclo de extensión de 72°C durante 7 minutos. La banda sencilla se separó en un gel de agarosa, se purificó, se cortó con EcoRI y XhoI y se ligó en pYX242 linealizado con las mismas enzimas. El análisis de secuencia del clon de longitud completa denominado pRTA11 (véase la Figura 18) (SEC ID N°: 45) reveló una fase de lectura abierta de 1542 pares de bases que codificaba una proteína de 513 aminoácidos (véase la Figura 19) (SEC ID N°: 46). (El plásmido pRTA11 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 el 27 de marzo de 2002, y se acordó el número de acceso PTA-4187).

Ejemplo VIII

Expresión de supuestas $\Delta 4$ -desaturasas de pRSA1 y pRTA11 en levaduras

Ambos plásmidos se transformaron en la cepa 334 de *Saccharomyces cerevisiae* competente y se cultivaron como se ha descrito en el Ejemplo IV con 50 μ M de ADA o de $\omega 3$ -DPA. Como se muestra en la Tabla 4, se produjo tanto $\omega 6$ -DPA como DHA cuando la cepa 334 (pSAR1) o (pRTA11) se cultivó con ADA o $\omega 3$ -DPA, que son los productos de una $\Delta 4$ -desaturación.

ES 2 310 204 T3

TABLA 4

Ácido graso como un porcentaje del lípido total extraído de levaduras				
Clon	22:4(n-6) Incorporado	22:5(n-6) Producido	22:5(n-3) Incorporado	22:6(n-3) Producido
PYX242 (control)	15,03	0	20,46	0,25
PYX242 (control)	55,36	0	62,98	0,42
PRTA11	50,73	5,42	42,39	9,17

Clave:

22:4(n-6) = Ácido adrénico

22:5(n-3) = Ácido ω 3-docosapentaenoico

22:5(n-6) = Ácido ω 6-docosapentaenoico

22:6(n-3) = Ácido docosahexaenoico

Cuando el porcentaje de conversión del sustrato en producto se calculó como se describe en la Tabla 5, el sustrato preferido, en virtud del mayor porcentaje de conversión, era el ω 3-DPA para producir DHA. Estos datos muestran claramente que estos plásmidos también codifican Δ 4-desaturasas.

TABLA 5

Porcentaje de conversión de dos sustratos en producto		
Clon	22:4n-6 50 μ M	22:5n-3 50 μ M
PYX242 (control)	0	1,2
PRSA1	3,64	9,7
PYX242 (control)	0	0,66
PRTA11	9,65	17,78
22:4n-6 en 22:5n-6 (ácido adrénico en ácido ω 6-docosapentaenoico)		
22:5n-3 en 22:6n-3 (ácido ω 3-docosapentaenoico en ácido docosahexaenoico).		

Ejemplo IX

Demostración de la coexpresión de una Δ 4-desaturasa con una elongasa de ratón en levaduras

Como se ha descrito en el Ejemplo V, la Δ 4-desaturasa de *T. aureum* (ATCC 34304) se cotransformó con la elongasa de ratón pRMELO4 (reclonada a partir del plásmido pRAE84 en pYES2).

La Tabla 6 muestra que cuando se añadieron 10 μ M del sustrato EPA (20:5n-3), la elongasa era capaz de añadir dos carbonos al EPA para producir ω 3-DPA, y la desaturasa convertía el ω 3-DPA en DHA. No se produjo DHA por la transformación de control de 334(pYX242/pYES2). Se observó una pequeña cantidad de ω 3-DPA en el control, pero era un contaminante del sustrato EPA añadido. Por lo tanto, la Δ 4-desaturasa de *T. aureum* era capaz de producir un

producto en un sistema de expresión heterólogo que era el producto de otra enzima heteróloga (la elongasa de ratón) de la ruta biosintética de los AGP para producir el AGP esperado. Esto demuestra que la $\Delta 4$ -desaturasa puede trabajar de hecho con otras enzimas heterólogas en la ruta de los AGP, en un sistema de expresión heterólogo tal como una levadura.

TABLA 6

Ácidos grasos (μg) del lípido extraído de levaduras			
Clon	EPA Incorporado	$\omega 3$-DPA producido por elongasa	DHA producido por desaturasa
PYX242/PYES2 (control)	59,38	2,54	0
PRTA7/PRMEL04 (elongasa de ratón)	47,04	14,76	1,55
Sustrato añadido 10 μM			

Ejemplo IX

Aislamiento de un nuevo gen de desaturasa a partir del alga Isochrysis galbana (CCMP1323)

La composición de ácidos grasos del alga *Isochrysis galbana* (*I. galbana*) (CCMP 1323) se investigó para determinar los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) producidos por este organismo. Este alga demostraba una cantidad importante de AGP de cadena larga que incluían ácido omega-3-docosapentaenoico (omega-3-DPA, 22:5n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3). De hecho, el DHA está presente en la mayor cantidad que representaba el 19% del lípido total. Por lo tanto, se predijo que *I. galbana* poseía una $\Delta 4$ -desaturasa capaz de convertir el omega-3-DPA en DHA. Por lo tanto, el objetivo era aislar el gen de la $\Delta 4$ -desaturasa predicha de *I. galbana* y verificar la funcionalidad de la enzima por expresión en un hospedador alternativo.

Se obtuvieron sedimentos congelados de *I. galbana* del Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP, West Boothbay Harbor, ME). Estos sedimentos se trituraron en nitrógeno líquido y se extrajo el ARN total de *I. galbana* usando el Qiagen RNeasy Maxi Kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. A partir de este ARN total, se aisló el ARNm usando resina de oligo dT celulosa que después se usó para la construcción de una genoteca de ADNc usando el kit de construcción de genotecas pBluescript II XR (Stratagene, La Jolla, CA). El ADNc producido de este modo se clonó direccionalmente (5' *NotI*/3' *EcoRI*) en el vector pBluescript II KS(+). La genoteca de *I. galbana* contenía aproximadamente $9,4 \times 10^4$ clones por μl , cada uno con un tamaño de inserto medio de aproximadamente 1300 pb. Se secuenciaron doscientos clones primarios de esta genoteca a partir del extremo 5' usando el cebador directo M13 (SEC ID N°: 47) (5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3'). La secuenciación se llevó a cabo usando el kit de secuenciación ABI BigDye (Applied Biosystems, CA) y el secuenciador de ADN MegaBase Capillary (Amersham biosciences, Piscataway, NJ).

Se obtuvo un clon de 647 pb que contenía el extremo 3' de esta nueva $\Delta 4$ -desaturasa denominada "iso25-A09" a partir de la secuenciación de los 2000 clones de la genoteca. Este fragmento compartía una identidad de secuencia de aminoácidos de ~30% con otras delta-5 y delta-6-desaturasas conocidas. Puesto que este fragmento no contenía el codón de terminación del gen, se obtuvieron clones adicionales que contenían el extremo 3' de este gen mediante amplificación por PCR de la genoteca de ADNc (molde) usando el cebador del vector del extremo 3' RO899 (SEC ID N°: 11) y RO127 (SEC ID N°: 48) (5'-CAC CTG GCT CGA GTC GAC GAT GAT GG-3'). Se llevó a cabo una amplificación por PCR usando la ADN polimerasa Platinum Taq (HF) (Invitrogen, Carlsbad, CA). La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 50 μl que contenía: 1 μl de la mezcla de ligación de la genoteca de ADNc, tampón de PCR que contenía Tris-Cl 20 mM a pH 8,4, KCl 50 mM (concentración final), 200 μM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 10 pmoles de cada cebador, MgSO_4 1,5 mM y 0,5 μl de ADN polimerasa Platinum Taq (HF). La amplificación se llevó a cabo de la forma siguiente, usando la máquina Perkin Elmer 9600: fusión inicial a 94°C durante 2 minutos seguida de 5 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos, 10 ciclos de 94°C 30 segundos, 70°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos y 20 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos, seguido de una extensión de 72°C durante 10 minutos. A partir de esta amplificación no fueron visibles bandas, lo que podía deberse a las bajas cantidades de este gen en la genoteca. Por lo tanto, se usaron 2 μl de esta reacción de PCR como molde para una segunda reacción de PCR que implicaba una ADNc polimerasa Platinum Taq (HF) bajo los mismos componentes de PCR que se han descrito anteriormente. Sin embargo, esta vez la amplificación se llevó a cabo de la forma siguiente: una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos de lo siguiente: 94°C durante 45 s, 55°C durante 30 s, 68°C durante 2 min. La reacción se terminó

ES 2 310 204 T3

a 4°C. Se obtuvo de este modo una banda de PCR de 670 pb que se purificó en gel y se clonó en un vector PCR-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los plásmidos recombinantes se usaron para transformar células supercompetentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y los clones se secuenciaron y se analizaron. Se obtuvieron de este modo los clones “iso25-A09-6” e “iso25-A09-1”, que contenían el extremo 3’ del gen junto con el codón de terminación “TAA” y la cola poli A. Este clon se solapaba con el fragmento “iso25-A09” original.

Para aislar el extremo 5’ de este gen, se usó ADNc listo para RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc) como una diana para las reacciones. Para preparar este material, se usaron aproximadamente 5 µg del ARN total de acuerdo con las instrucciones del fabricante con el kit GeneRacer™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y la enzima Superscript II™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) para la transcripción inversa, para producir ADNc diana. Después, este ADNc se usó como molde para una reacción de PCR que implicaba 30 pmoles de cebador 5’ de GeneRacer™ (SEC ID N°: 30) (5’-CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA-3’) en combinación con 10 pmoles de uno cualquiera de los siguientes cebadores específicos de gen:

15 RO1286 (SEC ID N°: 49)

5’-CGT ACC CGG TGC AAT AGA AGG TGA G-3’

20 RO1287 (SEC ID N°: 50)

5’-CCA TCA TCG TCG ACT CGA GCC AGG TG-3’

25 RO1288 (SEC ID N°: 51)

5’-TGT GGA GCC ATG TGG TGC TCG ATC TG-3’

Se llevó a cabo una amplificación por PCR usando la ADN polimerasa Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un volumen total de 50 µl que contenía: 1 µl del ADNc de RACE, tampón de PCR que contenía Tris-Cl 20 mM a pH 8,4, KCl 50 mM (concentración final), 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, MgSO₄ 1,5 mM y 0,5 µl de ADN polimerasa Platinum Taq. La amplificación se llevó a cabo de la forma siguiente, usando la máquina Perkin Elmer 9600: fusión inicial a 94°C durante 2 minutos seguida de 5 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos, 10 ciclos de 94°C 30 segundos, 70°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos y 20 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos, seguidos de una extensión de 72°C durante 10 minutos. Todas estas combinaciones de cebadores dieron como resultado bandas que se purificaron en gel, se rellenaron con ADN polimerasa T4, se clonaron en un vector PCR-blunt y se usaron para transformar células supercompetentes TOP10. La secuenciación de estos clones como “iso25-A09-33-5”, “iso25-A09-31-3”, “iso25-A09-30-1” e “iso25-A09-32-3” reveló que el extremo 5’ de este gen contenía el sitio de inicio “ATG”, el dominio del citocromo b5 y dos cajas de histidina. Estos clones se solapaban entre sí y también se solapaban con el fragmento “iso25-A09” original, que contenía la tercera caja de histidina.

Para aislar la longitud completa de este gen se usó tanto ADN genómico como el ADNc obtenido (de RACE), como moldes en reacciones de PCR con los siguientes cebadores:

45 RO 1400 (SEC ID N°: 52)

5’-TCA ACA GAA TTC **ATG** TGC AAC GCG GCG CAG GTC GAG ACG CAG-3’

(Este cebador directo contenía un sitio *EcoRI* (subrayado) junto con el sitio de inicio “ATG” (en negrita) adecuado para la clonación en el vector de expresión de levaduras pYX242).

50 RO 1401 (SEC ID N°: 53)

5’-AAA AGA AAG CTT **TTA** GTC CGC CTT GAC CGT GTC GAC CAA AGC-3’

55 (Este cebador inverso contenía un sitio *HindIII* (subrayado) junto con el sitio de terminación “TAA” (en negrita) para la clonación en pYX242). Se llevó a cabo una amplificación por PCR usando ADNc polimerasa Advantage-GC (Clontech, Palo Alto, CA) en un volumen total de 50 µl que contenía: 1 µl del ADNc de RACE o 2 µl de ADN genómico, tampón de PCR que contenía [Tricina-KOH 40 mM a pH 9,2, KOAc 15 mM (concentración final), Mg (OAc)₂ 3,5 mM, DMSO al 5%, BSA 3,75 µg/ml, 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, GC-melt 1 M y 1 µl de ADNc polimerasa Advantage-GC. El protocolo de termociclado incluía una desnaturalización inicial a 94°C durante 1 min, seguida de 30 ciclos de lo siguiente [desnaturalización a 94°C durante 30 segundos e hibridación a 68°C durante 3 minutos], una extensión final a 68°C durante 5 minutos, seguida de una terminación a 4°C.

65 Se obtenía una banda de ~1,35 kb que se purificó en gel, se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI/HindIII* durante 2 horas, se limpió mediante el kit de purificación de PCR QiaQuick (Qiagen, Valencia, CA) y se clonó en el vector de expresión de levaduras pYX242 (Novagen, Madison, WI) previamente digerido con *EcoRI/HindIII*. Esta construcción se marcó como pRIG6 y consistía en el gen de longitud completa “iso25-A09” aislado a partir de ADNc obtenido de RACE y el vector pYX242. Esto se transformó en levaduras SC334 para estudios de expresión.

ES 2 310 204 T3

El gen de longitud completa de “iso25-A09” presente en pRIG6 era de 1302 pb de longitud (SEC ID N°: 54) (Figura 20) y codificaba una proteína de 433 aminoácidos (SEC ID N°: 55) (Figura 21). Una búsqueda de tFastA de la secuencia proteica deducida de este gen mostraba que la proteína tenía una identidad del 30,6% con la $\Delta 5$ -desaturasa de *I. galbana* (Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/054.534, incorporada en su totalidad como referencia).
5 Además, la proteína predicha de este gen tenía una identidad del 30,8% con la $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) (Figura 22). (Además, se descubrió que la secuencia de ADN del gen presentaba una identidad de secuencia del 42,37% con la secuencia de nucleótidos que codifica la $\Delta 4$ -desaturasa de *T. aureum* (ATCC 34304), una identidad del 43% con la secuencia de nucleótidos que codifica la $\Delta 4$ -desaturasa de *S. aggregatum* (ATCC 28209) y una identidad del 39,7% con la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la $\Delta 4$ -desaturasa de *T. aureum*
10 (BICC7091). Como todos los genes de enzimas desaturantes iniciales como la $\Delta 5$ y la $\Delta 6$ -desaturasa, este gen contiene un dominio de citocromo b5 dentro del extremo 5' de su secuencia. Se piensa que este citocromo b5 funciona como el donador de electrones inmediato para las desaturasas y funciona en varias reacciones de oxidación-reducción que implican una desaturación dependiente de NADH. Este gen también poseía los tres motivos ricos en histidina que están presentes en todas las desaturasas unidas a membrana. Estos están presentes en las posiciones 153 a 158 (HMGGH) (SEC ID N°: 71), 188 a 193 (HNKHH) (SEC ID N°: 72) y 347 a 352 (QIEHH) (SEC ID N°: 73). Se piensa que estas
15 cajas ricas en histidina coordinan la estructura dihierro-oxo en el sitio activo de la enzima y son necesarias para la actividad enzimática. Estas características son coherentes con que este producto génico sea un miembro de la familia de desaturasas unidas a membrana/hidroxilasas de las proteínas dihierro-oxo (3) y sea también una enzima desaturante inicial. El contenido de G+C de este gen es del 64,2%.

Ejemplo X

Expresión de pRIG6, una nueva desaturasa de Isochrysis galbana (CCMP 1323), en levaduras

25 Para determinar la especificidad de sustrato y la clase de reacción catalizada por una nueva desaturasa de *I. galbana*, se expresó de forma heteróloga la construcción pRIG6 en un *Saccharomyces cerevisiae* (SC334), como se describe a continuación. Puesto que *S. cerevisiae* no puede sintetizar ácidos grasos más allá del ácido oleico (OA, 18:1 n-9), es un sistema ideal para usar para determinar la actividad enzimática en sustratos más largos que el OA puesto que no se detectará actividad enzimática de fondo. En este punto, pueden suministrarse exógenamente sustratos al hospedador,
30 captarse por la célula y afectarse por la proteína expresada del gen transformado.

El clon pRIG6, que consistía en la desaturasa “iso25-A09” de longitud completa de *I. galbana* clonada en pYX242 se usó para transformar *Saccharomyces cerevisiae* (SC334) usando el kit Alkali-Cation Yeast Transformation (BIO 101, Vista, CA). (El plásmido pRIG6 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University
35 Boulevard, Manassas, Virginia 20110, el 5 de abril de 2002 y se acordó el número de acceso PTA-4209.) Los transformantes se seleccionaron por auxotrofia para leucina en medios que carecían de leucina (DOB [-Leu]). Para detectar la actividad desaturasa específica de estos clones, los transformantes se cultivaron en presencia de 50 μ M los sustratos de ácidos grasos específicos, como se enumeran a continuación:

40 a. Ácido linoleico (LA, 18:2n-6) -la conversión en ácido α -linolénico (ALA, 18:3n-3) indica actividad $\Delta 15$ -desaturasa; la conversión en ácido gamma-linolénico indica actividad $\Delta 6$ -desaturasa.

b. Ácido dihomo-gamma-linolénico (20:3n-6) -la conversión en ácido eicosatetraenoico (ETA, 20:4n-3) indica
45 actividad $\Delta 17$ -desaturasa; la conversión en ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) indica actividad $\Delta 5$ -desaturasa.

c. Ácido omega-6-eicosadienoico (20:2n-6) -la conversión en ácido dihomo-gamma-linolénico (20:3n-6) indica
actividad $\Delta 8$ -desaturasa.

50 d. Ácido adrenico (22:4n-6) -la conversión en ácido $\omega 6$ -docosapentaenoico (22:5n-6) indica actividad $\Delta 4$ -desaturasa.

e. Ácido omega-3-docosapentaenoico (22:5n-3) -la conversión en ácido docosahexaenoico (22:6n-3) indica activi-
55 dad $\Delta 4$ -desaturasa.

La cepa de control negativo consistía en *S. cerevisiae* transformadas con el vector pYX242, y estos cultivos se cultivaron simultáneamente y se analizaron.

60 Los cultivos se agitaron vigorosamente (250 rpm) y se cultivaron durante 48 horas a 24°C en presencia de 50 μ M (concentración final) de diversos sustratos (Tabla 7). Las células se centrifugaron, se lavaron una vez en agua destilada y los sedimentos se agitaron vorticialmente en metanol; se añadió cloroformo junto con tridecanoína (como un patrón interno). Estas mezclas se incubaron durante al menos 1 hora a temperatura ambiente o a 4°C durante una noche. La fase de cloroformo se extrajo y se filtró a través de un filtro Whatman con 1 g de sulfato de sodio anhidro para
65 eliminar particulados y agua residual. Los disolventes orgánicos se evaporaron a 40°C bajo una corriente de nitrógeno. Después, los lípidos extraídos se derivatizaron a ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) para el análisis mediante cromatografía de gases (GC) por adición de 2 ml de hidróxido de potasio 0,5 N en metanol en un tubo cerrado. Las muestras se calentaron a 95°C-100°C durante 30 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente. Se añadieron

ES 2 310 204 T3

aproximadamente 2 ml de trifluoruro de boro al 14% en metanol y se repitió el calentamiento. Después de enfriarse la mezcla de lípidos extraída, se añadieron 2 ml de agua y 1 ml de hexano al extracto de EMAG para el análisis por GC. El porcentaje de conversión se calculó usando la fórmula:

$$\% \text{ Conversión} = \frac{[\% \text{ Producto}]}{[\% \text{ Producto} + \% \text{ Sustrato}]} \times 100$$

La Tabla 7 muestra la especificidad de sustrato de la nueva desaturasa expresada en levadura. En este punto, el clon de pRIG6 expresado era capaz de convertir el 15,3% del ácido ω 3-docosapentaenoico (22:5n-3) en ácido docosahexaenoico (22:5n-3), indicando que el gen era una Δ 4-desaturasa. Además, esta enzima era capaz de convertir el 11% del ácido adrénico (22:4n-6) en ácido ω 6-docosapentaenoico (22:5n-6), que también indicaba actividad Δ 4-desaturasa.

Los ácidos grasos de interés se representan como porcentaje de los lípidos totales extraídos de levaduras. Se empleó GC/MS para identificar los productos. En estas condiciones, los clones no presentaban otras actividades desaturasas. Esto confirmaba que el gen aislado era un nuevo gen de Δ 4-desaturasa. No se detectó conversión de sustrato de fondo con el uso de sólo el vector en solitario. Estos datos indican que esta nueva Δ 4-desaturasa puede expresarse en un sistema heterólogo y, por lo tanto, sería útil en la producción de aceite transgénico que contenga DHA.

TABLA 7

Expresión de la Δ4-desaturasa de <i>Isochrysis galbana</i> (CCMP 1323) en levadura de panadería a 24°C				
Clon	Actividad desaturasa	Sustrato* incorporado	Sustrato producido	% Conversión de sustrato
pRIG6	Δ 6	LA (8,350)	GLA (0%)	0
(pYX242 + delta 4)	Δ 5	DGLA (16,34%)	AA (0,29%)	0
	Δ 8	ω 6-EDA (19,53%)	DGLA (0%)	0
	Δ 4	ADA (23,93)	ω 6-DPA (3,15%)	11%
	Δ 4	ω 3-DPA (32,57%)	DHA (5,89%)	15,3%
Control (pYX242)	Δ 6	LA (9,18%)	GLA (0%)	0
	Δ 5	DGLA (10,5%)	AA (0%)	0
	Δ 8	ω 6-EDA (16,560)	DGLA (0%)	0
	Δ 4	ADA (15,550)	ω 6-DPA (0%)	0
	Δ 4	ω 3-DPA (26,03%)	DHA (0,29%)	0
* Sustrato usado 50 μ M				
Los números entre paréntesis representan el ácido graso como porcentaje de los lípidos totales de levaduras				

Clave:

LA = Ácido linolénico (18:2n-6)

GLA = Ácido gamma-linolénico (18:3n-6)

DGLA = Ácido dihomo-gamma-linolénico (20:3n-6)

M = Ácido araquidónico (20:4n-6)

ω 6-EDA = Ácido omega-6-eicosadienoico (20:2n-6)

ES 2 310 204 T3

ADA = Ácido adrenico (22:4n-6)

ω 3-DPA = Ácido omega-3-docosapentaenoico (22:5n-6)

5 ω 6-DPA= Ácido omega-6-docosapentaenoico (22:5n-3)

DHA= Ácido docosahexaenoico (22:6n-3)

10 *Composiciones nutricionales*

Los AGP descritos en la Descripción detallada pueden utilizarse en diversos complementos nutricionales, formulaciones para lactantes, sustitutos nutricionales y otras soluciones nutricionales.

15

I. *Formulaciones para lactantes*

A. *Fórmula de soja con hierro Isomil®*

20 Uso: Como una bebida para lactantes, niños y adultos con una alergia o sensibilidad a la leche de vaca. Un alimento para pacientes con trastornos para los que debe evitarse la lactosa: deficiencia de lactasa, intolerancia a la lactosa y galactosemia.

25 Características:

- Proteína de soja aislada para evitar los síntomas de la alergia o la sensibilidad a proteínas de la leche de vaca.

- Formulación sin lactosa para evitar la diarrea asociada a la lactosa.

30 - Baja osmolaridad (240 mOs/kg de agua) para reducir el riesgo de diarrea osmótica.

- Hidratos de carbono dobles (jarabe de maíz y sacarosa) diseñados para mejorar la absorción de hidratos de carbono y reducir el riesgo de sobrepasar la capacidad absorbente del intestino dañado.

35 - 1,8 mg de hierro (como sulfato ferroso) por 100 calorías para ayudar a prevenir la deficiencia de hierro.

- Niveles recomendados de vitaminas y minerales.

40 - Aceites vegetales para proporcionar niveles recomendados de ácidos grasos esenciales.

45 - Color blanco lechoso, consistencia similar a la leche y aroma agradable. Ingredientes: (Pareve) agua al 85%, jarabe de maíz al 4,9%, azúcar (sacarosa) al 2,6%, aceite de soja al 2,1%, aislado de proteína de soja al 1,9%, aceite de coco al 1,4%, citrato de calcio al 0,15%, fosfato de calcio tribásico al 0,11%, citrato de potasio, fosfato de potasio monobásico, cloruro de potasio, monoglicéridos y diglicéridos, lecitina de soja, carragenina, ácido ascórbico, L-metionina, cloruro de magnesio, fosfato de potasio dibásico, cloruro de sodio, cloruro de colina, taurina, sulfato ferroso, m-inositol, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, L-carnitina, niacinamida, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, palmitato de vitamina A, clorhidrato de cloruro de tiamina, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, filloquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

50

B. *Fórmula de soja para diarrea Isomil® DF*

Uso: Como una alimentación a corto plazo para el tratamiento dietético de la diarrea en lactantes y niños pequeños.

55 Características:

- Primera fórmula para lactantes que contiene fibra dietética añadida a partir de fibra de soja específicamente para el tratamiento de la diarrea.

60 - Se ha demostrado clínicamente que reduce la duración de las heces líquidas y sueltas durante la diarrea de leve a grave en lactantes.

- Nutricionalmente completa para satisfacer las necesidades nutricionales de los lactantes.

65 - Aislado de proteína de soja con L-metionina añadida satisface o supera los requerimientos de lactantes de todos los aminoácidos esenciales.

ES 2 310 204 T3

- Formulación sin lactosa para evitar la diarrea asociada a la lactosa.

- Baja osmolaridad (240 mOsm/kg de agua) para reducir el riesgo de diarrea osmótica.

5 - Hidratos de carbono dobles (jarabe de maíz y sacarosa) diseñados para mejorar la absorción de hidratos de carbono y reducir el riesgo de sobrepasar la capacidad absorbente del intestino dañado.

- Satisface o excede los niveles recomendados de vitaminas y minerales por el Committee on Nutrition of the American Academy of Pediatrics y requeridos por el Infant Formula Act.

10

- 1,8 mg de hierro (como sulfato ferroso) por 100 calorías para ayudar a prevenir la deficiencia de hierro.

- Aceites vegetales para proporcionar niveles recomendados de ácidos grasos esenciales.

15

Ingredientes: (Pareve) agua al 86%, jarabe de maíz al 4,8%, azúcar (sacarosa) al 2,5%, aceite de soja al 2,1%, aislado de proteína de soja al 2,0%, aceite de coco al 1,4%, fibra de soja al 0,77%, citrato de calcio al 0,12%, fosfato de calcio tribásico al 0,11%, citrato de potasio al 0,10%, cloruro de potasio, fosfato de potasio monobásico, monoglicéridos y diglicéridos, lecitina de soja, carragenina, cloruro de magnesio, ácido ascórbico, L-metionina, fosfato de potasio dibásico, cloruro de sodio, cloruro de colina, taurina, sulfato ferroso, m-inositol, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, L-carnitina, niacinamida, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, palmitato de vitamina A, clorhidrato de cloruro de tiamina, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

20

25

C. Fórmula de soja sin sacarosa con hierro Isomil® SF

Uso: Como una bebida para lactantes, niños y adultos con una alergia o sensibilidad a proteínas de la leche de vaca o una intolerancia a la sacarosa. Una alimentación para pacientes con trastornos para los que deba evitarse la lactosa y la sacarosa.

30

Características:

- Aislado de proteína de soja para evitar los síntomas de la alergia o la sensibilidad a proteínas de la leche de vaca.

35

- Formulación sin lactosa para evitar la diarrea asociada a la lactosa (la fuente de hidratos de carbono son polímeros de glucosa Polycose®).

- Sin sacarosa para los pacientes que no pueden tolerar la sacarosa.

40

- Baja osmolaridad (180 mOsm/kg de agua) para reducir el riesgo de diarrea osmótica.

- 1,8 mg de hierro (como sulfato ferroso) por 100 calorías para ayudar a prevenir la deficiencia de hierro.

- Niveles recomendados de vitaminas y minerales.

45

- Aceites vegetales para proporcionar niveles recomendados de ácidos grasos esenciales.

- Color blanco lechoso, consistencia similar a la leche y aroma agradable.

50

Ingredientes: (Pareve) agua al 75%, almidón de maíz hidrolizado al 11,8%, aceite de soja al 4,1%, aislado de proteína de soja al 4,1%, aceite de coco al 2,8%, almidón de maíz modificado al 1,0%, fosfato de calcio tribásico al 0,38%, citrato de potasio al 0,17%, cloruro de potasio al 0,13%, monoglicéridos y diglicéridos, lecitina de soja, cloruro de magnesio, ácido ascórbico, L-metionina, carbonato de calcio, cloruro de sodio, cloruro de colina, carragenina, taurina, sulfato ferroso, m-inositol, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, L-carnitina, niacinamida, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, palmitato de vitamina A, clorhidrato de cloruro de tiamina, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

55

60

D. Fórmula de soja con hierro lista para usar Isomil® 20, 20 cal/onza líquida (28,41 ml)

Uso: Cuando se desea un alimento de soja.

65

Ingredientes: (Pareve) agua al 85%, jarabe de maíz al 4,9%, azúcar (sacarosa) al 2,6%, aceite de soja al 2,1%, aislado de proteína de soja al 1,9%, aceite de coco al 1,4%, citrato de calcio al 0,15%, fosfato de calcio tribásico al 0,11%, citrato de potasio, fosfato de potasio monobásico, cloruro de potasio, monoglicéridos y diglicéridos, lecitina de soja, carragenina, ácido ascórbico, L-metionina, cloruro de magnesio, fosfato de potasio dibásico, cloruro de sodio, cloruro de colina, taurina, sulfato ferroso, m-inositol, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, L-carnitina, niacinamida, pan-

ES 2 310 204 T3

totenato de calcio, sulfato cúprico, palmitato de vitamina A, clorhidrato de cloruro de tiamina, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

5

E. *Fórmula para lactantes Similac®*

Uso: Cuando se necesite una fórmula para lactantes: si la decisión se toma para interrumpir la lactancia materna antes del primer año de edad, si es necesario un suplemento para la lactación materna o como una alimentación de rutina si no se adopta la lactación materna.

Características:

- Proteína de una calidad y cantidad apropiadas para un buen crecimiento; desnaturalizada por calor, que reduce el riesgo de pérdidas sanguíneas entéricas asociadas con la leche.

- Grasa de una mezcla de aceites vegetales (doblemente homogeneizados) que proporciona ácido linoleico esencial, que se absorbe fácilmente.

- Hidratos de carbono como lactosa en una proporción similar a la de la leche humana.

- Baja carga de solutos renales para minimizar las agresiones sobre los órganos en desarrollo.

- Formas en polvo, líquido concentrado y lista para usar. Ingredientes: (-D) Agua, leche desnatada, lactosa, aceite de soja, aceite de coco, monoglicéridos y diglicéridos, lecitina de soja, ácido ascórbico, carragenina, cloruro de colina, taurina, m-inositol, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, niacinamida, sulfato ferroso, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, palmitato de vitamina A, clorhidrato de cloruro de tiamina, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

30

F. *Fórmula para lactantes prematuros con hierro Similac® NeoCare*

Uso: Para las necesidades nutricionales especiales de los lactantes prematuros después de salir del hospital. Similac NeoCare es una fórmula nutricionalmente completa desarrollada para proporcionar a los lactantes prematuros calorías, proteínas, vitaminas y minerales extra necesarios para promover que alcancen el crecimiento normal y contribuir al desarrollo.

Características:

- Reduce la necesidad de suplementación calórica y vitamínica. Más calorías (22 cal/onza líquida (28,41 ml)) que las fórmulas convencionales para este periodo (20 cal/onza líquida (28,41 ml)).

- Mezcla de grasas de alta absorción con triglicéridos de cadena media (MCToil) para ayudar a satisfacer las necesidades digestivas especiales de los lactantes prematuros.

- Mayores niveles de proteína, vitaminas y minerales por 100 calorías para prolongar el soporte nutricional iniciado en el hospital.

- Más calcio y fósforo para mejorar la mineralización de los huesos.

Ingredientes: -D Sólidos de jarabe de maíz, leche desnatada, lactosa, concentrado de proteína del suero, aceite de soja, aceite de cártamo rico en oleico, aceite de coco fraccionado (triglicéridos de cadena media), aceite de coco, citrato de potasio, fosfato de calcio tribásico, carbonato de calcio, ácido ascórbico, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, taurina, sulfato ferroso, m-inositol, cloruro de colina, palmitato de ascorbilo, L-carnitina, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, niacinamida, tocoferoles mixtos, citrato de sodio, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, clorhidrato de cloruro de tiamina, palmitato de vitamina A, betacaroteno, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

G. *Fortificante de leche materna bajo en hierro listo para usar Similac Natural Care, 24 cal/onza líquida (28,41 ml)*

Uso: Diseñado para mezclar con leche materna o para alimentar de forma alternativa con leche materna para lactantes con bajo peso al nacimiento.

Ingredientes: -D Agua, leche desnatada, almidón de maíz hidrolizado, lactosa, aceite de coco fraccionado (triglicéridos de cadena media), concentrado de proteína del suero, aceite de soja, aceite de coco, fosfato de calcio tribásico, citrato de potasio, cloruro de magnesio, citrato de sodio, ácido ascórbico, carbonato de calcio, monoglicéridos y di-

ES 2 310 204 T3

glicéridos, lecitina de soja, carragenina, cloruro de colina, m-inositol, taurina, niacinamida, L-carnitina, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, cloruro de potasio, pantotenato de calcio, sulfato ferroso, sulfato cúprico, riboflavina, palmitato de vitamina A, clorhidrato de cloruro de tiamina, clorhidrato de piridoxina, biotina, ácido fólico, sulfato de manganeso, filoquinona, vitamina D3, selenito de sodio y cianocobalamina.

5 Diversos AGP de esta invención pueden sustituirse y/o añadirse a las fórmulas para lactantes descritas anteriormente y a otras fórmulas para lactantes conocidas por los especialistas en la técnica.

10 II. Formulaciones nutricionales

A. ENSURE®

15 Uso: ENSURE es un alimento líquido bajo en residuos diseñado principalmente como un complemento nutricional oral para usar con o entre las comidas o en cantidades apropiadas como un sustituto de las comidas. ENSURE no contiene lactosa ni gluten y es adecuado para usar en dietas modificadas, incluyendo dietas bajas en colesterol. Aunque principalmente es un complemento oral, puede suministrarse mediante sonda.

Condiciones del paciente:

- 20 - Para pacientes con dietas modificadas.
- Para pacientes ancianos con riesgos nutricionales.
- 25 - Para pacientes con una pérdida de peso involuntaria.
- Para pacientes que se estén recuperando de una enfermedad o cirugía.
- Para pacientes que necesitan una dieta baja en residuos.

30 Ingredientes: -D Agua, azúcar (sacarosa), maltodextrina (maíz), caseinatos de calcio y sodio, aceite de cártamo rico en oleico, aislado de proteína de soja, aceite de soja, aceite de colza, citrato de potasio, fosfato de calcio tribásico, citrato de sodio, cloruro de magnesio, fosfato de magnesio dibásico, aromas artificiales, cloruro sódico, lecitina de soja, cloruro de colina, ácido ascórbico, carragenina, sulfato de cinc, sulfato ferroso, acetato de alfa-tocoferilo, goma gelano, niacinamida, pantotenato de calcio, sulfato de manganeso, sulfato cúprico, palmitato de vitamina A, clorhidrato de cloruro de tiamina, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, ácido fólico, molibdato de sodio, cloruro de cromo, biotina, yoduro de potasio, selenato de sodio.

40 B. ENSURE® BARRAS

Uso: Las BARRAS ENSURE son complementos nutricionales completos y equilibrados para usar entre o con las comidas. Proporcionan una alternativa deliciosa rica en nutrientes a otros aperitivos. Las BARRAS ENSURE contienen menor <1 g de lactosa/barra y el sabor Chocolate Fudge Brownie no contiene gluten (el sabor Honey Graham Crunch contiene gluten).

Condiciones del paciente:

- 50 - Para pacientes que necesiten calorías, proteína, vitaminas y minerales extra.
- Especialmente útiles para personas que no ingieren suficientes calorías y nutrientes.
- Para personas que tienen la capacidad de masticar y tragar.
- 55 - No deben usarse por nadie con alergia al cacahuete o cualquier tipo de alergia a frutos secos.

60 Ingredientes: Honey Graham Crunch - Jarabe de maíz rico en fructosa, aislado de proteína de soja, azúcar moreno, miel, maltodextrina (maíz), arroz inflado (arroz molido, azúcar [sacarosa], sal [cloruro de sodio] y malta), salvado de avena, aceites de semilla de algodón y de soja parcialmente hidrogenados, polisacárido de soja, glicerina, concentrado de proteína del suero, polidextrosa, fructosa, caseinato de calcio, polvo de coco, aromas artificiales, aceite de colza, aceite de cártamo rico en oleico, leche en polvo desnatada, polvo de suero, lecitina de soja y aceite de maíz. Fabricado en una instalación que procese frutos secos.

65 Vitaminas y minerales: fosfato de calcio tribásico, fosfato de potasio dibásico, óxido de magnesio, sal (cloruro de sodio), cloruro de potasio, ácido ascórbico, ortofosfato férrico, acetato de alfa-tocoferilo, niacinamida, óxido de cinc, pantotenato de calcio, gluconato de cobre, sulfato de manganeso, riboflavina, betacaroteno, clorhidrato de piridoxina, mononitrato de tiamina, ácido fólico, biotina, cloruro de cromo, yoduro de potasio, selenato de sodio, molibdato de sodio, filoquinona, vitamina D3 y cianocobalamina.

ES 2 310 204 T3

Proteína: Honey Graham Crunch - La fuente de proteína es una mezcla de aislado de proteína de soja y proteínas de la leche.

5	Aislado de proteína de soja	74%
	Proteínas de la leche	26%

Grasa: Honey Graham Crunch - La fuente de grasa es una mezcla de aceites de semilla de algodón y de soja, de colza, de cártamo rico en oleico parcialmente hidrogenados y lecitina de soja.

Aceite de semilla de algodón y de soja parcialmente hidrogenado 76%.

15	Aceite de colza	8%
	Aceite de cártamo rico en oleico	8%
	Aceite de maíz	4%
20	Lecitina de soja	4%

Hidratos de carbono: Honey Graham Crunch - La fuente de hidratos de carbono es una combinación de jarabe de maíz rico en fructosa, azúcar moreno, maltodextrina, miel, arroz inflado, glicerina, polisacárido de soja y salvado de avena.

	Jarabe de maíz rico en fructosa	24%
30	Azúcar moreno	21%
	Maltodextrina	12%
	Miel	11%
35	Arroz inflado	9%
	Glicerina	9%
40	Polisacárido de soja	7%
	Salvado de avena	7%

C. ENSURE® HIGH PROTEIN

50 Uso: ENSURE HIGH PROTEIN es un alimento líquido concentrado rico en proteínas diseñado para personas que requieren calorías, proteína, vitaminas y minerales adicionales en sus dietas. Puede usarse como un complemento nutricional oral con o entre las comidas o, en cantidades apropiadas, como un sustituto de las comidas. ENSURE HIGH PROTEIN no contiene lactosa ni gluten y es adecuado para usar por personas que se estén recuperando de una cirugía general o de fracturas de cadera y en pacientes en riesgo de padecer úlceras por presión.

Condiciones del paciente:

55 - Para pacientes que requieren calorías, proteínas, vitaminas y minerales adicionales, tales como pacientes que se estén recuperando de una cirugía general o de fracturas de cadera, pacientes en riesgo de padecer úlceras por presión y pacientes con dietas bajas en colesterol.

Características:

- 60 - Bajo en grasa saturada.
- Contiene 6 g de grasa total y < 5 mg de colesterol por porción.
- Sabor rico y cremoso.
- 65 - Excelente fuente de proteína, calcio y otras vitaminas y minerales esenciales.

ES 2 310 204 T3

- Para dietas bajas en colesterol.

- Sin lactosa y fácil de digerir.

5

Ingredientes:

10 Vanilla Supreme: -D Agua, azúcar (sacarosa), maltodextrina (maíz), caseinatos de calcio y sodio, aceite de cártamo rico en oleico, aislado de proteína de soja, aceite de soja, aceite de colza, citrato de potasio, fosfato de calcio tribásico, citrato de sodio, cloruro de magnesio, fosfato de magnesio dibásico, aromas artificiales, cloruro sódico, lecitina de soja, cloruro de colina, ácido ascórbico, carragenina, sulfato de cinc, sulfato ferroso, acetato de alfa-tocoferilo, goma gelano, niacinamida, pantotenato de calcio, sulfato de manganeso, sulfato cúprico, palmitato de vitamina A, clorhidrato de cloruro de tiamina, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, ácido fólico, molibdato de sodio, cloruro de cromo, biotina, yoduro de potasio, selenato de sodio, filoquinona, vitamina D3 y cianocobalamina.

15

Proteína:

La fuente de proteína es una mezcla de dos proteínas de alto valor biológico: caseína y soja.

20

Caseinatos de sodio y calcio 85%

Aislado de proteína de soja 15%

25

Grasa:

La fuente de grasa es una mezcla de tres aceites: de cártamo rico en oleico, de colza y de soja.

30

Aceite de cártamo rico en oleico 40%

Aceite de colza 30%

35

Aceite de soja 30%

40 El nivel de grasa en ENSURE HIGH PROTEIN cumple las directrices de la Asociación Americana del Corazón (AHA). Los 6 gramos de grasa en ENSURE HIGH PROTEIN representan el 24% de las calorías totales, siendo el 2,6% de la grasa de ácidos grasos saturados y el 7,9% de ácidos grasos poliinsaturados. Estos valores están dentro de las directrices de la AHA de <30% de calorías totales de la grasa, <10% de las calorías de ácidos grasos saturados y <10% de las calorías totales de ácidos grasos poliinsaturados.

Hidratos de Carbono:

45

ENSURE HIGH PROTEIN contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El dulzor moderado y la variedad de sabores (vanilla supreme, chocolate royal, wild berry y banana) más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pacana, cereza, fresa, limón y naranja ayudan a evitar que el paciente se canse del sabor y contribuye a su conformidad. Vainilla y otros sabores distintos de chocolate:

50

Sacarosa 60%

Maltodextrina 40%

55

Chocolate:

Sacarosa 70%

60

Maltodextrina 30%

D. ENSURE® LIGHT

65 Uso: ENSURE LIGHT es un alimento líquido bajo en grasa diseñado para usar como un complemento nutricional oral con o entre las comidas. ENSURE LIGHT no contiene lactosa ni gluten y es adecuado para usar en dietas modificadas, incluyendo dietas bajas en colesterol.

ES 2 310 204 T3

Condiciones del paciente:

- Para pacientes de peso normal o con sobrepeso que necesitan una nutrición extra en un suplemento que contenga un 50% menos de grasa y un 20% menos de calorías que ENSURE.

5

- Para adultos sanos que no comen bien y necesitan una nutrición extra.

Características:

10

- Bajo en grasas y grasas saturadas.

- Contiene 3 g de grasa total por porción y <5 mg de colesterol.

15

- Sabor rico y cremoso.

- Excelente fuente de calcio y otras vitaminas y minerales esenciales.

20

- Para dietas bajas en colesterol.

- Sin lactosa y fácil de digerir.

Ingredientes:

25

French Vanilla: -D agua, maltodextrina (maíz), azúcar (sacarosa), caseinato de calcio, aceite de cártamo rico en oleico, aceite de colza, cloruro de magnesio, citrato de sodio, citrato de potasio, fosfato de potasio dibásico, fosfato de magnesio dibásico, aromas naturales y artificiales, fosfato de calcio tribásico, gel de celulosa, cloruro de colina, lecitina de soja, carragenina, sal (cloruro de sodio), ácido ascórbico, goma de celulosa, sulfato ferroso, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, niacinamida, sulfato de manganeso, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, clorhidrato de cloruro de tiamina, palmitato de vitamina A, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, cloruro de cromo, ácido fólico, molibdato de sodio, biotina, yoduro de potasio, selenato de sodio, filoquinona, vitamina D3 y cianocobalamina.

30

Proteína:

35

La fuente de proteína es caseinato de calcio.

Caseinato de calcio	100%
---------------------	------

40

Grasa:

La fuente de grasa es una mezcla de dos aceites: de cártamo rico en oleico y de colza.

Aceite de cártamo rico en oleico	70%
----------------------------------	-----

45

Aceite de colza	30%
-----------------	-----

El nivel de grasa en ENSURE LIGHT cumple las directrices de la Asociación Americana del Corazón (AHA). Los 3 gramos de grasa en ENSURE LIGHT representan el 13,5% de las calorías totales, siendo el 1,4% de la grasa de ácidos grasos saturados y el 2,6% de ácidos grasos poliinsaturados. Estos valores están dentro de las directrices de la AHA de <30% de calorías totales de la grasa, <10% de las calorías de ácidos grasos saturados y <10% de las calorías totales de ácidos grasos poliinsaturados.

50

55

Hidratos de carbono:

ENSURE LIGHT contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El sabor de chocolate contiene también jarabe de maíz. El dulzor moderado y la variedad de sabores (French vanilla, chocolate supreme, strawberry swirl) más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pacana, cereza, fresa, limón y naranja ayudan a evitar que el paciente se canse del sabor y contribuyen a su conformidad.

60

Sabor vainilla y otros distintos de chocolate:

65

Sacarosa	50%
----------	-----

Maltodextrina	49%
---------------	-----

ES 2 310 204 T3

Chocolate:

	Sacarosa	47,0%
5	Jarabe de maíz	26,5%
	Maltodextrina	26,5%

10 Vitaminas y minerales:

Una porción de 8 onzas líquidas (236,588 ml) de ENSURE LIGHT proporciona al menos el 25% de la CDR para 24 vitaminas y minerales clave.

15 Cafeína:

El sabor de chocolate contiene 2,1 mg de cafeína/8 onzas líquidas (236,588 ml).

20 E. ENSURE PLUS®

Uso: ENSURE PLUS es un alimento líquido bajo en residuos y rico en calorías para usar cuando se requieren calorías y nutrientes extra pero una concentración normal de proteína. Esta diseñado principalmente como un complemento nutricional oral para usar con o entre comidas o, en cantidades apropiadas, como un sustituto de las comidas. 25 ENSURE PLUS no contiene lactosa ni gluten. Aunque principalmente es un complemento nutricional oral, puede suministrarse mediante sonda.

Condiciones del paciente:

30 - Para pacientes que requieren calorías y nutrientes extras pero una concentración normal de proteína en un volumen limitado.

- Para pacientes que necesitan ganar peso o mantener un peso saludable.

35

Características:

- Sabor rico y cremoso.

40 - Buena fuente de vitaminas y minerales esenciales.

Ingredientes:

45 Vainilla: -D agua, jarabe de maíz, maltodextrina (maíz), aceite de maíz, caseinato de sodio y calcio, azúcar (sacarina), aislado de proteína de soja, cloruro de magnesio, citrato de potasio, fosfato de calcio tribásico, lecitina de soja, aromas naturales y artificiales, citrato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de colina, ácido ascórbico, carragenina, sulfato de cinc, sulfato ferroso, acetato de alfa-tocoferilo, niacinamida, pantotenato de calcio, sulfato de manganeso, sulfato cúprico, clorhidrato de cloruro de tiamina, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, palmitato de vitamina 50 A, ácido fólico, biotina, cloruro de cromo, molibdato de sodio, yoduro de potasio, selenito de sodio, filoquinona, cianocobalamina y vitamina D3.

Proteína:

55

La fuente de proteína es una mezcla de dos proteínas de alto valor biológico: caseína y soja.

Caseinato de sodio y calcio 84%

60 Aislado de proteína de soja 16%

Grasa:

65 La fuente de grasa es aceite de maíz.

Aceite de maíz 100%

ES 2 310 204 T3

Hidratos de carbono:

ENSURE PLUS contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El dulzor moderado y la variedad de sabores (vainilla, chocolate, fresa, café, mantequilla de pacana y yema) más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pacana, cereza, fresa, limón y naranja ayudan a evitar que el paciente se canse del sabor y contribuyen a su conformidad.

Los sabores de vainilla, fresa, mantequilla de pacana y café:

10	Jarabe de maíz	39%
	Maltodextrina	38%
15	Sacarosa	23%

Los sabores de chocolate y yema:

20	Jarabe de maíz	36%
	Maltodextrina	34%
	Sacarosa	30%

25 Vitaminas y minerales:

Una porción de 8 onzas líquidas (236,588 ml) de ENSURE PLUS proporciona al menos el 15% de las CDR para 25 vitaminas y minerales clave.

30

Cafeína:

35 El sabor de chocolate contiene 3,1 mg de cafeína/8 onzas líquidas (236,588 ml). El sabor de café contiene cantidades traza de cafeína.

F. ENSURE PLUS® HN

40 Uso: ENSURE PLUS HN es un alimento líquido nutricionalmente completo rico en calorías y rico en nitrógeno diseñado para personas con necesidades calóricas y proteicas mayores o una tolerancia de volumen limitada. Puede usarse para una suplementación oral o para soporte nutricional total mediante sonda. ENSURE PLUS HN no contiene lactosa ni gluten.

45 Condiciones del paciente:

- Para pacientes con necesidades calóricas y proteicas aumentadas, tal como después de una cirugía o lesión.
- Para pacientes con una tolerancia de volumen limitada y que se llenan rápido.

50

Características:

- Para una nutrición complementaria o total.
- Para alimentación oral o mediante sonda.
- 1,5 cal/ml.
- Rico en nitrógeno.
- Calóricamente denso.

60

65 Ingredientes:

Vainilla: -D agua, maltodextrina (maíz), caseinatos de sodio y calcio, aceite de maíz, azúcar (sacarosa), aislado de proteína de soja, cloruro de magnesio, citrato de potasio, fosfato de calcio tribásico, lecitina de soja, aromas naturales

ES 2 310 204 T3

5 y artificiales, citrato de sodio, cloruro de colina, ácido ascórbico, taurina, L-carnitina, sulfato de cinc, sulfato ferroso, acetato de alfa-tocoferilo, niacinamida, carragenina, pantotenato de calcio, sulfato de manganeso, sulfato cúprico, clorhidrato de cloruro de tiamina, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, palmitato de vitamina A, ácido fólico, biotina, cloruro de cromo, molibdato de sodio, yoduro de potasio, selenito de sodio, filoquinona, cianocobalamina y vitamina D3.

G. ENSURE® EN POLVO

10 Uso: ENSURE EN POLVO (reconstituido con agua) es un alimento líquido bajo en residuos diseñado principalmente como un complemento nutricional oral para usar con o entre las comidas. ENSURE EN POLVO no contienen lactosa ni gluten y es adecuado para el uso en dietas modificadas, incluyendo dietas bajas en colesterol.

Condiciones del paciente:

- 15
- Para pacientes con dietas modificadas.
 - Para pacientes ancianos en riesgo nutricional.
 - 20 - Para pacientes que se estén recuperando de una enfermedad o cirugía.
 - Para pacientes que necesitan una dieta baja en residuos.

Características:

- 25
- Práctico, fácil de mezclar.
 - Bajo en grasas saturadas.
 - 30 - Contiene 9 g de grasa total y <5 mg de colesterol por porción.
 - Rico en vitaminas y minerales.
 - 35 - Para dietas bajas en colesterol.
 - Sin lactosa y fácil de digerir.

40 Ingredientes: -D Jarabe de maíz, maltodextrina (maíz), azúcar (sacarosa), aceite de maíz, caseinatos de sodio y calcio, aislado de proteína de soja, aromas artificiales, citrato de potasio, cloruro de magnesio, citrato de sodio, fosfato de calcio tribásico, cloruro de potasio, lecitina de soja, ácido ascórbico, cloruro de colina, sulfato de cinc, sulfato ferroso, acetato de alfa-tocoferilo, niacinamida, pantotenato de calcio, sulfato de manganeso, clorhidrato de cloruro de tiamina, sulfato cúprico, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, palmitato de vitamina A, ácido fólico, biotina, molibdato de sodio, cloruro de cromo, yoduro de potasio, selenato de sodio, filoquinona, vitamina D3 y cianocobalamina.

Proteína:

La fuente de proteína es una mezcla de dos proteínas de alto valor biológico: caseína y soja.

50

Caseinatos de sodio y calcio	84%
Aislado de proteína de soja	16%

Grasa:

La fuente de grasa es aceite de maíz.

60

Aceite de maíz	100%
----------------	------

Hidratos de carbono:

65 ENSURE EN POLVO contiene una combinación de jarabe de maíz, maltodextrina y sacarosa. El dulzor moderado de ENSURE EN POLVO, más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pacana, cereza, fresa, limón y naranja, ayudan a evitar que el paciente se canse del sabor y contribuyen a su conformidad.

ES 2 310 204 T3

Vainilla:

Jarabe de maíz 35%

5 Maltodextrina 35%

Sacarosa 30%

10 H. ENSURE® PUDDING

Uso: ENSURE PUDDING es un complemento denso en nutrientes que proporciona una nutrición equilibrada en una forma no líquida para usar con o entre las comidas. Es apropiado para dietas de consistencia modificada (por ejemplo, blandas, en puré o completamente líquidas) o para personas con problemas de deglución. ENSURE
15 PUDDING no contiene gluten.

Condiciones del paciente:

20 - Para pacientes con dietas de consistencia modificada (por ejemplo, blanda, en puré o completamente líquida).

- Para pacientes con problemas de deglución.

Características:

25 - Rico y cremoso, buen sabor.

- Buena fuente de vitaminas y minerales esenciales.

30 - Práctico, no necesita refrigeración.

- Sin gluten.

35 Perfil de nutrientes por 5 onzas (142 gramos): calorías 250, proteína 10,9%, grasa total 34,9%, hidratos de carbono 54,2%.

Ingredientes:

40 Vainilla: -D leche desnatada, agua, azúcar (sacarosa), aceite soja parcialmente hidrogenado, almidón alimentario modificado, sulfato de magnesio, estearoil lactilato de sodio, fosfato de sodio dibásico, aromas artificiales, ácido ascórbico, sulfato de cinc, sulfato ferroso, acetato de alfa-tocoferilo, cloruro de colina, niacinamida, sulfato de manganeso, pantotenato de calcio, FD&C Yellow #5, citrato de potasio, sulfato cúprico, palmitato de vitamina A, clorhidrato de cloruro de tiamina, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, FD&C Yellow #6, ácido fólico, biotina, filoquinona, vitamina
45 D3 y cianocobalamina.

Proteína:

La fuente de proteína es leche desnatada.

50 Leche desnatada 100%

Grasa:

55 La fuente de grasa es aceite de soja hidrogenado.

Aceite de soja hidrogenado 100%

60 Hidratos de carbono:

ENSURE PUDDING contiene una combinación de sacarosa y almidón alimentario modificado. El dulzor moderado y la variedad de sabores (vainilla, chocolate, dulce de azúcar y tapioca) ayudan a evitar el cansancio del sabor. El
65 producto contiene 9,2 g de lactosa por porción.

ES 2 310 204 T3

Vainilla y otros sabores distintos de chocolate:

Sacarosa 56%

5 Lactosa 27%

Almidón alimentario modificado 17%

10 Chocolate:

Sacarosa 58%

Lactosa 26%

15 Almidón alimentario modificado 16%

20 I. ENSURE® CON FIBRA

25 Uso: ENSURE CON FIBRA es un alimento líquido nutricionalmente completo que contiene fibra diseñado para personas que pueden beneficiarse de un aumento dietético de fibra y nutrientes. ENSURE CON FIBRA es adecuado para personas que no requieren una dieta baja en residuos. Puede suministrarse por vía oral o mediante sonda y puede usarse como un complemento nutricional en una dieta normal o, en cantidades apropiadas, como un sustituto de las comidas. ENSURE CON FIBRA no contiene lactosa ni gluten y es adecuado para usar en dietas modificadas, incluyendo dietas bajas en colesterol.

Condiciones del paciente:

30 - Para pacientes que pueden beneficiarse de un aumento dietético de fibra y nutrientes.

Características:

35 - Nueva fórmula avanzada baja en grasa saturada con mayor cantidad de vitaminas y minerales.

- Contiene 6 g de grasa total y <5 mg de colesterol por porción.

- Sabor rico y cremoso.

40 - Buena fuente de fibra.

- Excelente fuente de vitaminas y minerales esenciales.

45 - Para dietas bajas en colesterol.

- Sin lactosa ni gluten.

50 Ingredientes:

Vainilla: -D agua; maltodextrina (maíz), azúcar (sacarosa), caseinatos de sodio y calcio, fibra de avena, aceite de cártamo rico en oleico, aceite de colza, aislado de proteína de soja, aceite de maíz, fibra de soja, fosfato de calcio tribásico, cloruro de magnesio, citrato de potasio, gel de celulosa, lecitina de soja, fosfato de potasio dibásico, citrato de sodio, aromas naturales y artificiales, cloruro de colina, fosfato de magnesio, ácido ascórbico, goma de celulosa, cloruro de potasio, carragenina, sulfato ferroso, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, niacinamida, sulfato de manganeso, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, palmitato de vitamina A, clorhidrato de cloruro de tiamina, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, ácido fólico, cloruro de cromo, biotina, molibdato de sodio, yoduro de potasio, selenato de sodio, filoquinona, vitamina D3 y cianocobalamina.

60 Proteína:

La fuente de proteína es una mezcla de dos proteínas de alto valor biológico -caseína y soja.

65 Caseinatos de sodio y calcio 80%

Aislado de proteína de soja 20%

ES 2 310 204 T3

Grasa:

La fuente de grasa es una mezcla de tres aceites: de cártamo rico en oleico, colza y maíz.

5	Aceite de cártamo rico en oleico	40%
	Aceite de colza	40%
	Aceite de maíz	20%

10

El nivel de grasa en ENSURE CON FIBRA cumple las directrices de la Asociación Americana del Corazón (AHA). Los 6 gramos de grasa en ENSURE CON FIBRA representan el 22% de las calorías totales, siendo el 2,01% de la grasa de ácidos grasos saturados y el 6,7% de ácidos grasos poliinsaturados. Estos valores están dentro de las directrices de la AHA de $\leq 30\%$ de calorías totales de la grasa, $< 10\%$ de las calorías de ácidos grasos saturados y $\leq 10\%$ de las calorías totales de ácidos grasos poliinsaturados.

15

Hidratos de carbono:

ENSURE CON FIBRA contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El dulzor moderado y la variedad de sabores (vainilla, chocolate y mantequilla de pacana) más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pacana, cereza, fresa, limón y naranja ayudan a evitar el cansancio del sabor y contribuyen a la conformidad del paciente.

20

Vainilla y otros sabores distintos de chocolate:

25	Maltodextrina	66%
	Sacarosa	25%
	Fibra de avena	7%
30	Fibra de soja	2%

35

Chocolate:

35	Maltodextrina 5	5%
	Sacarosa	36%
40	Fibra de avena	7%
	Fibra de soja	2%

45

Fibra:

La mezcla de fibra usada en ENSURE con fibra consiste en fibra de avena y polisacárido de soja. Esta mezcla da como resultado aproximadamente 4 gramos de fibra dietética total por lata de 8 onzas líquidas (236,588 ml). La proporción de fibra insoluble con respecto a soluble es de 95:5.

50

Los diversos complementos nutricionales descritos anteriormente y los conocidos por otros especialistas en la técnica pueden sustituirse y/o complementarse con los AGP producidos de acuerdo con la presente invención.

55 J. Producto nutricional Oxepa™

Oxepa es un producto nutricional enteral calóricamente denso y bajo en hidratos de carbono diseñado para el tratamiento dietético de pacientes con o en riesgo de ARDS. Tiene una combinación única de ingredientes que incluye una mezcla de aceites patentada que contiene ácido eicosapentaenoico (EPA de aceite de pescado), ácido γ -linolénico (GLA de aceite de borraja) y niveles de antioxidantes elevados.

60

Distribución calórica:

La densidad calórica es elevada a 1,5 cal/ml (355 cal/8 onzas líquidas (236,588 ml)) para minimizar el volumen necesario para satisfacer las necesidades energéticas. La distribución de calorías en Oxepa se muestra en la Tabla A.

65

ES 2 310 204 T3

Los ácidos grasos equivalen a aproximadamente el 95% de la grasa total

TABLA C

Perfil graso de Oxepa

5

10

15

20

% de calorías totales de la grasa	55,2
Ácidos grasos poliinsaturados	31,44 g/l
Ácidos grasos monoinsaturados	25,53 g/l
Ácidos grasos saturados	32,38 g/l
Proporción de n-6 con respecto a n-3	1,75:1
Colesterol	9,49 mg/8 onzas líquidas (235,588 ml)
	40,1 mg/l

Hidratos de carbono:

25

- El contenido de hidratos de carbono es de 25,0 g por porción de 8 onzas líquidas (105,5 g/l).

- Las fuentes de hidratos de carbono son maltodextrina (un hidrato de carbono complejo) al 45% y sacarosa (un azúcar sencillo) al 55%, digiriéndose y absorbiéndose ambas fácilmente.

30

- El contenido rico en grasa y bajo en hidratos de carbono de Oxepa está diseñado para minimizar la producción de dióxido de carbono (CO₂). Niveles elevados de CO₂ pueden complicar el destete en pacientes dependientes de ventilación. El bajo nivel de hidratos de carbono también puede ser útil para los pacientes que han desarrollado hiperglucemia inducida por estrés.

35

- Oxepa no contiene lactosa.

Los hidratos de carbono dietéticos, los aminoácidos de proteínas y los restos de glicerol de grasas pueden convertirse en glucosa dentro del cuerpo. Mediante este proceso, se satisfacen las necesidades de hidratos de carbono de tejidos dependientes de glucosa (tales como el sistema nervioso central y los glóbulos rojos). Sin embargo, una dieta sin hidratos de carbono puede conducir cetosis, un catabolismo excesivo de proteína tisular y pérdida de líquido y electrolitos. Estos efectos pueden evitarse mediante la ingesta diaria de 50 a 100 g de hidratos de carbono digeribles si la ingesta calórica es adecuada. El nivel de hidratos de carbono en Oxepa también es suficiente para minimizar la gluconeogénesis si se cumplen las necesidades energéticas.

45

Proteína:

- Oxepa contiene 14,8 g de proteína por porción de 8 onzas líquidas (62,5 g/l).

50

- La proporción de calorías totales/nitrógeno (150:1) satisface las necesidades de pacientes estresados.

- Oxepa proporciona suficiente proteína para promover el anabolismo y el mantenimiento de la masa corporal magra sin provocar problemas respiratorios. Ingestas proteicas elevadas suponen un problema en pacientes con una insuficiencia respiratoria. Aunque la proteína tiene un efecto escaso sobre la producción de CO₂, una dieta rica en proteínas aumentará el funcionamiento de la ventilación.

55

- Las fuentes de proteína de Oxepa son caseinato de sodio al 86,8% y caseinato de calcio al 13,2%.

60

- El perfil de aminoácidos del sistema de proteínas en Oxepa satisface o supera el patrón para proteína de alta calidad establecido por el National Academy of Sciences.

* Oxepa no contiene gluten.

65

ES 2 310 204 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una secuencia de nucleótidos aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad $\Delta 4$ -desaturasa, en la que la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido tiene una identidad de al menos el 70% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 46 y SEC ID N°: 55.
- 10 2. Una secuencia de nucleótidos aislada que comprende una secuencia nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una actividad $\Delta 4$ -desaturasa y que tiene una identidad de al menos el 70% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 36, SEC ID N°: 45 y SEC ID N°: 54.
- 15 3. La secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha secuencia codifica una $\Delta 4$ -desaturasa funcionalmente activa que utiliza un ácido graso monoinsaturado o poliinsaturado como sustrato.
- 20 4. La secuencia de nucleótidos de la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha secuencia procede de un organismo seleccionado del grupo constituido por un hongo y un alga.
- 25 5. La secuencia de nucleótidos de la reivindicación 4, en la que dicha secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 45 procede del hongo *Thraustochytrium aureum*, comprendiendo dicha secuencia la SEC ID N°: 36 que procede del hongo *Schizochytrium aggregatum* y comprendiendo dicha secuencia la SEC ID N°: 54 que procede del alga *Isochrysis galbana*.
- 30 6. Un polipéptido purificado que tiene actividad $\Delta 4$ -desaturasa codificado por dicha secuencia de nucleótidos de las reivindicaciones 1 ó 2.
- 35 7. Un polipéptido purificado que desatura ácidos grasos poliinsaturados en el carbono 4 y tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 70% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 46 y SEC ID N°: 55.
- 40 8. Un método de producción de una $\Delta 4$ -desaturasa que comprende las etapas de:
- 45 a) aislar una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos:
- 50 i) que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 70% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 46 y SEC ID N°: 55 o
- 55 ii) que tiene una identidad de al menos el 70% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 36 SEC ID N°: 45 y SEC ID N°: 54.
- 60 b) construir un vector que comprende: i) dicha secuencia de nucleótidos aislada unida operativamente a ii) un promotor;
- 65 c) introducir dicho vector en una célula hospedadora durante un tiempo y en condiciones suficientes para la expresión de dicha $\Delta 4$ -desaturasa.
9. Un vector que comprende:
- a) una secuencia de nucleótidos aislada que comprende una secuencia de nucleótidos:
- i) que codifica un polipéptido que tiene actividad $\Delta 4$ -desaturasa, teniendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 70% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 46 y SEC ID N°: 55 o
- ii) que codifica un polipéptido que tiene actividad $\Delta 4$ -desaturasa que tiene una identidad de al menos el 70% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 36, SEC ID N°: 45 y SEC ID N°: 54, unida operativamente a
- b) un promotor.
10. Una célula hospedadora que comprende dicho vector de la reivindicación 9.

ES 2 310 204 T3

11. Una célula vegetal, planta o tejido vegetal que comprende dicho vector de la reivindicación 9, en la que la expresión de dicha secuencia de nucleótidos de dicho vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado por dicha célula vegetal, planta o tejido vegetal.

5 12. La célula vegetal, planta o tejido vegetal de la reivindicación 11, en la que dicho ácido graso poliinsaturado se selecciona del grupo constituido por ácido ω 6-docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico.

13. Una planta transgénica que comprende dicho vector de la reivindicación 9, en la que la expresión de dicha secuencia de nucleótidos de dicho vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado en semillas de dicha planta transgénica.

14. Un método para la producción de un ácido graso poliinsaturado que comprende las etapas de:

a) aislar una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos:

15 i) que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 70% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 46 y SEC ID N°: 55 o

20 ii) que tiene una identidad de al menos el 70% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16 y SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 36, SEC ID N°: 45 y SEC ID N°: 54;

b) construir un vector que comprende dicha secuencia de nucleótidos aislada;

25 c) introducir dicho vector en una célula hospedadora durante un tiempo y en condiciones suficientes para la expresión de dicha Δ 4-desaturasa; y

30 d) exponer dicha Δ 4-desaturasa expresada a un ácido graso poliinsaturado sustrato para convertir dicho sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto.

35 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho ácido graso poliinsaturado sustrato es ácido adrenico o ácido ω 3-docosapentaenoico y dicho ácido graso poliinsaturado producto es ácido ω 6-docosapentaenoico o ácido docosahexaenoico, respectivamente.

40 16. El método de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende además la etapa de exponer dicho ácido graso poliinsaturado producto a una desaturasa para convertir dicho ácido graso poliinsaturado producto en otro ácido graso poliinsaturado.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho ácido graso poliinsaturado producto es ácido ω 6-docosapentaenoico y dicho otro ácido graso poliinsaturado es ácido docosahexaenoico.

18. Un método de producción de un ácido graso poliinsaturado que comprende las etapas de:

45 a) exponer un ácido graso poliinsaturado sustrato a una o más enzimas seleccionadas del grupo constituido por una desaturasa y una elongasa para convertir dicho sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto;

50 b) exponer dicho ácido graso poliinsaturado producto de la etapa (a) a una Δ 4-desaturasa que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 46 y SEC ID N°: 55, para convertir dicho ácido graso poliinsaturado producto en un ácido graso poliinsaturado producto final.

55 19. El método de la reivindicación 18, en el que dicho ácido graso poliinsaturado sustrato se selecciona del grupo constituido por ácido linoleico, ácido γ -linolénico, ácido estearidónico, ácido araquidónico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido eicosatetraenoico, ácido adrenico y ácido eicosapentaenoico.

60 20. El método de la reivindicación 18, en el que dicho ácido graso poliinsaturado producto final se selecciona del grupo constituido por ácido ω 6-docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico.

21. Una secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 1 que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad Δ 4-desaturasa, en la que la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido tiene una identidad de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 55.

65 22. Una secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 2, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad Δ 4-desaturasa y que tiene una identidad de al menos el 70% con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 54.

ES 2 310 204 T3

23. Un polipéptido purificado de la reivindicación 7, que desatura ácidos grasos poliinsaturados en el carbono 4 y tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 55.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

RUTA BIOSINTÉTICA DE ÁCIDOS GRASOS

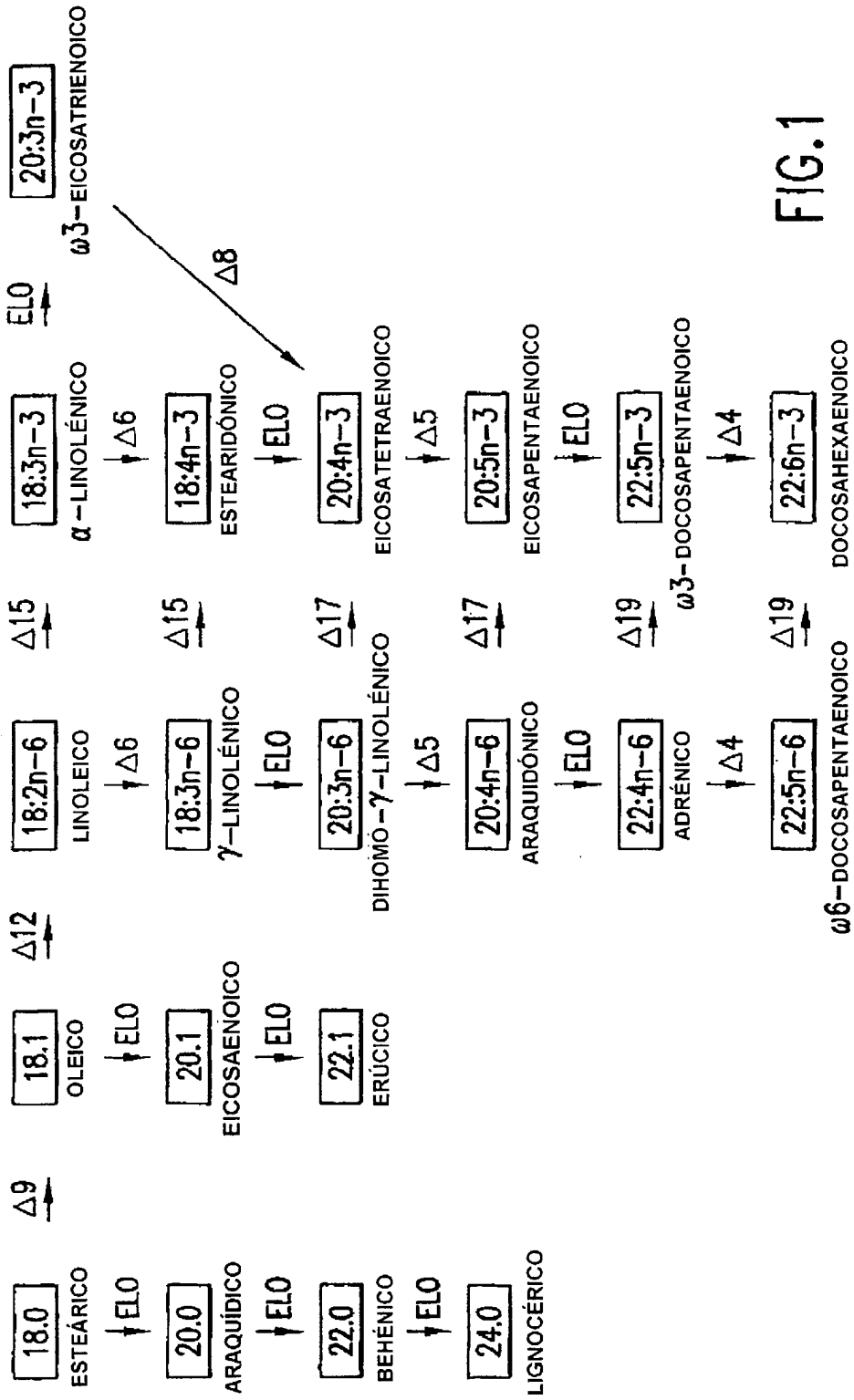


FIG.1

ES 2 310 204 T3

Comparación de aminoácidos de delta-4-desaturasas

	1				50
prta6	MTVGFDETVT	MDTVRNHNMP	DDAWCAIHGT	VYDITKFSKV	HPGGDIIMLA
prta8	MTVGFDETVT	MDTVRNHNMP	DDAWCAIHGT	VYDITKFSKV	HPGGDIIMLA
prta7	MTVGFDETVT	MDTVRNHNMP	DDAWCAIHGT	VYDITKFSKV	HPGGDIIMLA
prta5	MTVGFDETVT	MDTVRNHNMP	DDAWCAIHGT	VYDITKFSKV	HPGGDIIMLA
	51				100
prta6	AGKEATILFE	TYHIKGV PDA	VLRKYKVGKL	PQGKKGETSH	MPTGLDSAFY
prta8	AGKEATILFE	TYHIKGV PDA	VLRKYKVGKL	PQGKKGETSH	MPTGLDSASY
prta7	AGKEATILFE	TYHIKGV PDA	VLRKYKVGKL	PQGKKGETSH	MPTGLDSASY
prta5	AGKEATILFE	TYHIKGV PDA	VLRKYKVGKL	PQGKKGETSH	MPTGLDSASY
	101				150
prta6	YSWDSEFYRV	LRERVAKKLA	EPGLMQRARM	ELWAKAIFLL	AGFWGSLYAM
prta8	YSWDSEFYRV	LRERVAKKLA	EPGLMQRARM	ELWAKAIFLL	AGFWGSLYAM
prta7	YSWDSEFYRV	LRERVAKKLA	EPGLMQRARM	ELWAKAIFLL	AGFWGSLYAM
prta5	YSWDSEFYRV	LRERVAKKLA	EPGLMQRARM	ELWAKAIFLL	AGFWGSLYAM
	151				200
prta6	CVLDPHGGAM	VAAVTLGVFA	AFVGTICIQHD	GSHGAFSKSR	FMNKAAGWTL
prta8	CVLDPHGGAM	VAAVTLGVFA	AFVGTICIQHD	GSHGAFSKSR	FMNKAAGWTL
prta7	CVLDPHGGAM	VAAVTLGVFA	AFVGTICIQHD	GSHGAFSKSR	FMNKAAGWTL
prta5	CVLDPHGGAM	VAAVTLGVFA	AFVGTICIQHD	GSHGAFSKSR	FMNKAAGWTL
	201				250
prta6	DMIGASAMTW	EMQHVLGHP	YTNLIEMENG	LAKVKGADVD	PKKVDQESDP
prta8	DMIGASAMTW	EMQHVLGHP	YTNLIEMENG	LAKVKGADVD	PKKVDQESDP
prta7	DMIGASAMTW	EMQHVLGHP	YTNLIEMENG	LAKVKGADVD	PKKVDQESDP
prta5	DMIGASAMTW	EMQHVLGHP	YTNLIEMENG	LAKVKGADVD	PKKVDQESDP
	251				300
prta6	DVFSTYPMLR	LHPWHRQRFY	HKFQHLYAPF	IFGFMTINKV	ISQDVGVVLR
prta8	DVFSTYPMLR	LHPWHRQRFY	HKFQHLYAPF	IFGSMTINKV	ISQDVGVVLR
prta7	DVFSTYPMLR	LHPWHRQRFY	HKFQHLYAPL	IFGFMTINKV	ISQDVGVVLR
prta5	DVFSTYPMLR	LHPWHRQRFY	HKFQHLYAPF	IFGFMTINKV	ISQDVGVVLR

FIG.2A

ES 2 310 204 T3

Comparación de aminoácidos de delta-4-desaturasas

	301		350
prta6	KRLFQIDANC	RYGSPWYVAR	FWIMKLLTTL YMVALPMYMQ GPAQGLK L FF
prta8	KRLFQIDANC	RYGSPWYVAR	FWIMKLLTTL YMVALPMYMQ GPAQGLK L FF
prta7	KRLFQIDANC	RYGSPW N VAR	FWIMKLLTTL YMVALPMYMQ GPAQGLK L FF
prta5	KRLFQIDANC	RYGSPW Y VAR	FWIMKLLTTL Y I VALPMYMQ GPAQGLK L FF
	351		400
prta6	MAHFTCGEVL	ATMFIVNHII	EGVSYASKDA VKGVMAPPRT VHGVTPM Q VT
prta8	MAHFTCGEVL	ATMFIVNHII	EGVSYASKDA VKGVMAPPRT VHGVTPM Q VT
prta7	MAHFTCGEVL	ATMFIVNHII	EGVSYASKDA VKGVMAPPRT VHGVTPM Q VT
prta5	MAHFTCGEVL	ATMFIVNHII	EGVSYASKDA VKGVMAPPRT VHGVTPM Q VT
	401		450
prta6	QKALSAAEST	KSDADKTTMI	PLNDWAAVQC QTSVNWAVGS WFWNHFS G GL
prta8	QKALSAAE S A	KSDADKTTMI	PLNDWAAVQC QTSVNWAVGS WFWNHFS G GL
prta7	QKALSAAEST	KSDADKTTMI	PLNDWAAVQC QTSVNWAVGS WFWNHFS G GL
prta5	QKALSAAEST	KSDADKTTMI	PLNDWAAVQC QTSVNWAVGS WFWNHFS G GL
	451		500
prta6	NHQIEHHCFP	QNPHTVNVYI	SGIVKETCEE YGVPYQAEIS LFSAYFK M LS
prta8	NHQIEHHCFP	QNPHTVNVYI	SGIVKETCEE YGVPYQAEIS LFSAYFK M LS
prta7	NHQIEHHCFP	QNPHTVNVYI	SGIVKETCEE YGVPYQAEIS LFSAYFK M LS
prta5	NHQIEHHCFP	QNPHTVNVYI	SGIVKETCEE YGVPYQAEIS LFSAYFK M LS
	500		
prta6	HLRTLGNEDL	TAWST*	
prta8	HLRTLGNEDL	TAWST*	
prta7	HLRTLGNEDL	TAWST*	
prta5	HLRTLGNEDL	T A RST*	

FIG. 2B

Secuencia génica de la delta-4-desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) del plásmido pRTA5

```

atgacggtcg ggtttgacga aacggtgact atggacacgg tccgcaacca caacatgccg 60
gacgacgctt ggtgcgcgat ccacggcacc gtgtacgaca tcaccaagtt cagcaaggtg 120
caccctggcg gggacatcat catgctggcc gctggaagg aggccaccat cctgttcgag 180
acgtaccaca tcaagggcgt ccgggacgcg gtgctgcgca agtacaaggt cggcaagctc 240
ccccaggcca agaagggcga aacgagccac atgcccaccg ggctcgactc ggctcctac 300
tactcgtggg acagcgagtt ttacaggggt ctccgcgagc gcgtcgccaa gaagctggcc 360
gagccccggc tcatycagcg cgcgcgcgatg gagctctggg ccaaggcgat ctctctcctg 420
gcaggtttct gggctccct ttacgccatg tgcgtgctag acccgcacgg cggtgccatg 480
gtagccgccc tiacgctcgg cgtgttcgct gctttgctg gaacttgcac ccagcacgac 540
ggcagccacg ggccttctc caagtcgca ttcatgaaca aggcggcggg ctggaccctc 600
gacatgatcg gcgcgagcgc gatgacctgg gatatgcagc acgttcttgg ccaccacccc 660
tacaccaacc tcatcgagat ggagaacggt ttggccaagg tcaagggcgc cgacgtcgac 720
ccgaagaagg tcgaccagga gagsgacccg gacgtcttca gtacgtacct gatgcttcgc 780
ctgcaccctg ggcaccgcca gcggttttac cacaagtcc agcacctgta cgccccgttt 840
atctttgggt ttatgacgat taacaaggtg atttcccagg atgtcggggt tgtgctgcgc 900
aagcgcctgt tccagatcga cgcacaactgc cggtatggca gcccttggtg cgtggccccg 960
ttctggatca tgaagctcct caccacgctc tacacggtg cgtttcccat gtacatgcag 1020
gggcttgcctc agggctttaa gctttcttc atggcccact teacctgcgg agaggtcctc 1080
gccaccatgt ttattgtcaa ccaatcctc gagggcgtca gctacgcttc caaggacgcg 1140
gtcaagggcg tcatggctcc gccgcgact gtgcacggtg tcacccccgat gcaggtgacg 1200
caaaaggcgc tcaigtgcggc cgaigtgacc aagtgcgacg ccgacaagac gaccatgac 1260
cccccaacg actggggccgc tgtgcagtgc cagacctctg tgaactgggc tgtcgggctc 1320
tggttttgga accactttc gggcggcctc aaccaccaga ttgagcacca ctgcttcccc 1380
caaaacccc acacggtcaa cgtctacatc tcgggcatcg tcaaggagac ctgccaagaa 1440
tacggcgtgc cgtaccaggc tgagatcagc ctcttctcty cctatttcaa gatgctgtcg 1500
cacctccgca cgctcggcaa cgaggacctc acggccaggt ccacgtga 1548

```

FIG. 3

Secuencia génica de la delta-4-desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) del plásmido pRTA6

atgacggtcg ggtttgacga aacggtgact atggacacgg tccgcaacca caacatgccg 60
 gacgacgcct ggtgcgcgat ccacggcacc gtgtacgaca tcaccaagtt cagcaagggtg 120
 cacccccggc gggacatcat catgctggcc gctggcaagg aggccaccat cctgttccgag 180
 acgtaccaca tcaaggcgt tccggacgcg gtgtgcgca agtacaaggt cggcaagctc 240
 ccccaggga agaaggcga aacgagccac atgcccaccg ggctcgaact ggccttctac 300
 tactcgtggg acagcgagtt ttacagggtg ctccgcggc gcgtcgccaa gaagctggcc 360
 gagccccggc tcatgeagcg cgcgcgcgat gactctggg ccaagggat ctctcctctg 420
 gcaggttct ggggtccci ttacgccatg tgcgtgctag accgcacgg cggtgccatg 480
 gtagccgccc ttacgctcgg cgtgttcgct gccittgtcg gaacttgcac ccagcacgac 540
 ggcagccaag gcgcttctc caagtccga ttcatagaaca aggcggcggg ctggaccctc 600
 gacatgatcg gcgcgagcg gatgacctgg gagatgcagc acgttcttgg ccaccaccgg 660
 tacaccaacc tcatcgagat ggagaacggt ttggccaagg tcaaggcgc gcacgtcgac 720
 ccgaagaagg tcgaccagga gagcgacccg gacgtcttca gtactacc gccgtctcgc 780
 ctgcaccctg ggcaccgca gcggttttac caaagtcc agcaactga cgcctccgtt 840
 atctttgggt ttatgacgat taacaagggt atttcccagg atgtcgggt tgtgctgccc 900
 aagcgcctgt tccagatcga ccccaactgc cgttatggca gcccttggta cgtggccccg 960
 ttctggatca tgaagctct caccacgctc tacatgggtg cgttcccat gtacatgca 1020
 gggcctgctc aggccttga gctttcttc atggcccact tcacctgccc agaggctcctc 1080
 gccaccatgt ttattgtcaa ccaatcadc gagggcgta gctacgctc caaggacgcg 1140
 gtcaaggcgg tcatggctcc gccgcgcaact gtgcacggtg tcaccocgat gcaggtgacc 1200
 caaaaggcgc tcagtgccgc cgahtcgacc aagtcggacc ccgacaagac gaccatgac 1260
 cccctcaacg actgggccg tgtgcagtgc cagacctctg tgaactgggc gtcggggtcg 1320
 tggttttgga accactttc gggcgccctc aaccaccaga ttgagcaaca ctgcttcccc 1380
 caaaacccc acacggtcaa cgtctacatc tcaggcatcg tcaaggagac ctgccaagaa 1440
 tacggcgtgc cgtaccaggc tgaatcagc ctcttctctg cctatttcaa gatgctgtcg 1500
 cacctccgca cgctcggcaa cgaggaccctc acggcctggt ccacgtga 1548

FIG.4

Secuencia génica de la delta-4-desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) del plásmido pRTA7

```

60      atgacggtcg ggtttgacga aecggtgact atggacacgg tccgcaacca caacatgccg
120     gacgagcct ggtgcgcgat ccacggcacc gtgtacgaca tcaccaagtt cagcaagggtg
180     caccocggcg gggacateat catgctggcc gctggcaagg aggccaccat cctgttcgag
240     acctaceaca tcaagggegt cccggacgcg gtgctgca agtacaaggt cggcaagctc
300     ccccagggca agaagggega aecgagccac atgccaccg ggctgactc ggcctcctac
360     tactctggg acagcgagtt ttaeagggtg ctccggagc gcgtcgccaa gaagctggcc
420     gagccggcc tcatgcagcg cgcgcgcatg gagctctggg ccaaggcgat ctctcctctg
480     gcaggtttct ggggctcctt ttaegccatg tgcgtgctag acccgcacgg cggtgccatg
540     gtagccgccc ttaegctcgg cgtgttcgct gcctttgctg gaacttgcac ccagcacgac
600     ggcagccacg gcgccttctc caagtcgca ttcataaaca aggcggcggg ctggaccctc
660     gacatgatcg gcgagagcgc gatgacctgg gagatgcagc acgttcttgg teaccacccg
720     tacaccaacc tcatcgagat ggagaacggt ttggccaagg tcaagggcgc cgacgtcgac
780     ccgaagaagg tcgaccagga gacgacccc gacgtctca gtaacttccc gatgcttcgc
840     ctgcaccctg ggcaccgcca gcggttttac cacaagttcc agcacctgta cgccccgctt
900     atctttgggt ttatgacgat taacaaggtg atttccagg atgtcgggggt tgtgctgccc
960     aagcgcctgt tccagatcga cgccaactgc cggtatggca gcccttgaa cgtggcccgc
1020    ttctggatca tgaagctcct caccacgctc tacatgggtg cgcttcccat gtacatgcag
1080    gggcctgctc agggcttgaa gcttttctc atggcccact tcaactgggg agaggtcctc
1140    gccaccatgt ttattgtcaa ccacatcacc gagggcgta gctacgcttc caaggacgcg
1200    gtcaagggcg tcattggctcc gccgcgact gtgcaaggtg tcaccccgat gcaggtgacg
1260    caaaaggcgc tcagtgcggc cgagtcgacc aagtcggacg ccgacaagac gaccatgac
1320    cccctcaacg actggggccg tgtgagtgcc gagacctctg tgaactgggc tgtcgggtcg
1380    tggttttgga accactttc gggcggccta aaccaccaga ttgagcacca ctgcttcccc
1440    caaaaccccc acacggtcaa cgtctacatc tcgggcatcg tcaaggagac ctgccaagaa
1500    tacggcgtgc cgtaccaggc tgagatcagc ctcttctctg cctatttcaa gatgctgtcy
1548    cacctccgca cgctcggcaa cgaggacctc acggctcgtt ccacgtga

```

FIG.5

Secuencia génica de la delta-4-desaturasa de *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) del plásmido pRTA8

```

atgacgtcg ggttgacga aacggtgact atggacacgg tccgaacca caacatgccg 60
gacgacgct ggtgcgcat ccacggcacc gtgtacgaca tcaccaagt cagcaaggtg 120
caccctggcg gggacatcat catgctggcc gctggcaagg aggccaccat cctgttctgag 180
acctaccaca tcaagggcgt cccggaacgg gtgctgcga agtacagggt cggcaagctc 240
ccccaggaca agaagggcga aacgagccac atgcccaccg ggctcgaact ggctctctac 300
tactcgtggg acagcgagtt ttacaggtg ctcgcgagc gcgtcgcaa gaagctggcc 360
gagccccgcc tcatgcagcg cgcgcgcatg gagctctggg ccaaggcgat ctctctctcg 420
gcaggtttct ggggtccct ttacgceatg tgcgtgctag acccgcacgg cggtgccatg 480
gtagcccgcg ttacgctcgg cgtgttcgct gcctttgtcg gaacttgcac ccagcacgac 540
ggcagccacg gcgcttctc caagtccga tteatgaaca aggcggcggg ctggaccctc 600
gacatgatcg gcgcgagtc gatgacctgg gagatgcagc acgttcttgg ccaccaccgg 660
tacaccaacc tcatcgagat ggagaacggt ttggccaagg tcaaggggcg cgactcggac 720
ccgaagaagg tcgaccagga gagcagccc gagctctca gtacgfracc gatgcttcgc 780
ctgcaccctg ggcaccgcca gcggttttac cacaagtcc agcacctgta cgcctccgtt 840
atctttgggt ctatgacgat taacaaggtg atttcccagg atgtcggggt tgtgctgcgc 900
aagcgcctgt tccagatcga cggcaactgc cggtatggca gcccttgta cgtggccccg 960
ttctggatca tgaagctcct caccacgctc tacatggtgg cgttcccat gtacatgcag 1020
gggcctgctc agggcttga gcttttctc atggcccact tcacctgagg agaggtcctc 1080
gccaccatgt ttattgtcaa ccacatcacc gagggcgta gctacgcttc caaggacgcg 1140
gtcaagggcg tcatggctcc gccgcgact gtcacaggtg tcaccccgat gcaggtgacg 1200
caaaaggcgc tcagtgggc cgagtcggcc aagtcggacg ccgacaagac gacctgac 1260
ccctcaacg actgggcccg tgtgcagtcg cagacctctg tgaactgggc tgtcgggtcg 1320
tggttttgga accactttc gggcggcctc aaccaccaga ttgagcaca ctgcttcccc 1380
caaaaccccc acacggtcaa cgtctacatc tcgggcatcg tcaaggagac ctgcgaagaa 1440
tacggcgtcg cgtaccaggc tgagatcag cctctctctg cctatttcaa gatgctgtcg 1500
cactccgca cgctcggcaa cgaggacctc acggcctggt ccacgtga 1548

```

FIG.6

Secuencia génica de la delta-4-desaturasa de *Thraustochytrium aureum*
(ATCC 34304) del plásmido pRTA5

Met	Thr	Val	Gly	Phe	Asp	Glu	Thr	Val	Thr	Met	Asp	Thr	Val	Arg	Asn
1				5					10					15	
His	Asn	Met	Pro	Asp	Asp	Ala	Trp	Cys	Ala	Ile	His	Gly	Thr	Val	Tyr
			20					25					30		
Asp	Ile	Thr	Lys	Phe	Ser	Lys	Val	His	Pro	Gly	Gly	Asp	Ile	Ile	Met
		35					40					45			
Leu	Ala	Ala	Gly	Lys	Glu	Ala	Thr	Ile	Leu	Phe	Glu	Thr	Tyr	His	Ile
							55				60				
Lys	Gly	Val	Pro	Asp	Ala	Val	Leu	Arg	Lys	Tyr	Lys	Val	Gly	Lys	Leu
65					70					75					80
Pro	Gln	Gly	Lys	Lys	Gly	Glu	Thr	Ser	His	Met	Pro	Thr	Gly	Leu	Asp
				85					90						95
Ser	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Trp	Asp	Ser	Glu	Phe	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg
			100					105					110		
Glu	Arg	Val	Ala	Lys	Lys	Leu	Ala	Glu	Pro	Gly	Leu	Met	Gln	Arg	Ala
			115				120					125			
Arg	Met	Glu	Leu	Trp	Ala	Lys	Ala	Ile	Phe	Leu	Leu	Ala	Gly	Phe	Trp
						135						140			
Gly	Ser	Leu	Tyr	Ala	Met	Cys	Val	Leu	Asp	Pro	His	Gly	Gly	Ala	Met
145					150					155					160
Val	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Gly	Val	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	Cys
				165					170						175
Ile	Gln	His	Asp	Gly	Ser	His	Gly	Ala	Phe	Ser	Lys	Ser	Arg	Phe	Met
			180					185					190		
Asn	Lys	Ala	Ala	Gly	Trp	Thr	Leu	Asp	Met	Ile	Gly	Ala	Ser	Ala	Met
		195					200					205			
Thr	Trp	Glu	Met	Gln	His	Val	Leu	Gly	His	His	Pro	Tyr	Thr	Asn	Leu
		210				215					220				
Ile	Glu	Met	Glu	Asn	Gly	Leu	Ala	Lys	Val	Lys	Gly	Ala	Asp	Val	Asp
225					230					235					240
Pro	Lys	Lys	Val	Asp	Gln	Glu	Ser	Asp	Pro	Asp	Val	Phe	Ser	Thr	Tyr
				245					250					255	
Pro	Met	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Trp	His	Arg	Gln	Arg	Phe	Tyr	His	Lys
			260					265					270		
Phe	Gln	His	Leu	Tyr	Ala	Pro	Phe	Ile	Phe	Gly	Phe	Met	Thr	Ile	Asn
		275					280					285			
Lys	Val	Ile	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	Val	Val	Leu	Arg	Lys	Arg	Leu	Phe
		290				295					300				
Gln	Ile	Asp	Ala	Asn	Cys	Arg	Tyr	Gly	Ser	Pro	Trp	Tyr	Val	Ala	Arg
305					310					315					320
Phe	Trp	Ile	Met	Lys	Leu	Leu	Thr	Thr	Leu	Tyr	Thr	Val	Ala	Leu	Pro
				325					330					335	
Met	Tyr	Met	Gln	Gly	Pro	Ala	Gln	Gly	Leu	Lys	Leu	Phe	Phe	Met	Ala
			340					345					350		

FIG.7A

His	Phe	Thr	Cys	Gly	Glu	Val	Leu	Ala	Thr	Met	Phe	Ile	Val	Asn	His
		355					360					365			
Ile	Ile	Glu	Gly	Val	Ser	Tyr	Ala	Ser	Lys	Asp	Ala	Val	Lys	Gly	Val
	370					375					380				
Met	Ala	Pro	Pro	Arg	Thr	Val	His	Gly	Val	Thr	Pro	Met	Gln	Val	Thr
385					390					395					400
Gln	Lys	Ala	Leu	Ser	Ala	Ala	Glu	Ser	Thr	Lys	Ser	Asp	Ala	Asp	Lys
			405						410					415	
Thr	Thr	Met	Ile	Pro	Leu	Asn	Asp	Trp	Ala	Ala	Val	Gln	Cys	Gln	Thr
		420					425					430			
Ser	Val	Asn	Trp	Ala	Val	Gly	Ser	Trp	Phe	Trp	Asn	His	Phe	Ser	Gly
		435					440				445				
Gly	Leu	Asn	His	Gln	Ile	Glu	His	His	Cys	Phe	Pro	Gln	Asn	Pro	His
	450					455					460				
Thr	Val	Asn	Val	Tyr	Ile	Ser	Gly	Ile	Val	Lys	Glu	Thr	Cys	Glu	Glu
465					470					475					480
Tyr	Gly	Val	Pro	Tyr	Gln	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	Phe	Ser	Ala	Tyr	Phe
				485					490					495	
Lys	Met	Leu	Ser	His	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Asn	Glu	Asp	Leu	Thr	Ala
			500					505					510		
Arg	Ser	Thr													
		515													

FIG.7B

Secuencia génica de la delta-4-desaturasa de *Thraustochytrium aureum*
(ATCC 34304) del plásmido pRTA6

Met	Thr	Val	Gly	Phe	Asp	Glu	Thr	Val	Thr	Met	Asp	Thr	Val	Arg	Asn
1				5					10					15	
His	Asn	Met	Pro	Asp	Asp	Ala	Trp	Cys	Ala	Ile	His	Gly	Thr	Val	Tyr
			20					25					30		
Asp	Ile	Thr	Lys	Phe	Ser	Lys	Val	His	Pro	Gly	Gly	Asp	Ile	Ile	Met
		35					40					45			
Leu	Ala	Ala	Gly	Lys	Glu	Ala	Thr	Ile	Leu	Phe	Glu	Thr	Tyr	His	Ile
	50					55					60				
Lys	Gly	Val	Pro	Asp	Ala	Val	Leu	Arg	Lys	Tyr	Lys	Val	Gly	Lys	Leu
65					70					75					80
Pro	Gln	Gly	Lys	Lys	Gly	Glu	Thr	Ser	His	Met	Pro	Thr	Gly	Leu	Asp
				85					90					95	
Ser	Ala	Phe	Tyr	Tyr	Ser	Trp	Asp	Ser	Glu	Phe	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg
			100					105					110		
Glu	Arg	Val	Ala	Lys	Lys	Leu	Ala	Glu	Pro	Gly	Leu	Met	Gln	Arg	Ala
		115					120					125			
Arg	Met	Glu	Leu	Trp	Ala	Lys	Ala	Ile	Phe	Leu	Leu	Ala	Gly	Phe	Trp
	130					135					140				
Gly	Ser	Leu	Tyr	Ala	Met	Cys	Val	Leu	Asp	Pro	His	Gly	Gly	Ala	Met
145					150					155					160
Val	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Gly	Val	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	Cys
				165					170					175	
Ile	Gln	His	Asp	Gly	Ser	His	Gly	Ala	Phe	Ser	Lys	Ser	Arg	Phe	Met
			180					185					190		
Asn	Lys	Ala	Ala	Gly	Trp	Thr	Leu	Asp	Met	Ile	Gly	Ala	Ser	Ala	Met
		195					200					205			
Thr	Trp	Glu	Met	Gln	His	Val	Leu	Gly	His	His	Pro	Tyr	Thr	Asn	Leu
	210					215					220				
Ile	Glu	Met	Glu	Asn	Gly	Leu	Ala	Lys	Val	Lys	Gly	Ala	Asp	Val	Asp
225					230					235					240
Pro	Lys	Lys	Val	Asp	Gln	Glu	Ser	Asp	Pro	Asp	Val	Phe	Ser	Thr	Tyr
				245					250					255	
Pro	Met	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Trp	His	Arg	Gln	Arg	Phe	Tyr	His	Lys
			260					265					270		
Phe	Gln	His	Leu	Tyr	Ala	Pro	Phe	Ile	Phe	Gly	Phe	Met	Thr	Ile	Asn
		275					280					285			
Lys	Val	Ile	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	Val	Val	Leu	Arg	Lys	Arg	Leu	Phe
	290					295				300					
Gln	Ile	Asp	Ala	Asn	Cys	Arg	Tyr	Gly	Ser	Pro	Trp	Tyr	Val	Ala	Arg
305					310					315					320
Phe	Trp	Ile	Met	Lys	Leu	Leu	Thr	Thr	Leu	Tyr	Met	Val	Ala	Leu	Pro
				325					330					335	
Met	Tyr	Met	Gln	Gly	Pro	Ala	Gln	Gly	Leu	Lys	Leu	Phe	Phe	Met	Ala
			340					345					350		

FIG.8A

His	Phe	Thr	Cys	Gly	Glu	Val	Leu	Ala	Thr	Met	Phe	Ile	Val	Asn	His
		355					360					365			
Ile	Ile	Glu	Gly	Val	Ser	Tyr	Ala	Ser	Lys	Asp	Ala	Val	Lys	Gly	Val
	370					375					380				
Met	Ala	Pro	Pro	Arg	Thr	Val	His	Gly	Val	Thr	Pro	Met	Gln	Val	Thr
385					390					395					400
Gln	Lys	Ala	Leu	Ser	Ala	Ala	Glu	Ser	Thr	Lys	Ser	Asp	Ala	Asp	Lys
				405					410					415	
Thr	Thr	Met	Ile	Pro	Leu	Asn	Asp	Trp	Ala	Ala	Val	Gln	Cys	Gln	Thr
			420					425					430		
Ser	Val	Asn	Trp	Ala	Val	Gly	Ser	Trp	Phe	Trp	Asn	His	Phe	Ser	Gly
		435					440					445			
Gly	Leu	Asn	His	Gln	Ile	Glu	His	His	Cys	Phe	Pro	Gln	Asn	Pro	His
	450					455					460				
Thr	Val	Asn	Val	Tyr	Ile	Ser	Gly	Ile	Val	Lys	Glu	Thr	Cys	Glu	Glu
465					470					475					480
Tyr	Gly	Val	Pro	Tyr	Gln	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	Phe	Ser	Ala	Tyr	Phe
				485					490					495	
Lys	Met	Leu	Ser	His	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Asn	Glu	Asp	Leu	Thr	Ala
			500					505					510		
Trp	Ser	Thr													
		515													

FIG.8B

ES 2 310 204 T3

Secuencia génica de la delta-4-desaturasa de *Thraustochytrium aureum*
(ATCC 34304) del plásmido pRTA7

Met	Thr	Val	Gly	Phe	Asp	Glu	Thr	Val	Thr	Met	Asp	Thr	Val	Arg	Asn
1				5					10					15	
His	Asn	Met	Pro	Asp	Asp	Ala	Trp	Cys	Ala	Ile	His	Gly	Thr	Val	Tyr
			20					25					30		
Asp	Ile	Thr	Lys	Phe	Ser	Lys	Val	His	Pro	Gly	Gly	Asp	Ile	Ile	Met
	35						40					45			
Leu	Ala	Ala	Gly	Lys	Glu	Ala	Thr	Ile	Leu	Phe	Glu	Thr	Tyr	His	Ile
	50					55					60				
Lys	Gly	Val	Pro	Asp	Ala	Val	Leu	Arg	Lys	Tyr	Lys	Val	Gly	Lys	Leu
65					70					75					80
Pro	Gln	Gly	Lys	Lys	Gly	Glu	Thr	Ser	His	Met	Pro	Thr	Gly	Leu	Asp
				85					90					95	
Ser	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Trp	Asp	Ser	Glu	Phe	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg
			100					105					110		
Glu	Arg	Val	Ala	Lys	Lys	Leu	Ala	Glu	Pro	Gly	Leu	Met	Gln	Arg	Ala
		115					120					125			
Arg	Met	Glu	Leu	Trp	Ala	Lys	Ala	Ile	Phe	Leu	Leu	Ala	Gly	Phe	Trp
	130					135						140			
Gly	Ser	Leu	Tyr	Ala	Met	Cys	Val	Leu	Asp	Pro	His	Gly	Gly	Ala	Met
145					150					155					160
Val	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Gly	Val	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	Cys
				165					170					175	
Ile	Gln	His	Asp	Gly	Ser	His	Gly	Ala	Phe	Ser	Lys	Ser	Arg	Phe	Met
			180					185					190		
Asn	Lys	Ala	Ala	Gly	Trp	Thr	Leu	Asp	Met	Ile	Gly	Ala	Ser	Ala	Met
		195					200					205			
Thr	Trp	Glu	Met	Gln	His	Val	Leu	Gly	His	His	Pro	Tyr	Thr	Asn	Leu
	210					215					220				
Ile	Glu	Met	Glu	Asn	Gly	Leu	Ala	Lys	Val	Lys	Gly	Ala	Asp	Val	Asp
225					230					235					240
Pro	Lys	Lys	Val	Asp	Gln	Glu	Ser	Asp	Pro	Asp	Val	Phe	Ser	Thr	Tyr
				245					250					255	
Pro	Met	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Trp	His	Arg	Gln	Arg	Phe	Tyr	His	Lys
			260					265					270		
Phe	Gln	His	Leu	Tyr	Ala	Pro	Leu	Ile	Phe	Gly	Phe	Met	Thr	Ile	Asn
		275					280					285			
Lys	Val	Ile	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	Val	Val	Leu	Arg	Lys	Arg	Leu	Phe
	290					295					300				
Gln	Ile	Asp	Ala	Asn	Cys	Arg	Tyr	Gly	Ser	Pro	Trp	Asn	Val	Ala	Arg
305					310					315					320
Phe	Trp	Ile	Met	Lys	Leu	Leu	Thr	Thr	Leu	Tyr	Met	Val	Ala	Leu	Pro
				325					330					335	
Met	Tyr	Met	Gln	Gly	Pro	Ala	Gln	Gly	Leu	Lys	Leu	Phe	Phe	Met	Ala
			340					345						350	

FIG.9A

His	Phe	Thr	Cys	Gly	Glu	Val	Leu	Ala	Thr	Met	Phe	Ile	Val	Asn	His
		355					360					365			
Ile	Ile	Glu	Gly	Val	Ser	Tyr	Ala	Ser	Lys	Asp	Ala	Val	Lys	Gly	Val
370						375				380					
Met	Ala	Pro	Pro	Arg	Thr	Val	His	Gly	Val	Thr	Pro	Met	Gln	Val	Thr
385					390					395					400
Gln	Lys	Ala	Leu	Ser	Ala	Ala	Glu	Ser	Thr	Lys	Ser	Asp	Ala	Asp	Lys
			405						410					415	
Thr	Thr	Met	Ile	Pro	Leu	Asn	Asp	Trp	Ala	Ala	Val	Gln	Cys	Gln	Thr
		420						425					430		
Ser	Val	Asn	Trp	Ala	Val	Gly	Ser	Trp	Phe	Trp	Asn	His	Phe	Ser	Gly
		435					440					445			
Gly	Leu	Asn	His	Gln	Ile	Glu	His	His	Cys	Phe	Pro	Gln	Asn	Pro	His
450						455					460				
Thr	Val	Asn	Val	Tyr	Ile	Ser	Gly	Ile	Val	Lys	Glu	Thr	Cys	Glu	Glu
465					470					475					480
Tyr	Gly	Val	Pro	Tyr	Gln	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	Phe	Ser	Ala	Tyr	Phe
				485					490					495	
Lys	Met	Leu	Ser	His	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Asn	Glu	Asp	Leu	Thr	Ala
			500					505						510	
Trp	Ser	Thr													
		515													

FIG.9B

Secuencia génica de la delta-4-desaturasa de *Thraustochytrium aureum*
(ATCC 34304) del plásmido pRTA8

Met	Thr	Val	Gly	Phe	Asp	Glu	Thr	Val	Thr	Met	Asp	Thr	Val	Arg	Asn
1				5					10					15	
His	Asn	Met	Pro	Asp	Asp	Ala	Trp	Cys	Ala	Ile	His	Gly	Thr	Val	Tyr
			20					25					30		
Asp	Ile	Thr	Lys	Phe	Ser	Lys	Val	His	Pro	Gly	Gly	Asp	Ile	Ile	Met
	35						40					45			
Leu	Ala	Ala	Gly	Lys	Glu	Ala	Thr	Ile	Leu	Phe	Glu	Thr	Tyr	His	Ile
	50					55					60				
Lys	Gly	Val	Pro	Asp	Ala	Val	Leu	Arg	Lys	Tyr	Lys	Val	Gly	Lys	Leu
65					70					75					80
Pro	Gln	Gly	Lys	Lys	Gly	Glu	Thr	Ser	His	Met	Pro	Thr	Gly	Leu	Asp
				85					90					95	
Ser	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Trp	Asp	Ser	Glu	Phe	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg
			100					105					110		
Glu	Arg	Val	Ala	Lys	Lys	Leu	Ala	Glu	Pro	Gly	Leu	Met	Gln	Arg	Ala
		115					120					125			
Arg	Met	Glu	Leu	Trp	Ala	Lys	Ala	Ile	Phe	Leu	Leu	Ala	Gly	Phe	Trp
	130					135						140			
Gly	Ser	Leu	Tyr	Ala	Met	Cys	Val	Leu	Asp	Pro	His	Gly	Gly	Ala	Met
145					150					155					160
Val	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Gly	Val	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	Cys
				165				170						175	
Ile	Gln	His	Asp	Gly	Ser	His	Gly	Ala	Phe	Ser	Lys	Ser	Arg	Phe	Met
			180					185					190		
Asn	Lys	Ala	Ala	Gly	Trp	Thr	Leu	Asp	Met	Ile	Gly	Ala	Ser	Ala	Met
		195					200					205			
Thr	Trp	Glu	Met	Gln	His	Val	Leu	Gly	His	His	Pro	Tyr	Thr	Asn	Leu
	210					215					220				
Ile	Glu	Met	Glu	Asn	Gly	Leu	Ala	Lys	Val	Lys	Gly	Ala	Asp	Val	Asp
225					230					235					240
Pro	Lys	Lys	Val	Asp	Gln	Glu	Ser	Asp	Pro	Asp	Val	Phe	Ser	Thr	Tyr
				245					250					255	
Pro	Met	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Trp	His	Arg	Gln	Arg	Phe	Tyr	His	Lys
			260					265					270		
Phe	Gln	His	Leu	Tyr	Ala	Pro	Phe	Ile	Phe	Gly	Ser	Met	Thr	Ile	Asn
		275				280						285			
Lys	Val	Ile	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	Val	Val	Leu	Arg	Lys	Arg	Leu	Phe
	290					295					300				
Gln	Ile	Asp	Ala	Asn	Cys	Arg	Tyr	Gly	Ser	Pro	Trp	Tyr	Val	Ala	Arg
305					310					315					320
Phe	Trp	Ile	Met	Lys	Leu	Leu	Thr	Thr	Leu	Tyr	Met	Val	Ala	Leu	Pro
				325					330					335	
Met	Tyr	Met	Gln	Gly	Pro	Ala	Gln	Gly	Leu	Lys	Leu	Phe	Phe	Met	Ala
			340					345						350	

FIG. 10A

His	Phe	Thr	Cys	Gly	Glu	Val	Leu	Ala	Thr	Met	Phe	Ile	Val	Asn	His
		355					360					365			
Ile	Ile	Glu	Gly	Val	Ser	Tyr	Ala	Ser	Lys	Asp	Ala	Val	Lys	Gly	Val
370						375				380					
Met	Ala	Pro	Pro	Arg	Thr	Val	His	Gly	Val	Thr	Pro	Met	Gln	Val	Thr
385					390					395					400
Gln	Lys	Ala	Leu	Ser	Ala	Ala	Glu	Ser	Ala	Lys	Ser	Asp	Ala	Asp	Lys
				405					410					415	
Thr	Thr	Met	Ile	Pro	Leu	Asn	Asp	Trp	Ala	Ala	Val	Gln	Cys	Gln	Thr
			420					425					430		
Ser	Val	Asn	Trp	Ala	Val	Gly	Ser	Trp	Phe	Trp	Asn	His	Phe	Ser	Gly
		435					440					445			
Gly	Leu	Asn	His	Gln	Ile	Glu	His	His	Cys	Phe	Pro	Gln	Asn	Pro	His
450						455					460				
Thr	Val	Asn	Val	Tyr	Ile	Ser	Gly	Ile	Val	Lys	Glu	Thr	Cys	Glu	Glu
465					470					475					480
Tyr	Gly	Val	Pro	Tyr	Gln	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	Phe	Ser	Ala	Tyr	Phe
				485					490					495	
Lys	Met	Leu	Ser	His	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Asn	Glu	Asp	Leu	Thr	Ala
			500					505					510		
Trp	Ser	Thr													
		515													

FIG. 10B

ES 2 310 204 T3

SECUENCIA ID N°: 1

5' -GTBTAYGAYGTBACCGARTGGGTBAAGCGYCAVCCBGGHGGH-3'

SECUENCIA ID N°: 2

5' -GGHGCTCCGCYAACTGGTGAAGCAYCAGCAYAACGTBCAYCAY-3'

SECUENCIA ID N°: 3

5' -RTGRTGVACGTTTGTGCTGRTGCTTCCACCAGTTTGGCGGARGCDCC-3'

SECUENCIA ID N°: 4

5' -TTGATRGCTARCTYGTGTRGASAAAGGVTGGTAC-3'

SECUENCIA ID N°: 5

5' -CATCATCATXGGRAAXARRTGRTG-3'

SECUENCIA ID N° 6

5' -CTACTACTACTACAYCAYACXTAYACXAAY-3'

SECUENCIA ID N°: 7

5' -CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG-3'

SECUENCIA ID N°: 8

5' -GACGATTAACAAGGTGATTTCCAGGATGTC

SECUENCIA ID N°: 9

5' -GACTAACTCGAGTCACGTGGACCAGGCCGTGAGGTCCT

FIG.11A

ES 2 310 204 T3

SECUENCIA ID N°: 10

GACTAACTCGAGTTGACGAGGTTTGTATGTTGCGCGGTTTGCTTG-3'

SECUENCIA ID N°: 11

5' -AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC-3'

SECUENCIA ID N°: 12

TGGCTACCGTCGTGCTGGATGCAAGTTCCG-3'

SECUENCIA ID N°: 13

5' -CGCATGGAATTCATGACGGTCGGGTTTGACGAAACGGTG-3'

SECUENCIA ID N°: 14

1 ATGACGGTCG GGTTTGACGA AACGGTACT ATGGACACGG TCCGCAACCA
51 CAACATGCCG GACGACGCCT GGTGCGCGAT CCACGGCACC GTGTACGACA
101 TCACCAAGTT CAGCAAGGTG CACCCCGGCG GGGACATCAT CATGCTGGCC
151 GCTGGCAAGG AGGCCACCAT CCTGTTGAG ACGTACCACA TCAAGGGCGT
201 CCCGGACGCG GTGCTGCGCA AGTACAAGET CGGCAAGCTC CCCAGGGCA
251 AGAAGGGCGA AACGAGCCAC ATGCCACCG GGCTCGACTC GGCCTCCTAC
301 TACTCGTGGG ACAGCGAGTT TTACAGGGTG CTCCGCGAGC GCGTCGCCAA
351 GAAGCTGGCC GAGCCCGGCC TCATGCAGCG CGCGCGCATG GAGCTCTGGG
401 CCAAGGCGAT CTTCTCCTG GCAGGTTTCT GGGGCTCCCT TTACGCCATG
451 TGCGTGCTAG ACCCGCACGG CGGTGCCATG GTAGCCGCCG TTACGCTCGG
501 CGTGTTCGCT GCCTTTGTCG GAACTTGCAT CCAGCACGAC GGCAGCCACG
551 GCGCCTTCTC CAAGTCGCGA TTCATGAACA AGGCGGCGGG CTGGACCCTC
601 GACATGATCG GCGCGAGCGC GATGACCTGG GAGATGCAGC ACGTTCTTGG
651 CCACCACCG TACACCAACC TCATCGAGAT GGAGAACGGT TTGGCCAAGG
701 TCAAGGGCGC CGACGTCGAC CCGAAGAAGG TCGACCAGGA GAGCGACCGG
751 GACGTCTTCA GTACGTACCC GATGCTTCGC CTGCACCCGT GGCACCGCCA
801 GCGGTTTTAC CACAAGTTCC AGCACCTGTA CGCCCCGTTT ATCTTTGGGT
851 TTATGACGAT TAACAAGGTG ATTTCCAGG ATGTCGGGGT TGTGCTGCGC
901 AAGCGCCTGT TCCAGATCGA CGCCAACTGC CGGTATGGCA GCCCCTGGTA
951 CGTGGCCCGC TTCTGGATCA TGAAGTCCT CACCACGCTC TACACGGTGG
1001 CGTTCCCAT GTACATGCAG GGGCCTGCTC AGGGCTTGAA GCTTTTCTTC
1051 ATGGCCCACT TCACCTGCGG AGAGGTCTC GCCACCATGT TTATTGTCAA

FIG. 11B

ES 2 310 204 T3

1101 CCACATCATC GAGGGCGTCA GCTACGCTTC CAAGGACGCG GTCAAGGGCG
 1151 TCATGGCTCC GCCGCGCACT GTGCACGGTG TCACCCCGAT GCAGGTGACG
 1201 CAAAAGGCGC TCAGTGCGGC CGAGTCGACC AAGTCGGACG CCGACAAGAC
 1251 GACCATGATC CCCCTCAACG ACTGGGCCGC TGTGCAGTGC CAGACCTCTG
 1301 TGAACTGGGC TGTCGGGTCG TGGTTTTGGA ACCACTTTTC GGGCGGCCTC
 1351 AACCACCAGA TTGAGCACCA CTGCTTCCCC CAAAACCCCC ACACGGTCAA
 1401 CGTCTACATC TCGGGCATCG TCAAGGAGAC CTGCGAAGAA TACGGCGTGC
 1451 CGTACCAGGC TGAGATCAGC CTCTTCTCTG CCTATTTCAA GATGCTGTGC
 1501 CACCTCCGCA CGCTCGGCAA CGAGGACCTC ACGGCCAGGT CCACGTGA

SECUENCIA ID N°: 15

1 ATGACGGTCC GGTTTGACGA AACGGTGACT ATGGACACGG TCCGCAACCA
 51 TAACATGCCG GACGACGCCT GGTGCGCGAT CCACGGCACC GTGTACGACA
 101 TCACCAAGTT CAGCAAGGTG CACCCCGGCG GGGACATCAT CATGCTGGCC
 151 GCTGGCAAGG AGGCCACCAT CCTGTTCGAG ACGTACCACA TCAAGGGCGT
 201 CCCGGACGCG GTGCTGCGCA AGTACAAGGT CGGCAAGCTC CCCAGGGCA
 251 AGAAGGGCGA AACGAGCCAC ATGCCACCG GGCTCGACTC GGCCTTCTAC
 301 TACTCGTGGG ACAGCGAGTT TTACAGGGTG CTCCGCGAGC GCGTCGCCAA
 351 GAAGCTGGCC GAGCCCGGCC TCATGCAGCG CGCGCGCATG GAGCTCTGGG
 401 CCAAGGCGAT CTTCTCCTG GCAGGTTTCT GGGGCTCCCT TTACGCCATG
 451 TCGTGCTAG ACCCGCACGG CGGTGCCATG GTAGCCGCCG TTACGCTCGG
 501 CGTGTTCGCT GCCTTTGTCT GAACTTGCAT CCAGCACGAC GGCAGCCACG
 551 GCGCCTTCTC CAAGTCGCGA TTCATGAACA AGGCGGCGGG CTGGACCCCTC
 601 GACATGATCG GCGCGAGCGC GATGACCTGG GAGATGCAGC ACGTTCCTGG
 651 CCACCACCCG TACACCAACC TCATCGAGAT GGAGAACGGT TTGGCCAAGG
 701 TCAAGGGCGC CGACGTCGAC CCGAAGAAGG TCGACCAGGA GAGCGACCCG
 751 GACGTCTTCA GTACGTACCC GATGCTTCGC CTGCACCCGT GGCACCGCCA
 801 GCGGTTTTAC CACAAGTTCC AGCACCTGTA CGCCCCGTTT ATCTTTGGGT
 851 TTATGACGAT TAACAAGGTG ATTTCCAGG ATGTCGGGGT TGTGCTGCGC
 901 AAGCGCCTGT TCCAGATCGA CGCCAACCTG CCGTATGGCA GCCCCTGGTA
 951 CGTGGCCCGC TTCTGGATCA TGAAGCTCCT CACCACGCTC TACATGGTGG
 1001 CGCTTCCCAT GTACATGCAG GGGCCTGCTC AGGGCTTGAA GCTTTTCTTC
 1051 ATGGCCCACT TCACCTGCGG AGAGGTCTC GCCACCATGT TTATTGTCAA
 1101 CCACATCATC GAGGGCGTCA GCTACGCTTC CAAGGACGCG GTCAAGGGCG
 1151 TCATGGCTCC GCCGCGCACT GTGCACGGTG TCACCCCGAT GCAGGTGACG
 1201 CAAAAGGCGC TCAGTGCGGC CGAGTCGACC AAGTCGGACG CCGACAAGAC
 1251 GACCATGATC CCCCTCAACG ACTGGGCCGC TGTGCAGTGC CAGACCTCTG
 1301 TGAACTGGGC TGTCGGGTCG TGGTTTTGGA ACCACTTTTC GGGCGGCCTC
 1351 AACCACCAGA TTGAGCACCA CTGCTTCCCC CAAAACCCCC ACACGGTCAA
 1401 CGTCTACATC TCAGGCATCG TCAAGGAGAC CTGCGAAGAA TACGGCGTGC
 1451 CGTACCAGGC TGAGATCAGC CTCTTCTCTG CCTATTTCAA GATGCTGTGC
 1501 CACCTCCGCA CGCTCGGCAA CGAGGACCTC ACGGCCTGGT CCACGTGA

FIG.11C

SECUENCIA ID N°: 16

1 ATGACGGTCG GGTTTGACGA AACGGTGA CT ATGGACACGG TCCGCAACCA
 51 CAACATGCCG GACGACGCCT GGTGCGCGAT CCACGGCACC GTGTACGACA
 101 TCACCAAGTT CAGCAAGGTG CACCCCGGCG GGGACATCAT CATGCTGGCC
 151 GCTGGCAAGG AGGCCACCAT CCTGTTGAG ACCTACCACA TCAAGGGCGT
 201 CCCGGACGCG GTGCTGCGCA AGTACAAGGT CGGCAAGCTC CCCAGGGCA
 251 AGAAGGGCGA AACGAGCCAC ATGCCACCG GGCTCGACTC GGCCTCCTAC
 301 TACTCGTGGG ACAGCGAGTT TTACAGGGTG CTCCGCGAGC GCGTCGCCAA
 351 GAAGCTGGCC GAGCCCGGCC TCATGCAGCG CGCGCGCATG GAGCTCTGGG
 401 CCAAGGCGAT CTTCTCCTG GCAGGTTTCT GGGGCTCCCT TTACGCCATG
 451 TGCCTGCTAG ACCCGCACGG CGGTGCCATG GTAGCCGCCG TTACGCTCGG
 501 CGTGTTCGCT GCCTTTGTCG GAACTTGCAT CCAGCACGAC GGCAGCCACG
 551 GCGCCTTCTC CAAGTCGCGA TTCATGAACA AGGCGGCGGG CTGGACCCTC
 601 GACATGATCG GCGCGAGCGC GATGACCTGG GAGATGCAGC ACGTTCTTGG
 651 TCACCACCGG TACACCAACC TCATCGAGAT GGAGAACGGT TTGGCCAAGG
 701 TCAAGGGCGC CGACGTCGAC CCGAAGAAGG TCGACCAGGA GAGCGACCCG
 751 GACGCTTCA GTACGTACCC GATGCTTCGC CTGCACCCGT GGCACCGCCA
 801 GCGGTTTTAC CACAAGTCC AGCACCTGTA CGCCCGCTT ATCTTTGGGT
 851 TTATGACGAT TAACAAGGTG ATTTCCAGG ATGTCGGGGT TGTGCTGCGC
 901 AAGCGCTGT TCCAGATCGA CGCCAAGTGC CGGTATGGCA GCCCCTGGAA
 951 CGTGGCCCGC TTCTGGATCA TGAAGCTCCT CACCACGCTC TACATGGTGG
 1001 CGCTTCCCAT GTACATGCAG GGGCCTGCTC AGGGCTTGAA GCTTTTCTTC
 1051 ATGGCCACT TCACCTGCGG AGAGGTCCTC GCCACCATGT TTATTGTCAA
 1101 CCACATCATC GAGGGCGTCA GCTACGCTTC CAAGGACGCG GTCAAGGGCG
 1151 TCATGGCTCC GCCCGCACT GTGCACGGTG TCACCCCGAT GCAGGTGACG
 1201 CAAAAGGGCG TCAGTGCGGC CGAGTCGACC AAGTCGGACG CCGACAAGAC
 1251 GACCATGATC CCCCTCAACG ACTGGGCGC TGTGCAGTGC CAGACCTCTG
 1301 TGAAGTGGG TGTCGGGTCG TGGTTTTGA ACCACTTTTC GGGCGGCTA
 1351 AACCACCAGA TTGAGACCA CTGCTTCCC CAAAACCCC ACACGGTCAA
 1401 CGTCTACATC TCGGGCATCG TCAAGGAGAC CTGCGAAGAA TACGGCGTGC
 1451 CGTACCAGGC TGAGATCAGC CTCTTCTCTG CCTATTTCAA GATGCTGTGC
 1501 CACCTCCGCA CGCTCGGCAA CGAGGACCTC ACGGCCTGGT CCACGTGA

SECUENCIA ID N°: 17

1 ATGACGGTCG GGTTTGACGA AACGGTGA CT ATGGACACGG TCCGCAACCA
 51 CAACATGCCG GACGACGCCT GGTGCGCGAT CCACGGCACC GTGTACGACA
 101 TCACCAAGTT CAGCAAGGTG CACCCCGGCG GGGACATCAT CATGCTGGCC
 151 GCTGGCAAGG AGGCCACCAT CCTGTTGAG ACCTACCACA TCAAGGGCGT
 201 CCCGGACGCG GTGCTGCGCA AGTACAAGGT CGGCAAGCTC CCCAGGGCA
 251 AGAAGGGCGA AACGAGCCAC ATGCCACCG GGCTCGACTC GGCCTCCTAC
 301 TACTCGTGGG ACAGCGAGTT TTACAGGGTG CTCCGCGAGC GCGTCGCCAA
 351 GAAGCTGGCC GAGCCCGGCC TCATGCAGCG CGCGCGCATG GAGCTCTGGG

FIG. 11D

ES 2 310 204 T3

401 CCAAGGCGAT CTTCTCCTG GCAGGTTTCT GGGGCTCCCT TTACGCCATG
 451 TGCCTGCTAG ACCCGCACGG CGGTGCCATG GTAGCCGCCG TTACGCTCGG
 501 CGTGTTCGCT GCCTTTGTCG GAACTTGCAT CCAGCAGGAC GGCAGCCACG
 551 GCGCCTTCTC CAAGTCGCGA TTCATGAACA AGGCGGCGGG CTGGACCCTC
 601 GACATGATCG GCGCGAGTGC GATGACCTGG GAGATGCAGC ACGTTCTTGG
 651 CCACCACCCG TACACCAACC TCATCGAGAT GGAGAACGGT TTGGCCAAGG
 701 TCAAGGGCGC CGACGTCGAC CCGAAGAAGG TCGACCAGGA GAGCGACCCG
 751 GACGTCTTCA GTACGTACCC GATGCTTCGC CTGCACCCGT GGCACCGCCA
 801 GCGGTTTTAC CACAAGTTC AGCACCTGTA CGCCCCGTTT ATCTTTGGGT
 851 CTATGACGAT TAACAAGGTG ATTTCCAGG ATGTCGGGGT TGTGCTGCGC
 901 AAGCGCTGT TCCAGATCGA CGCCAACCTGC CGGTATGGCA GCCCCTGGTA
 951 CGTGGCCCGC TTCTGGATCA TGAAGTCCT CACCACGCTC TACATGGTGG
 1001 CGTTCCCAT GTACATGCAG GGGCCTGCTC AGGGCTTGAA GCTTTTCTTC
 1051 ATGGCCCACT TCACCTGCGG AGAGGTCCTC GCCACCATGT TTATTGTCAA
 1101 CCACATCATC GAGGGCGTCA GCTACGCTTC CAAGGACGCG GTCAAGGGCG
 1151 TCATGGCTCC GCCGCGCACT GTGCACGGTG TCACCCCGAT GCAGGTGACG
 1201 CAAAAGGCGC TCAGTGCGGC CGAGTCGGCC AAGTCGGACG CCGACAAGAC
 1251 GACCATGATC CCCCTCAACG ACTGGGCCGC TGTGCAGTGC CAGACCTCTG
 1301 TGAAGTGGGC TGTGCGGTG TGGTTTTGGA ACCACTTTTC GGGCGGCCCTC
 1351 AACCAACAGA TTGAGCACCA CTGCTTCCCC CAAAACCCCC ACACGGTCAA
 1401 CGTCTACATC TCGGGCATCG TCAAGGAGAC CTGCGAAGAA TACGGCGTGC
 1451 CGTACCAGGC TGAGATCAGC CTCTTCTCTG CCTATTTCAA GATGCTGTGC
 1501 CACCTCCGCA CGCTCGGCAA CGAGGACCTC ACGGCCTGGT CCACGTGA

SECUENCIA ID N°: 18

1 MTVGFDIVT MDTVRNHNMP DDAWCAIHGT VYDITKFSKV HPGGDIIMLA
 51 AGKEATILFE TYHIKGVPA VLRKYKVGKL PQGKKGETSH MPTGLDSASY
 101 YSWDSEFYRV LRERVAKLA EPGLMQRARM ELWAKAIFLL AGFWGSLYAM
 151 CVLDPHGGAM VAAVTLGVFA AFVGTCTIQHD GSHGAFSKSR FMNKAAGWTL
 201 DMIGASAMTW EMQHVLGHP YTNLIEMENG LAKVKGADVD PKKVDQESDP
 251 DVFSTYPMRL LHPWHRQRFY HKFQHLYAPF IFGFMTINKV ISQDVGWVLR
 301 KRLFQIDANC RYGSPWYVAR FWIMKLLTTL YTVALPMYMQ GPAQGLKLF
 351 MAHFTCGEVL ATMFIWNHII EGVSYASKDA VKGVMAPPRT VHGVTPMQVT
 401 QKALSAAEST KSDADKTTMI PLNDWAAVQC QTSVNWAVGS WFWNHFSGGL
 451 NHQIEHHCFP QNPHTVWVYI SGIVKETCEE YGVPYQAEIS LFSAYFKMLS
 501 HLRTLGNEDL TARST*

SECUENCIA ID N°: 19

1 MTVGFDIVT MDTVRNHNMP DDAWCAIHGT VYDITKFSKV HPGGDIIMLA
 51 AGKEATILFE TYHIKGVPA VLRKYKVGKL PQGKKGETSH MPTGLDSAFY

FIG. 11E

ES 2 310 204 T3

101 YSWDSEFYRV LRERVAKKLA EPGLMQRARM ELWAKAIFLL AGFWGSLYAM
151 CVLDPHGGAM VAAVTLGVFA AFVGTICIQHD GSHGAFSKSR FMNKAAGWTL
201 DMIGASAMTW EMQHVLGHHP YTNLIEMENG LAKVKGADVD PKKVDQESDP
251 DVFSTYPMLR LHPWHRQRFY HKFQHLYAPF IFGFMTINKV ISQDVGVVLR
301 KRLFQIDANC RYGSPWYVAR FWIMKLLTTL YMVALPMYMQ GPAQGLKLFF
351 MAHFTCGEVL ATMFIVNHII EGVSYASKDA VKGVMAPPRT VHGVTPMQVT
401 QKALSAAEST KSDADKTTMI PLNDWAAVQC QTSVNWAVGS WFWNHFSGGL
451 NHQIEHHCFP QNPHTVNVYI SGIVKETCEE YGVPYQAEIS LFSAYFKMLS
501 HLRTLGNEDL TAWST*

SECUENCIA ID N°: 20

1 MTVGFDETVT MDTVRNHNMP DDAWCAIHGT VYDITKFSKV HPGGDIIMLA
51 AGKEATILFE TYHIKGVDA VLRKYKVGKL PQGKKGETSH MPTGLDSASY
101 YSWDSEFYRV LRERVAKKLA EPGLMQRARM ELWAKAIFLL AGFWGSLYAM
151 CVLDPHGGAM VAAVTLGVFA AFVGTICIQHD GSHGAFSKSR FMNKAAGWTL
201 DMIGASAMTW EMQHVLGHHP YTNLIEMENG LAKVKGADVD PKKVDQESDP
251 DVFSTYPMLR LHPWHRQRFY HKFQHLYAPL IFGFMTINKV ISQDVGVVLR
301 KRLFQIDANC RYGSPWVVAR FWIMKLLTTL YMVALPMYMQ GPAQGLKLFF
351 MAHFTCGEVL ATMFIVNHII EGVSYASKDA VKGVMAPPRT VHGVTPMQVT
401 QKALSAAEST KSDADKTTMI PLNDWAAVQC QTSVNWAVGS WFWNHFSGGL
451 NHQIEHHCFP QNPHTVNVYI SGIVKETCEE YGVPYQAEIS LFSAYFKMLS
501 HLRTLGNEDL TAWST*

SECUENCIA ID N°: 21

1 MTVGFDETVT MDTVRNHNMP DDAWCAIHGT VYDITKFSKV HPGGDIIMLA
51 AGKEATILFE TYHIKGVDA VLRKYKVGKL PQGKKGETSH MPTGLDSASY
101 YSWDSEFYRV LRERVAKKLA EPGLMQRARM ELWAKAIFLL AGFWGSLYAM
151 CVLDPHGGAM VAAVTLGVFA AFVGTICIQHD GSHGAFSKSR FMNKAAGWTL
201 DMIGASAMTW EMQHVLGHHP YTNLIEMENG LAKVKGADVD PKKVDQESDP
251 DVFSTYPMLR LHPWHRQRFY HKFQHLYAPF IFGSMTINKV ISQDVGVVLR
301 KRLFQIDANC RYGSPWYVAR FWIMKLLTTL YMVALPMYMQ GPAQGLKLFF
351 MAHFTCGEVL ATMFIVNHII EGVSYASKDA VKGVMAPPRT VHGVTPMQVT
401 QKALSAAESA KSDADKTTMI PLNDWAAVQC QTSVNWAVGS WFWNHFSGGL
451 NHQIEHHCFP QNPHTVNVYI SGIVKETCEE YGVPYQAEIS LFSAYFKMLS
501 HLRTLGNEDL TAWST*

FIG. 11F

ES 2 310 204 T3

SECUENCIA ID N°: 22

ATGGAGCAGC	TGAAGGCCTT	TGATAATGAA	GTCAATGCTT	TCTTGGACAA	CATGTTTGA	60
CCACGAGATT	CTCGAGTTCG	CGGGTGGTTC	CTGCTGGACT	CTTACCTTCC	CACCTTCATC	120
CTCACCATCA	CGTACCTGCT	CTCGATATGG	CTGGGTAACA	AGTACATGAA	GAACAGGCCT	180
GCTCTGTCTC	TCAGGGGCAT	CCTCACCTTG	TATAACCTCG	CAATCACACT	TCTTTCTGCG	240
TATATGCTGG	TGGAGCTCAT	CCTCTCCAGC	TGGGAAGGAG	GTTACAACCT	GCAGTGTGAG	300
AATCTCGACA	GTGCAGGAGA	AGGTGATGTC	CGGGTAGCCA	AGGTCTTGTG	GTGGTACTAC	360
TTCTCCAAAC	TAGTGGAGTT	CCTGGACACG	ATTTTCTTTG	TTCTACGAAA	AAAGACCAAT	420
CAGATCACCT	TCCTTCATGT	CTATCACCAC	GCGTCCATGT	TCAACATCTG	GTGGTGTGTT	480
TTGAACTGGA	TACCTTGTGG	TCAAAGCTTC	TTTGGACCCA	CCCTGAACAG	CTTTATCCAC	540
ATTCTCATGT	ACTCCTACTA	CGGCCTGTCT	GTGTTCCCGT	CCATGCACAA	GTACCTTTGG	600
TGGAAGAAGT	ACCTCACACA	GGCTCAGCTG	GTGCAGTTG	TACTCACCAT	CACGCACACG	660
CTGAGTGCCG	TGGTGAAGCC	CTGTGGCTTC	CCCTTTGGCT	GTCTCATCTT	CCAGTCTTCC	720
TATATGATGA	CGCTGGTCAT	CCTGTTCTTA	AACTTCTATA	TTCAGACATA	CCGGAAAAAG	780
CCAGTGAAGA	AAGAGCTGCA	AGAGAAAAGAA	GTGAAGAATG	GTTTCCCCAA	AGCCCACTTA	840
ATTGTGGCTA	ATGGCATGAC	GGACAAGAAG	GCTCAATAA			879

SECUENCIA ID N° 23

Met	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Phe	Asp	Asn	Glu	Val	Asn	Ala	Phe	Leu	Asp
1				5					10					15	
Asn	Met	Phe	Gly	Pro	Arg	Asp	Ser	Arg	Val	Arg	Gly	Trp	Phe	Leu	Leu
			20					25					30		
Asp	Ser	Tyr	Leu	Pro	Thr	Phe	Ile	Leu	Thr	Ile	Thr	Tyr	Leu	Leu	Ser
		35					40					45			
Ile	Trp	Leu	Gly	Asn	Lys	Tyr	Met	Lys	Asn	Arg	Pro	Ala	Leu	Ser	Leu
	50					55				60					
Arg	Gly	Ile	Leu	Thr	Leu	Tyr	Asn	Leu	Ala	Ile	Thr	Leu	Leu	Ser	Ala
65					70				75					80	
Tyr	Met	Leu	Val	Glu	Leu	Ile	Leu	Ser	Ser	Trp	Glu	Gly	Gly	Tyr	Asn
			85					90						95	
Leu	Gln	Cys	Gln	Asn	Leu	Asp	Ser	Ala	Gly	Glu	Gly	Asp	Val	Arg	Val
			100					105					110		
Ala	Lys	Val	Leu	Trp	Trp	Tyr	Tyr	Phe	Ser	Lys	Leu	Val	Glu	Phe	Leu
			115				120						125		
Asp	Thr	Ile	Phe	Phe	Val	Leu	Arg	Lys	Lys	Thr	Asn	Gln	Ile	Thr	Phe
						135					140				
Leu	His	Val	Tyr	His	His	Ala	Ser	Met	Phe	Asn	Ile	Trp	Trp	Cys	Val
145					150					155				160	
Leu	Asn	Trp	Ile	Pro	Cys	Gly	Gln	Ser	Phe	Phe	Gly	Pro	Thr	Leu	Asn
				165					170					175	
Ser	Phe	Ile	His	Ile	Leu	Met	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Ser	Val	Phe
			180					185						190	

FIG. 11G

ES 2 310 204 T3

Pro Ser Met His Lys Tyr Leu Trp Trp Lys Lys Tyr Leu Thr Gln Ala
 195 200 205
 Gln Leu Val Gln Phe Val Leu Thr Ile Thr His Thr Leu Ser Ala Val
 210 215 220
 Val Lys Pro Cys Gly Phe Pro Phe Gly Cys Leu Ile Phe Gln Ser Ser
 225 230 235 240
 Tyr Met Met Thr Leu Val Ile Leu Phe Leu Asn Phe Tyr Ile Gln Thr
 245 250 255
 Tyr Arg Lys Lys Pro Val Lys Lys Glu Leu Gln Glu Lys Glu Val Lys
 260 265 270
 Asn Gly Phe Pro Lys Ala His Leu Ile Val Ala Asn Gly Met Thr Asp
 275 280 285
 Lys Lys Ala Gln
 290

SECUENCIA ID N°: 24

ccagtgtgct ggaattcagg tactactact acaccatact tacacgaacc tgatcgagat 60
 ggagaacggc acccaaaagg tcaccacgc cgacgtcgac cccaagaagg ccgaccagga 120
 gagegaccgg gacgtcttca gcacctacc catgctccgt ctgcaccctg ggcaccgcaa 180
 gcgtttctac caccgcttcc agcacctgta cgcgcctgt ctcttcgggt tcatgaccat 240
 caacaagggtg atcaccagg atgtgggagt tgtcctcagc aagcgtctgt ttcagatcga 300
 tgccaactgc cgttacgcca gcaagtcgta cgttgccgcg ttctggatca tgaagctgct 360
 caccgtcttc tacatggctg cctccccgt gtacaccag gcccttgctg acgggctcaa 420
 gctcttcttc atcgccact tttcgtgagg cgagctgctg gccaccatgt tcatcgtaaa 480
 ccacatcacc gagggcgtct cgtacgcctc caaggactct gtcaagggca ccatggcgcc 540
 gccgcgcaag gtgcacggcg tgacccgat gcatgacacc cgcgacgcgc tcggcaagga 600
 gaaggcagcc accaagcag tgcgctcaa cgactgggccc gcggtccagt gccagacctc 660
 ggtcaactgg tcgatcgct cgtggttctg gaaccacttc tccggcgggc tcaaccacca 720
 gatcgagcac caccttttcc ccatgatgat gatg 754

SECUENCIA ID N°: 25

Gln Cys Ala Gly Ile Gln Val Leu Leu Leu His His Thr Tyr Thr Asn
 1 5 10 15
 Leu Ile Glu Met Glu Asn Gly Thr Gln Lys Val Thr His Ala Asp Val
 20 25 30
 Asp Pro Lys Lys Ala Asp Gln Glu Ser Asp Pro Asp Val Phe Ser Thr
 35 40 45
 Tyr Pro Met Leu Arg Leu His Pro Trp His Arg Lys Arg Phe Tyr His
 50 55 60

FIG. 11H

Arg	Phe	Gln	His	Leu	Tyr	Ala	Pro	Leu	Leu	Phe	Gly	Phe	Met	Thr	Ile
65					70					75					80
Asn	Lys	Val	Ile	Thr	Gln	Asp	Val	Gly	Val	Val	Leu	Ser	Lys	Arg	Leu
				85					90						95
Phe	Gln	Ile	Asp	Ala	Asn	Cys	Arg	Tyr	Ala	Ser	Lys	Ser	Tyr	Val	Ala
			100					105							110
Arg	Phe	Trp	Ile	Met	Lys	Leu	Leu	Thr	Val	Leu	Tyr	Met	Val	Ala	Leu
		115					120					125			
Pro	Val	Tyr	Thr	Gln	Gly	Leu	Val	Asp	Gly	Leu	Lys	Leu	Phe	Phe	Ile
	130					135					140				
Ala	His	Phe	Ser	Cys	Gly	Glu	Leu	Leu	Ala	Thr	Met	Phe	Ile	Val	Asn
145					150						155				160
His	Ile	Ile	Glu	Gly	Val	Ser	Tyr	Ala	Ser	Lys	Asp	Ser	Val	Lys	Gly
				165						170					175
Thr	Met	Ala	Pro	Pro	Arg	Thr	Val	His	Gly	Val	Thr	Pro	Met	His	Asp
			180					185						190	
Thr	Arg	Asp	Ala	Leu	Gly	Lys	Glu	Lys	Ala	Ala	Thr	Lys	His	Val	Pro
		195					200						205		
Leu	Asn	Asp	Trp	Ala	Ala	Val	Gln	Cys	Gln	Thr	Ser	Val	Asn	Trp	Ser
	210					215						220			
Ile	Gly	Ser	Trp	Phe	Trp	Asn	His	Phe	Ser	Gly	Gly	Leu	Asn	His	Gln
225					230						235				240
Ile	Glu	His	His	Leu	Phe	Pro	Met	Met	Met	Met					
				245						250					

FIG. 111

Met Glu Gln Leu Lys Ala Phe Asp Asn Glu Val Asn Ala Phe Leu Asp
 1 5 10 15
 Asn Met Phe Gly Pro Arg Asp Ser Arg Val Arg Gly Trp Phe Leu Leu
 20 25 30
 Asp Ser Tyr Leu Pro Thr Phe Ile Leu Thr Ile Thr Tyr Leu Leu Ser
 35 40 45
 Ile Trp Leu Gly Asn Lys Tyr Met Lys Asn Arg Pro Ala Leu Ser Leu
 50 55 60
 Arg Gly Ile Leu Thr Leu Tyr Asn Leu Ala Ile Thr Leu Leu Ser Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Leu Val Glu Leu Ile Leu Ser Ser Trp Glu Gly Gly Tyr Asn
 85 90 95
 Leu Gln Cys Gln Asn Leu Asp Ser Ala Gly Glu Gly Asp Val Arg Val
 100 105 110
 Ala Lys Val Leu Trp Trp Tyr Tyr Phe Ser Lys Leu Val Glu Phe Leu
 115 120 125
 Asp Thr Ile Phe Phe Val Leu Arg Lys Lys Thr Asn Gln Ile Thr Phe
 130 135 140
 Leu His Val Tyr His His Ala Ser Met Phe Asn Ile Trp Trp Cys Val
 145 150 155 160
 Leu Asn Trp Ile Pro Cys Gly Gln Ser Phe Phe Gly Pro Thr Leu Asn
 165 170 175
 Ser Phe Ile His Ile Leu Met Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu Ser Val Phe
 180 185 190
 Pro Ser Met His Lys Tyr Leu Trp Trp Lys Lys Tyr Leu Thr Gln Ala
 195 200 205
 Gln Leu Val Gln Phe Val Leu Thr Ile Thr His Thr Leu Ser Ala Val
 210 215 220
 Val Lys Pro Cys Gly Phe Pro Phe Gly Cys Leu Ile Phe Gln Ser Ser
 225 230 235 240
 Tyr Met Met Thr Leu Val Ile Leu Phe Leu Asn Phe Tyr Ile Gln Thr
 245 250 255
 Tyr Arg Lys Lys Pro Val Lys Lys Glu Leu Gln Glu Lys Glu Val Lys
 260 265 270
 Asn Gly Phe Pro Lys Ala His Leu Ile Val Ala Asn Gly Met Thr Asp
 275 280 285
 Lys Lys Ala Gln
 290

FIG. 12

ccagtgtgct	ggaattcagg	tactactact	acaccatact	tacacgaacc	tgatcgagat	60
ggagaacggc	acccaaaagg	tcaccacagc	cgacgtcgac	cccaagaagg	ccgaccagga	120
gagcgaccg	gacgtettca	gcacctacc	catgctccgt	ctgcaccggt	ggcaccgcaa	180
gcgctttac	caccgcttcc	agcacctgta	cgcgccgctg	cttttcgggt	tcatgaccat	240
caacaagggt	atcaccag	atgtgggagt	tgtcctcagc	aagcgtctgt	ttcagatcga	300
tgccaactgc	cgttacgcca	gcaagtcgta	cgttgcgcgc	ttctggatca	tgaagctgct	360
caccgtcctc	tacatggtcg	ccctccccgt	gtacacccag	ggccttgtcg	acgggctcaa	420
gctcttttc	atcgccact	tttcgtgcgg	cgagctgctg	gccaccatgt	tcatcgtaa	480
ccacatcatc	gagggcgtct	cgtagcctc	caaggactct	gtcaagggca	ccatggcgcc	540
gccgcgcacg	gtgcacggcg	tgaccccgat	gcatgacacc	cgcgacgcgc	tggcaagga	600
gaaggcagcc	accaagcag	tgccgctcaa	cgactgggcc	gcggtccagt	gccagacctc	660
ggtcaactgg	tcgatcggct	cgtggttctg	gaaccacttc	tccggcgggc	tcaaccacca	720
gatcgagcac	caccttttcc	ccatgatgat	gatg			754

FIG. 13

Gln	Cys	Ala	Gly	Ile	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	His	His	Thr	Tyr	Thr	Asn
1				5					10					15	
Leu	Ile	Glu	Met	Glu	Asn	Gly	Thr	Gln	Lys	Val	Thr	His	Ala	Asp	Val
		20						25					30		
Asp	Pro	Lys	Lys	Ala	Asp	Gln	Glu	Ser	Asp	Pro	Asp	Val	Phe	Ser	Thr
		35					40					45			
Tyr	Pro	Met	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Trp	His	Arg	Lys	Arg	Phe	Tyr	His
	50					55					60				
Arg	Phe	Gln	His	Leu	Tyr	Ala	Pro	Leu	Leu	Phe	Gly	Phe	Met	Thr	Ile
65					70					75					80
Asn	Lys	Val	Ile	Thr	Gln	Asp	Val	Gly	Val	Val	Leu	Ser	Lys	Arg	Leu
				85					90					95	
Phe	Gln	Ile	Asp	Ala	Asn	Cys	Arg	Tyr	Ala	Ser	Lys	Ser	Tyr	Val	Ala
			100					105					110		
Arg	Phe	Trp	Ile	Met	Lys	Leu	Leu	Thr	Val	Leu	Tyr	Met	Val	Ala	Leu
		115					120					125			
Pro	Val	Tyr	Thr	Gln	Gly	Leu	Val	Asp	Gly	Leu	Lys	Leu	Phe	Phe	Ile
	130					135					140				
Ala	His	Phe	Ser	Cys	Gly	Glu	Leu	Leu	Ala	Thr	Met	Phe	Ile	Val	Asn
145					150					155					160
His	Ile	Ile	Glu	Gly	Val	Ser	Tyr	Ala	Ser	Lys	Asp	Ser	Val	Lys	Gly
				165					170					175	
Thr	Met	Ala	Pro	Pro	Arg	Thr	Val	His	Gly	Val	Thr	Pro	Met	His	Asp
			180					185					190		
Thr	Arg	Asp	Ala	Leu	Gly	Lys	Glu	Lys	Ala	Ala	Thr	Lys	His	Val	Pro
		195					200					205			
Leu	Asn	Asp	Trp	Ala	Ala	Val	Gln	Cys	Gln	Thr	Ser	Val	Asn	Trp	Ser
	210					215					220				
Ile	Gly	Ser	Trp	Phe	Trp	Asn	His	Phe	Ser	Gly	Gly	Leu	Asn	His	Gln
225					230					235					240
Ile	Glu	His	His	Leu	Phe	Pro	Met	Met	Met	Met					
				245						250					

FIG.14

1 ATGACGGTGG GCGGCGATGA GGTGTACAGC ATGGCGCAGG TGC GCGACCA
 51 CAACACCCCG GACGACGCCT GGTGCGCCAT CCACGGCGAG GTGTACGAGC
 101 TGACCAAGTT CGCCCGCACC CACCCCGGGG GGGACATCAT CTTGCTGGCC
 151 GCCGGCAAGG AGGCCACCAT CCTGTTCGAG ACGTACCACG TGC GCGCCCAT
 201 CTCCGACGCG GTCCTGCGCA AGTACCGCAT CGGCAAGCTC GCCGCGCCG
 251 GCAAGGATGA GCCGCGCAAC GACAGCACCT ACTACAGCTG GGACAGCGAC
 301 TTTTACAAGG TGCTCCGCCA GCGTGTCTGT GCGCGCCTCG AGGAGCGCAA
 351 GATCGCCCGC CGCGGCGGCC CCGAGATCTG GATCAAGGCC GCCATCCTCG
 401 TCAGCGGCTT CTGGTCCATG CTCTACCTCA TGTGCACCCT GGACCCGAAC
 451 CGCGGCGCCA TCCTGGCCGC CATCGCGCTG GGCATCGTCG CCGCCTTCGT
 501 CGGCACGTGC ATTCAGCACG ACGGCAACCA CGGCGCGTTC GCCTTCTCTC
 551 CGTTCATGAA CAAGCTCTCT GGCTGGACGC TCGACATGAT CGGCGCCAGT
 601 GCCATGACCT GGGAGATGCA GCACGTGCTG GGCCACCACC CGTACACCAA
 651 CCTGATCGAG ATGGAGAACG GCACCCAAA GGTCACCAC GCCGACGTCG
 701 ACCCAAGAA GGCCGACCAG GAGAGCGACC CGGACGTCTT CAGCACCTAC
 751 CCCATGCTCC GTCTGCACCC GTGGCACCGC AAGCGTTCT ACCACCGCTT
 801 CCAGCACCTG TACGCGCCGC TGCTCTTCGG TTTCATGACC ATCAACAAGG
 851 TGATCACCCA GGATGTGGGA GTTGTCTCA GCAAGCGTCT GTTTCAGATC
 901 GATGCCAACT GCCGTTACGC CAGCAAGTCG TACGTTGCGC GCTTCTGGAT
 951 CATGAAGCTG CTCACCGTCC TCTACATGGT CGCCCTCCCC GTGTACACCC
 1001 AGGGCCTTGT CGACGGGCTC AAGCTCTTCT TCATCGCCCA CTTTTCGTGC
 1051 GGCGAGCTGC TGGCCACCAT GTTCATCGTC AACCACATCA TCGAGGGCGT
 1101 CTCGTACGCC TCCAAGGACT CTGTCAAGGG CACCATGGCG CCGCCGCGCA
 1151 CCGTGCACGG CGTGACCCCG ATGCATGACA CCCGCGACGC GCTCGGCAAG
 1201 GAGAAGGCAG CCACCAAGCA CGTGCCGCTC AACGACTGGG CCGCGGTCCA
 1251 GTGCCAGACC TCGGTCAACT GGTGATCGG CTCGTGGTTC TGAACCACT
 1301 TCTCCGCGCG GCTCAACCAC CAGATCGAGC ACCACCTCTT CCCC GGCCCTC
 1351 ACCCACACCA CCTACGTGTA CATT CAGGAT GTGGTGCAGG CGACGTGCGC
 1401 CGAGTACGGG GTCCCGTACC AGTCGGAGCA GAGCCTCTTC TCCGCCTACT
 1451 TCAAGATGCT CTCCCACCTT CGGGCGCTCG GCAACGAGCC GATGCCCTCG
 1501 TGGGAGAAGG ACCACCCAA GTCCAAGTGA

FIG. 16

1 MTVGGDEVYS MAQVRDHNTD DDAWCAIHGE VYELTKFART HPGGDIILLA
51 AGKEATILFE TYHVRPISDA VLRKYRIGKL AAAGKDEPAN DSTYYSWSDS
101 FYKVLQRQVV ARLEERKIAR RGGPEIWIKA AILVSGFWSM LYLMCTLDPN
151 RGAILAAIAL GIVAAFVGTG IQHDGNHGAF AFSPFMNKLS GWTDMIGAS
201 AMTWEMQHVL GHHPYTNLIE MENGTQKVTH ADVDPKKADQ ESDPDVFSTY
251 PMLRLHPWHR KRFYHRFQHL YAPLLFGFMT INKVITQDVG VVLSKRLFQI
301 DANCYASKS YVARFWIMKL LTVLYMVALP VYTQGLVDGL KLFFIAHFSC
351 GELLATMFIV NHIEGVSYA SKDSVKGTMA PPRTVHGVTP MHDTRDALGK
401 EKAATKHVPL NDWAAVQCQT SVNWSIGSWF WNHFSGGLNH QIEHHLFPGL
451 THTTYVYIQD VVQATCAEYG VPYQSEQLF SAYFKMLSHL RALGNEPMP
501 WEKDHPKSK

FIG.17

```

1  ATGACGGCCG GATTTGAAGA AGTGATCACC ATGAAGCAGG TGAAGGACCG
51  GAATACGCCG GACGATGCGT GGTGCGTGGT GCATGGCAAG GTGTACGACA
101 TCACCAAGTT CAAGAACGCT CACCCCGGTG GAGATATAAT CATGTTGGCG
151 GCTGGCAAGG ACGCCACCAT CCTGTTTCGAG ACTTACCACA TCCGCGGTGT
201 GCCCGATGCC GTGTTGCGCA AGTATCAGAT CGGCAAACCT CCGGACGGAA
251 AGAACAAAGA GGGCGGCAAC GGCCTCGATA GCGCCTCGTA CTACTCCTGG
301 GACAGCGAGT TTTACCGCGT CCTTCGCGAG CGCGTCTTGA AGCGCCTGAA
351 CGAGCTCAAG CTGTCCAGAC GCGGAGGCTT CGAGATTTGG GCCAAGGCTA
401 TCTTTCTCTT GACCGGCTTC TGGTCTTGCC TCTACCTCAT GTGCACACTC
451 AACCCAAATG GGCTTGCGAT TCCTGCCGCC ATGATGTTGG GAATCTTTGC
501 TGCCTTCGTA GGAACCTGCA TTCAGCACGA CGGGAATCAC GGTGCGTTCCG
551 CCCAATCTTC GTGGCTTAAC AAGGCCGCTG GTTGGACTTT GGACATGATT
601 GGATCCAGCG CCATGACCTG GGAGATGCAG CACGTGCTTG GACATCATCC
651 GTACACCAAC TTGATTGAAA TGGAGAATGG CAATCAAAGG GTCTCCGGCA
701 AGCCTGTTGA CACCAAGACT GTCGACCAGG AGAGCGACCC TGATGTCTTT
751 AGCACCTACC CTATGCTTCG CCTTACCCTT TGGCACAGCA AAAAGTGGTA
801 CCACAAATAC CAGCACATCT ATGCACCATT CATCTTTGGG TTCATGACCA
851 TCAACAAGGT CATTGCACAG GACGTTGGCG TTATCACACG CAAGCGTCTC
901 TTCCAGATTG ACGCCAAC TG CCGCTACGCT TCTCCGACTT ACGTCGCTCG
951 CTTCTGGATC ATGAAGGTTT TACCCTTCT CTACATGGTT GGCCTGCCAA
1001 TGTACATGCA AGGTCCATGG GAGGGTCTCA AGTTGTTCTT TATTGCGCAC
1051 TTTACTTGCG GCGAGCTGCT GGCCACAATG TTCATCGTAA ACCACATCAT
1101 CGAGGGTGTG AGCTACGCAA GCAAAGATGC CATCAAGGGC GAGATGGCTC
1151 CACCGAAAAC GGTCCGCGGT GTCACCCCAA TGCACGAGAC GCAAAGGTT
1201 CTCGACCAGC GCGAGAAAGA CATGGACGAA ACTTCTAAGA AGAGCCGCAT
1251 CCCTCTCAAC GACTGGGCCG CTGTACAGTG CCAGACCACC GTGAAGTGGG
1301 CTATCGGTTT TTGGTTCTGG AACCACTTTT CCGGGGGCCT CAATCATCAG
1351 ATTGAGCATC ATCTGTTCCC CGGCTTGACT CACACCACCT ATGTTCACTT
1401 TCACGATGTG GTCAAAGATA CTTGCGCTGA GTACGGGGTT CCATACCAGC
1451 ACGAGGAGAG TCTATACT GCCTACTTTA AGATGTTGAA TCATCTCAAG
1501 ACCCTAGGCA ACGAGCCAAT GCCTGCCTGG GACAAGAACT AA

```

FIG. 18

1 MTAGFEEVIT MKQVKDRNTP DDAWCVVHGK VYDITKFKNA HPGGDIIMLA
51 AGKDATILFE TYHIRGVPDA VLRKYQIGKL PDGKNKEGGN GLDSASYYSW
101 DSEFYRVLRE RVLKRLNELK LSRRGGFEIW AKAIFFLLTGF WSCLYLMCTL
151 NPNGLAIPAA MMLGIFAAV GTCIQHDGNH GAFAQSSWLN KAAGWTLDMI
201 GSSAMTWEMQ HVLGHHPYTN LIEMENGNQK VSGKPVDTKT VDQESDPDVF
251 STYPMRLRHP WHSKKWYHKY QHIYAPFIFG FMTINKVIAQ DVGVITRKRRL
301 FQIDANCRYA SPTYVARFWI MKVLTVLYMV GLPMYMQGPW EGLKLFIAH
351 FTCGELLATM FIVNHIIEGV SYASKDAIKG EMAPPKTVRG VTPMHETQKV
401 LDQREKDMDE TSKKSRIPLN DWAAVQCQTT VNWAIGSWFW NHFSGGLNHQ
451 IEHHLFPGLT HTTYVHFHDV VKDTCAEYGV PYQHEESLYT AYFKMLNHLK
501 TLGNEMPAPW DKN

FIG. 19

Secuencia de ADN del gen de la delta-4-desaturasa (pRIG6) de
Isochrysis galbana (CCMP 1323)

```

1  ATGTGCAACG CGGCGCAGGT CGAGACGCAG GCCTTGCGCG CCAAGGAGGC
51  GGCAAAACCG ACGTGGACGA AGATTCATGG GCGCACAGTC GACGTGGAGA
101 CGTTCCGCCA CCCAGGCGGC AACATCCTCG ATTTGTTCTT GGGCATGGA
151 GCCACAACCTG CCTTTGAGAC GTTCCACGGT CACCACAAGG GAGCATGGAA
201 GATGCTCAAG ACGCTGCCCG AGAAGGAGGT CGCCGCCGCC GACATTCCCG
251 CGCAGAAGGA GGAGCACGTG GCCGAGATGA CACGCCTCAT GGCCTCATGG
301 CGCGAGCGCG GGCTGTTCAA GCCGCGTCCC GTCGCCTCAT CCATCTATGG
351 CCTGTGCGTG ATCTTCGCCA TCGCGGCATC GGTGCGGTGC GCTCCGTACG
401 CGCCAGTGCT GGCTGGCATC GCGGTGGGCA CCTGCTGGGC TCAGTGGGGC
451 TTCTTGCAGC ACATGGGCGG CCACCGGGAG TGGGGGCGCA CTTGGTCGTT
501 TCGGTTTTAG CATCTGTTTG AAGGCCTGCT CAAGGGCGGC TCGGCCTCGT
551 GGTGGCGCAA CCGCCACAAC AAGCACCATG CCAAGACCAA CGTGCTCGGC
601 GAGGACGGCG ACCTGCGCAC CACACCCTTC TTCGCATGGG ACCCTACTCT
651 GGCCAAGAAA GTGCCCGACT GGTCTCTGCG CACGCAAGCC TTCACCTTTC
701 TGCCAGCACT GGGAGCTTAC GTCTTCGTCT TTGCCTTCAC GGTACGCAAG
751 TACAGTGTGG TGAAGCGTCT CTGGCACGAG GTCGCCCTGA TGGTGGCCCA
801 CTACGCTCTC TTTTCCTGGG CGCTCAGCGC CGCCGGCGCC TCCCTCAGCT
851 CCGGCCTCAC CTTCTATTGC ACCGGGTACG CCTGGCAGGG CATCTACCTC
901 GGCTTCTTCT TCGGCCTATC GCACTTTGCG GTGGAGCGCG TGCCGTCGAC
951 CGCCACCTGG CTCGAGTCGA CGATGATGGG CACCGTTGAC TGGGGCGGCT
1001 CCTCCGCCTT CTGCGGCTAC CTCTCCGGCT TCCTCAATAT CCAGATCGAG
1051 CACCACATGG CTCCACAAAT GCCAATGGAG AACCTGCGCC AGATCCGGGC
1101 CGACTGCAAG GCCGCGGCC ACAAGTTCGG GCTGCCGTAC CGCGAGCTGA
1151 CATTCGTGCG GCGACCAAG CTCATGATGA GCGGCCTCTA CCGGACCGGC
1201 AAGGACGAGC TCAAGCTGCG CGCGGACCGC CGCAAGTTCA CGAGGGCACA
1251 GCGGTACATG GCGCGCGCCA GCGCTTTGGT CGACACGCTC AAGGCGGACT
1301 AA

```

FIG. 20

Secuencia de aminoácidos del gen de la delta-4-desaturasa (pRIG6)
de Isochrysis galbana (CCMP 1323)

1 MCNAAQVETQ ALRAKEAAKP TWTKIHGRTV DVETFRHPGG NILDFLGMD
51 ATTAfetfHG HHKGAWKMLK TLPEKEVAAA DIPAQKEEHV AEMTRLMASW
101 RERGLFKPRP VASSIYGLCV IFAIAASVAC APYAPVLAGI AVGTCWAQCG
151 FLQHMGGHRE WGRtWSFAFQ HLFEGLLKGG SASWWRNRHN KHHAKTNVLG
201 EDGDLRTTPF FAWDPTLAKK VPDWSLRTOA FTFLPALGAY VFVFAFTVRK
251 YSVVKRLWHE VALMVAHYAL FSWALSAAGA SLSSGLTFYC TGYAWQGIYL
301 GFFFGLSHFA VERVPSTATW LESTMMGTVD WGGSSAFCGY LSGFLNIQIE
351 HHMAPQMPME NLRQIRADCK AAAHKFGLPY RELTFVAATK LMMSGLYRTG
401 KDELKLRADR RKFTRAQAYM GAASALVDTL KAD*

FIG.21

ES 2 310 204 T3

Análisis comparativo de la delta-4-desaturasa de L. galbana (CCMP 1323) (pRIG6.pep) y la delta-4-desaturasa de T. aureum (ATCC 34304) (pRTA7.pep)

Calidad: 68 Longitud: 554
 Proporción: 0,157 Huecos: 22
 Porcentaje de similitud: 38,384 Porcentaje de identidad: 30,808

Umbrales de presentación de coincidencias para los alineamientos

| = IDENTIDAD

: = 2

. = 1

pRIG6.pepx prta7.pep

```

1  ..MCNAAQVETQALRAKEAAKPTWTKIHGRTVDVETFR..HPGGNILDLF 46
      | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . |
1  MTVGFDETVMDTVRNHNMPDDAWCAIHGTVYDITKFSKVHPGGDIIMLA 50
47  LGMDATTAFFETFH..GHHKGAWKMLKT..LPE.KEVAAADIPAQKE.... 87
      | : || | ||| : | | : | | : | . . . | :
51  AGKEATILFETYHIKGVPAVLRKYKVGKLPQGGKGETSHMPTGLDSASY 100
88  .....EHVAE.....MTRLMASWRERGLFKPRPVASSIYGL 118
      | | | . | | | | | : : | : | :
101 YSWDSEFYRVLRRERVAKKLAEPGLMQRARMELWAKAIFLLAGFWGSLYAM 150
119 CVIFAIASVACAPYAPVLAGIAVGTCAQCGFLQHMGGHREWGRTWSFA 168
      || : . . . | | | | | | | | : || | | . :
151 CVLDPHGGAMVAAVTLGVFAAF.VGTC.....IQHDGSHGAFSKS...R 190
169 FQHLFEGL...LKGSASWWRNRH.NKHHAKTNVLGEDGDLRTTPFFAWD 214
      | . . . | : | | | | | | | | | : : | | |
191 FMNKAAGWTLDMIGASAMTWEMQHVLGHHPYTNLIEMENGLAKVKGADVD 240
215 PTLAKKVPDWSLRTQAFTFLPALGAYVF.....VFAF.T 247
      | . . || | | | . | | : . . . . . | : | | |
241 P...KKV.DQESDPDVFSTYPMLRLHPWHRQRFYHKFQHLYAPLIFGFM 286
248 VRK.....YSVV..KRL.....WHEVA..LMVAHYALFSWALS 276
      : | | | | | | | | | | | | | | : | | |
287 INKVISQDVGVLKRLFQIDANCYGSPPNVARFWIMKLLTTLYMVALP 336
277 AAGASLSSGLTFYCTGYAWQGIYLGFFFGLSHF..... 309
337 MYMQGPAQGLKLFMAHFTCGEVLATMFIVNHIIEGVSYASKDAVKGVMA 386
    
```

FIG.22A

ES 2 310 204 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Abbott Laboratories
Mukerji, Pradip
Thurmond, Jennifer M.
Huang, Yung-Sheng
Das, Tapas
Leonard, Amanda E.
Pereira, Suzette L.
- 10 <120> GENES DE DELTA-4-DESATURASA Y USOS DE LOS MISMOS
- 15 <130> 6804.US.P1
- <140> No asignado todavía
<141> 11-04-2002
- 20 <150> US 09/849.199
<151> 04-05-2001
- 25 <160> 73
<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 30 <210> 1
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Cebador R0834
- 40 <221> misc_feature
<222> (3)...(3)
<223> b = g o c o t/u en posición 3
- 45 <221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> y = t/u o c en posición 6
- 50 <221> misc_feature
<222> (9)...(9)
<223> y = t/u o c en posición 9
- 55 <221> misc_feature
<222> (12)...(12)
<223> b = g o c o t/u en posición 12
- 60 <221> misc_feature
<222> (18)...(18)
<223> r = g o a en posición 18
- 65 <221> misc_feature
<222> (24)...(24)
<223> b = g o c o t/u en posición 24

ES 2 310 204 T3

<221> misc_feature
<222> (30)...(30)
<223> y = t/u o c en posición 30
5
<221> misc_feature
<222> (33)...(33)
<223> y = t/u o c en posición 33
10
<221> misc_feature
<222> (36)...(36)
<223> b = g o c o t/u en posición 36
15
<221> misc_feature
<222> (39)...(39)
<223> h = a o c o t/u en posición 39
20
<221> misc_feature
<222> (42)...(42)
<223> h = a o c o t/u en posición 42
25
<400> 1

 gltaygayg tbaccgartg ggtbaagcgy cayccbghg gh 42
30
<210> 2
<211> 45
<212> ADN
35
<213> Secuencia artificial

<220>
40
<223> Cebador directo R0835

<221> misc_feature
<222> (3)...(3)
45
<223> h = a o c o t/u en posición 3

<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
50
<223> y = t/u o c en posición 6

<221> misc_feature
<222> (12)...(12)
55
<223> y = t/u o c en posición 12

<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
60
<223> y = t/u o c en posición 27

<221> misc_feature
<222> (33)...(33)
65
<223> y = t/u o c en posición 33

<221> misc_feature

ES 2 310 204 T3

<222> (39)...(39)

<223> b = g o c o t/u en posición 39

5 <221> misc_feature

<222> (42)...(42)

<223> y = t/u o c en posición 42

10 <221> misc_feature

<222> (45)...(45)

<223> y = t/u o c en posición 45

15 <400> 2

gghgcylccg cyaactggtg gaagcaycag cayaacgtbc aycay 45

<210> 3

20 <211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador inverso R0836

30 <221> misc_feature

<222> (1)...(1)

<223> r = g o a en posición 1

35 <221> misc_feature

<222> (4)...(4)

<223> r = g o a en posición 4

40 <221> misc_feature

<222> (7)...(7)

<223> v = a o g o c en posición 7

45 <221> misc_feature

<222> (13)...(13)

<223> r = g o a en posición 13

50 <221> misc_feature

<222> (19)...(19)

<223> r = g o a en posición 19

55 <221> misc_feature

<222> (34)...(34)

<223> r = g o a en posición 34

60 <221> misc_feature

<222> (40)...(40)

<223> r = g o a en posición 40

65 <221> misc_feature

<222> (43)...(43)

ES 2 310 204 T3

<223> d = a o g o t/u en posición 43

<400> 3

5 rtgrtgvacg tirtgctgrt gcltccacca gtrgocgar gcdcc 45

<210> 4

<211> 36

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador inverso R0838

<221> misc_feature

20 <222> (6)...(6)

<223> r = g o a en posición 6

<221> misc_feature

25 <222> (12)...(12)

<223> r = g o a en posición 12

<221> misc_feature

30 <222> (15)...(15)

<223> y = t/u o c en posición 15

<221> misc_feature

35 <222> (18)...(18)

<223> r = g o a en posición 18

<221> misc_difference

40 <222> (21)...(21)

<223> r = g o a en posición 21

<221> misc_feature

45 <222> (24)...(24)

<223> s = g o c en posición 24

<221> misc_feature

50 <222> (27)...(27)

<223> r = g o a en posición 27

<221> misc_feature

55 <222> (30)...(30)

<223> v = a o g o c en posición 30

<400> 4

 ttgatrgtct arctygrgt rgasaarggv tggtag 36

<210> 5

65 <211> 24

<212> ADN

ES 2 310 204 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador R0753

<221> misc_feature

<222> (10)...(10)

10 <223> n = a o g o c o t/u, desconocido u otro en posición 10

<221> misc_feature

<222> (13)...(13)

15 <223> r = g o a en posición 13

<221> misc_feature

<222> (16)...(16)

20 <223> n = a o g o c o t/u, desconocido u otro en posición 16

<221> misc_feature

<222> (18)...(19)

25 <223> r = g o a en posiciones 18-19

<221> misc_feature

<222> (22)...(22)

30 <223> r = g o a en posición 22

<400> 5

35 **catcatcatn gggaanarrt grtg** 24

<210> 6

<211> 30

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Cebador R0754

<221> misc_feature

<222> (15)...(15)

50 <223> y = t/u o c en posición 15

<221> misc_feature

<222> (18)...(18)

55 <223> y = t/u o c en posición 18

<221> misc_feature

<222> (21)...(21)

60 <223> n = a o g o c o t/u, desconocido u otro en posición 21

<221> misc_feature

<222> (24)...(24)

65 <223> y = t/u o c en posición 24

ES 2 310 204 T3

<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
<223> n = a o g o c o t/u, desconocido u otro en posición 27
5
<221> misc_feature
<222> (30)...(30)
<223> y = t/u o c en posición 30
10
<400> 6

 ctactactac tacaycayac ntayacnaay 30
15
<210> 7
<211> 31
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador R0898
25
<400> 7

 cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca g 31
30
<210> 8
<211> 31
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador R0930
40
<400> 8

 gacgattaac aaggtgattt cccaggatgt c 31
45
<210> 9
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50
<220>
<223> Cebador R0973
55
<400> 9

 gactaactcg agtcacgtgg accaggccgt gaggtcct 38
60
<210> 10
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
65
<220>
<223> Cebador R0974

ES 2 310 204 T3

<400> 10

gactaactcg agttgacgag gttgtatgt tcggcgggtt gcttg 45

5 <210> 11

<211> 30

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador R0899

15

<400> 11

agcggataac aattcacac aggaaacagc 30

20 <210> 12

<211> 30

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador R01004

30

<400> 12

tggtaccgt cgtgctggat gcaagttccg 30

35 <210> 13

<211> 39

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador RO1046

45

<400> 13

cgcatggaat lcatgacggt cgggttgac gaaacggtg 39

50 <210> 14

<211> 1548

<212> ADN

<213> *Thraustochytrium aureum*

55

60

65

ES 2 310 204 T3

<400> 14

	atgacggtcg	ggtttgacga	aacggtgact	atggacacgg	tccgcaacca	caacatgccg	60
5	gacgacgcct	ggtgcgcgat	ccacggcacc	gtgtacgaca	tcaccaagtt	cagcaaggtg	120
	caccccggcg	gggacatcat	catgctggcc	gctggcaagg	aggccaccat	cctgttcgag	180
	acgtaccaca	tcaagggcgt	cccggacgcg	gtgctgcgca	agtacaaggt	cggcaagctc	240
	ccccagggca	agaagggcga	aacgagccac	atgccaccg	ggctcgactc	ggcctctac	300
	tactcgtggg	acagcgagtt	ttacaggggtg	ctccgcgagc	gcgtcgccaa	gaagctggcc	360
10	gagcccggcc	tcatgcagcg	cgcgcgcatg	gagctctggg	ccaaggcgat	cttctctctg	420
	gcaggtttct	ggggctccct	ttacgccatg	tgcgtgctag	accgcacg	cggtgccatg	480
	gtagccgccc	ttacgctcgg	cgtgttcgct	gcctttgtcg	gaacttgcat	ccagcacgac	540
	ggcagccacg	gcgccttctc	caagtcgcga	ttcatgaaca	aggcggcggg	ctggaccctc	600
	gacatgatcg	gcgcgagcgc	gatgacctgg	gagatgcagc	acgttcttgg	ccaccaccog	660
15	tacaccaacc	tcatcgagat	ggagaacggt	ttggccaagg	tcaagggcgc	cgacgtcgac	720
	ccgaagaagg	tgcaccagga	gagcgaccgg	gacgtcttca	gtacgtaccc	gatgcttcgc	780
	ctgcaccgg	ggcaaccgca	gcggttttac	cacaagttcc	agcacctgta	cgccccgttt	840
	atctttgggt	ttatgacgat	taacaaggtg	atctccagg	atgtcggggt	tgtgctgcgc	900
	aagcgcctgt	tccagatcga	cgccaactgc	cggtatggca	gccccggta	cgtggcccgc	960
20	ttctggatca	tgaagctcct	caccacgctc	tacacgggtg	cgcttcccat	gtacatgcag	1020
	gggctgtctc	agggcttgaa	gcttttcttc	atggcccact	tcacctgcgg	agaggtcctc	1080
	gccaccatgt	ttattgtcaa	ccacatcatc	gagggcgta	gctacgcttc	caaggacgcg	1140
	gtcaagggcg	tcatggctcc	gccgcgcact	gtgcaegggt	tcaccccgat	gcaggtgacg	1200
	caaaagggcg	tcagtgcggc	cgagtgcacc	aagtccgacg	ccgacaagac	gaccatgatc	1260
25	cccccaacg	actgggccc	tgtgcagtgc	cagacctctg	tgaactgggc	tgtcgggtcg	1320
	tggttttgga	accacttttc	gggcggcctc	aaccaccaga	ttgagcacca	ctgcttcccc	1380
	caaaaccccc	acacgggtcaa	cgtctacatc	tcgggcatcg	tcaaggagac	ctgcgaagaa	1440
	taaggcgtgc	cgtaccaggc	tgagatcagc	ctcttctctg	cctatttcaa	gatgctgtcg	1500
	caectccgca	cgctcggcaa	cgaggacctc	acggccaggt	ccacgtga		1548

30 <210> 15

<211> 1548

<212> ADN

35 <213> *Thraustochytrium aureum*

<400> 15

	atgacggtcg	ggtttgacga	aacggtgact	atggacacgg	tccgcaacca	caacatgccg	60
40	gacgacgcct	ggtgcgcgat	ccacggcacc	gtgtacgaca	tcaccaagtt	cagcaaggtg	120
	caccccggcg	gggacatcat	catgctggcc	gctggcaagg	aggccaccat	cctgttcgag	180
	acgtaccaca	tcaagggcgt	tccggacgcg	gtgctgcgca	agtacaaggt	cggcaagctc	240
45	ccccagggca	agaagggcga	aacgagccac	atgccaccg	ggctcgactc	ggccttctac	300
	tactcgtggg	acagcgagtt	ttacaggggtg	ctccgcgagc	gcgtcgccaa	gaagctggcc	360
	gagcccggcc	tcatgcagcg	cgcgcgcatg	gagctctggg	ccaaggcgat	cttctctctg	420
	gcaggtttct	ggggctccct	ttacgccatg	tgcgtgctag	accgcacg	cggtgccatg	480
	gtagccgccc	ttacgctcgg	cgtgttcgct	gcctttgtcg	gaacttgcat	ccagcacgac	540
50	ggcagccacg	gcgccttctc	caagtcgcga	ttcatgaaca	aggcggcggg	ctggaccctc	600
	gacatgatcg	gcgcgagcgc	gatgacctgg	gagatgcagc	acgttcttgg	ccaccaccog	660
	tacaccaacc	tcatcgagat	ggagaacggt	ttggccaagg	tcaagggcgc	cgacgtcgac	720
	ccgaagaagg	tgcaccagga	gagcgaccgg	gacgtcttca	gtacgtaccc	gatgcttcgc	780
	ctgcaccgg	ggcaccgcca	gcggttttac	cacaagttcc	agcacctgta	cgccccgttt	840
55	atctttgggt	ttatgacgat	taacaaggtg	atctccagg	atgtcggggt	tgtgctgcgc	900
	aagcgcctgt	tccagatcga	cgccaactgc	cggtatggca	gccccggta	cgtggcccgc	960
	ttctggatca	tgaagctcct	caccacgctc	tacatgggtg	cgcttcccat	gtacatgcag	1020
	gggctgtctc	agggcttgaa	gcttttcttc	atggcccact	tcacctgcgg	agaggtcctc	1080
	gccaccatgt	ttattgtcaa	ccacatcatc	gagggcgta	gctacgcttc	caaggacgcg	1140
60	gtcaagggcg	tcatggctcc	gccgcgcact	gtgcaegggt	tcaccccgat	gcaggtgacg	1200
	caaaagggcg	tcagtgcggc	cgagtcgacc	aagtccgacg	ccgacaagac	gaccatgatc	1260
	cccccaacg	actgggccc	tgtgcagtgc	cagacctctg	tgaactgggc	tgtcgggtcg	1320
	tggttttgga	accacttttc	gggcggcctc	aaccaccaga	ttgagcacca	ctgcttcccc	1380
	caaaaccccc	acacgggtcaa	cgtctacatc	tcaggcatcg	tcaaggagac	ctgcgaagaa	1440
65	taaggcgtgc	cgtaccaggc	tgagatcagc	ctcttctctg	cctatttcaa	gatgctgtcg	1500
	caectccgca	cgctcggcaa	cgaggacctc	acggccaggt	ccacgtga		1548

ES 2 310 204 T3

<210> 16

<211> 1548

<212> ADN

5 <213> *Thraustochytrium aureum*

<400> 16

```

10      atgacgggtcg ggtttgacga aacgggtgact atggacacgg tccgcaacca caacatgccg      60
      gacgacgcct ggtgcgcgat ccacggcacc gtgtacgaca tcaccaagtt cagcaagggtg      120
      cccccggcg gggacatcat catgctggcc gctggcaagg aggccacat cctgttcgag      180
      acctaccaca tcaagggcgt ccgggacgcg gtgctgcgca agtacaaggt cggcaagctc      240
15      ccccagggca agaagggcga aacgagccac atgccacccg ggctcgactc ggctcctac      300
      tactcgtggg acagcgagtt ttacagggtg ctccgcgagc gcgtcgccaa gaagctggcc      360
      gagcccgcc tcatgcagcg cgcgcgcatg gagctctggg ccaaggcgat ctctctcctg      420
      gcaggtttct ggggctccct ttacgccatg tgcgtgctag acccgcaagg cggtgccatg      480
      gtacccgacg ttacgctcgg cgtgttcgct gcctttgtcg gaacttgcac ccagcacgac      540
20      ggcagccacg gcgccttctc caagtgcgca ttcatgaaca aggcggcggg ctggaccctc      600
      gacatgatcg gcgcgagcgc gatgacctgg gagatgcagc acgttcttgg tcaaccaccg      660
      tacaccaacc tcatcgagat ggagaacggt ttggccaagg tcaagggcgc cgacgtcgac      720
      ccgaagaagg tcgaccagga gagcgaccgg gacgtcttca gtacgtacce gatgcttcgc      780
      ctgcaccgct ggcaccgcca gcggttttac cacaagttcc agcacctgta cgcctcgctt      840
25      atctttgggt ttatgacgat taacaaggtg atttccagg atgtcggggt tgtgctgcgc      900
      aagcgcctgt tccagatcga cgccaactgc cggtatggca gccctggaa cgtggcccgc      960
      ttctggatca tgaagctcct caccacgctc tacatggtgg cgcttccat gtacatgcag      1020
      gggcctgctc aggccttgaa gcttttctc atggccact tcacctcgg agaggctctc      1080
      gccaccatgt ttattgtcaa ccacatcatic gagggcgtea gctacgcttc caaggacgcg      1140
30      gtcaagggcg tcatggctcc gccgcgact gtgcaagggtg tcaccccgat gcaggtgacg      1200
      caaaaggcgc tcagtgcggc cgagtcgacc aagtcggacg ccgacaagac gaccatgatc      1260
      cccctcaacg actgggcgcg tgtgcagtgc cagacctctg tgaactgggc tgtcgggtcg      1320
      tggttttgga accacttttc gggcggccta aaccaaccaga ttgagacca ctgcttcccc      1380
      caaaaccccc acacgggtcaa cgtctacatc tcgggcatcg tcaaggagac ctgccaagaa      1440
35      tacggcgtgc cgtaccaggc tgagatcagc ctcttctctg cctatttcaa gatgctgtcg      1500
      cacctcgcga cgctcggcaa cgaggacctc acggcctggt ccacgtga      1548

```

<210> 17

<211> 1548

<212> ADN

<213> *Thraustochytrium aureum*

45

50

55

60

65

ES 2 310 204 T3

<400> 17

```

atgacgggtcg ggtttgacga aacggtgact atggacacgg tccgcaacca caacatgccg      60
gacgacgcct ggtgcgcgat ccacggcacc gtgtacgaca tcaccaagtt cagcaagggtg      120
5 cccccggcg gggacatcat catgctggcc gctggcaagg aggccaccat cctgttcgag      180
acctaccaca tcaagggcgt cccggaecgc gtgctgcgca agtacaagggt cggcaagctc      240
ccccagggca agaagggcga aacgagccac atgcccaccg ggctcgactc ggctctctac      300
tactcgtggg acagcgagtt ttacagggtg ctccgcgagc gcgtcgccaa gaagctggcc      360
10 gagcccggcc tcatgcagcg cgcgcgcgat gagctctggg ccaaggcgat ctctctctg      420
gcaggtttct gyggctccct ttacgccatg tgcgtgctag acccgcacgg cggtgccatg      480
gtagccgccg ttacgctcgg cgtgttcgct gcctttgtcg gaacttgcac ccagcacgac      540
ggcagccacg gcgcttctc caagtgcgca ttcatgaaca aggcggcggg ctggaccctc      600
gacatgatcg gcgcgagtg gatgacctgg gagatgcagc acgttcttgg ccaccacccg      660
15 tacaccaacc tcatcgagat ggagaacggt ttggccaagg tcaagggcgc cgacgtcgac      720
ccgaagaagg tcgaccagga gagcgacccg gacgtcttca gtacgtaccg gatgcttcgc      780
ctgcaccctg ggaccgcga gcggttttac cacaagttcc agcacctgta cgcctctctt      840
atctttgggt ctatgacgat taacaaggtg atttcccagg atgtcggggt tgtgctgcgc      900
aagcgcctgt tccagatcga cgccaactgc cggtatggca gcccttggtg cgtggcccgc      960
20 ttctggatca tgaagctcct caccacgctc tacatggtgg cgcttcccat gtacatgcag      1020
gggcctgctc agggcttgaa gcttttctc atggcccact tcacctgcgg agaggctctc      1080
gccaccatgt ttatgtcaa ccacatcctc gagggcgctc gctacgcttc caaggacgcg      1140
gtcaagggcg tcatggctcc gccgcgact gtgcacgggt tcaccccgat gcaggtgacg      1200
caaaaggcgc tcagtgcggc cgagtcggcc aagctggacg ccgacaagac gaccatgatc      1260
25 cccctcaacg actgggcgcg tgtgcagtc cagacctctg tgaactgggc tgtcgggtcg      1320
tggttttggg accacttttc gggcggtctc aaccaccaga ttgagcacca ctgcttcccc      1380
caaaaccccc acacggtcaa cgtctacatc tcgggcatcg tcaaggagac ctgcaagaa      1440
tacggcgtgc cgtaccaggc tgagatcagc ctctctctg cctatttcaa gatgctgctg      1500
cacctccgca cgtcggcaa cgaggacctc acggcctggt ccacgtga      1548

```

30

<210> 18

<211> 515

<212> PRT

35

<213> *Thraustochytrium aureum*

<400> 18

40

```

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

```

65

ES 2 310 204 T3

Gly Ser Leu Tyr Ala Met Cys Val Leu Asp Pro His Gly Gly Ala Met
 145 150 155 160
 Val Ala Ala Val Thr Leu Gly Val Phe Ala Ala Phe Val Gly Thr Cys
 5 165 170 175
 Ile Gln His Asp Gly Ser His Gly Ala Phe Ser Lys Ser Arg Phe Met
 180 185 190
 Asn Lys Ala Ala Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met
 10 195 200 205
 Thr Trp Glu Met Gln His Val Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Leu
 210 215 220
 Ile Glu Met Glu Asn Gly Leu Ala Lys Val Lys Gly Ala Asp Val Asp
 225 230 235 240
 15 Pro Lys Lys Val Asp Gln Glu Ser Asp Pro Asp Val Phe Ser Thr Tyr
 245 250 255
 Pro Met Leu Arg Leu His Pro Trp His Arg Gln Arg Phe Tyr His Lys
 260 265 270
 20 Phe Gln His Leu Tyr Ala Pro Phe Ile Phe Gly Phe Met Thr Ile Asn
 275 280 285
 Lys Val Ile Ser Gln Asp Val Gly Val Val Leu Arg Lys Arg Leu Phe
 290 295 300
 25 Gln Ile Asp Ala Asn Cys Arg Tyr Gly Ser Pro Trp Tyr Val Ala Arg
 305 310 315 320
 Phe Trp Ile Met Lys Leu Leu Thr Thr Leu Tyr Thr Val Ala Leu Pro
 325 330 335
 Met Tyr Met Gln Gly Pro Ala Gln Gly Leu Lys Leu Phe Phe Met Ala
 340 345 350
 30 His Phe Thr Cys Gly Glu Val Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn His
 355 360 365
 Ile Ile Glu Gly Val Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ala Val Lys Gly Val
 370 375 380
 35 Met Ala Pro Pro Arg Thr Val His Gly Val Thr Pro Met Gln Val Thr
 385 390 395 400
 Gln Lys Ala Leu Ser Ala Ala Glu Ser Thr Lys Ser Asp Ala Asp Lys
 405 410 415
 40 Thr Thr Met Ile Pro Leu Asn Asp Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr
 420 425 430
 Ser Val Asn Trp Ala Val Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly
 435 440 445
 Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His Cys Phe Pro Gln Asn Pro His
 450 455 460
 45 Thr Val Asn Val Tyr Ile Ser Gly Ile Val Lys Glu Thr Cys Glu Glu
 465 470 475 480
 Tyr Gly Val Pro Tyr Gln Ala Glu Ile Ser Leu Phe Ser Ala Tyr Phe
 485 490 495
 50 Lys Met Leu Ser His Leu Arg Thr Leu Gly Asn Glu Asp Leu Thr Ala
 500 505 510
 Arg Ser Thr
 515

55 <210> 19

<211> 515

<212> PRT

60 <213> *Thraustochytrium aureum*

<400> 19

65 Met Thr Val Gly Phe Asp Glu Thr Val Thr Met Asp Thr Val Arg Asn
 1 5 10 15

ES 2 310 204 T3

His Asn Met Pro Asp Asp Ala Trp Cys Ala Ile His Gly Thr Val Tyr
 20 25 30
 5 Asp Ile Thr Lys Phe Ser Lys Val His Pro Gly Gly Asp Ile Ile Met
 35 40 45
 Leu Ala Ala Gly Lys Glu Ala Thr Ile Leu Phe Glu Thr Tyr His Ile
 50 55 60
 Lys Gly Val Pro Asp Ala Val Leu Arg Lys Tyr Lys Val Gly Lys Leu
 65 70 75 80
 10 Pro Gln Gly Lys Lys Gly Glu Thr Ser His Met Pro Thr Gly Leu Asp
 85 90 95
 Ser Ala Phe Tyr Tyr Ser Trp Asp Ser Glu Phe Tyr Arg Val Leu Arg
 100 105 110
 15 Glu Arg Val Ala Lys Lys Leu Ala Glu Pro Gly Leu Met Gln Arg Ala
 115 120 125
 Arg Met Glu Leu Trp Ala Lys Ala Ile Phe Leu Leu Ala Gly Phe Trp
 130 135 140
 Gly Ser Leu Tyr Ala Met Cys Val Leu Asp Pro His Gly Gly Ala Met
 145 150 155 160
 20 Val Ala Ala Val Thr Leu Gly Val Phe Ala Ala Phe Val Gly Thr Cys
 165 170 175
 Ile Gln His Asp Gly Ser His Gly Ala Phe Ser Lys Ser Arg Phe Met
 180 185 190
 25 Asn Lys Ala Ala Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met
 195 200 205
 Thr Trp Glu Met Gln His Val Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Leu
 210 215 220
 30 Ile Glu Met Glu Asn Gly Leu Ala Lys Val Lys Gly Ala Asp Val Asp
 225 230 235 240
 Pro Lys Lys Val Asp Gln Glu Ser Asp Pro Asp Val Phe Ser Thr Tyr
 245 250 255
 35 Pro Met Leu Arg Leu His Pro Trp His Arg Gln Arg Phe Tyr His Lys
 260 265 270
 Phe Gln His Leu Tyr Ala Pro Phe Ile Phe Gly Phe Met Thr Ile Asn
 275 280 285
 Lys Val Ile Ser Gln Asp Val Gly Val Val Leu Arg Lys Arg Leu Phe
 290 295 300
 40 Gln Ile Asp Ala Asn Cys Arg Tyr Gly Ser Pro Trp Tyr Val Ala Arg
 305 310 315 320
 Phe Trp Ile Met Lys Leu Leu Thr Thr Leu Tyr Met Val Ala Leu Pro
 325 330 335
 45 Met Tyr Met Gln Gly Pro Ala Gln Gly Leu Lys Leu Phe Phe Met Ala
 340 345 350
 His Phe Thr Cys Gly Glu Val Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn His
 355 360 365
 50 Ile Ile Glu Gly Val Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ala Val Lys Gly Val
 370 375 380
 Met Ala Pro Pro Arg Thr Val His Gly Val Thr Pro Met Gln Val Thr
 385 390 395 400
 Gln Lys Ala Leu Ser Ala Ala Glu Ser Thr Lys Ser Asp Ala Asp Lys
 405 410 415
 55 Thr Thr Met Ile Pro Leu Asn Asp Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr
 420 425 430
 Ser Val Asn Trp Ala Val Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly
 435 440 445
 60 Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His Cys Phe Pro Gln Asn Pro His
 450 455 460
 Thr Val Asn Val Tyr Ile Ser Gly Ile Val Lys Glu Thr Cys Glu Glu

65

ES 2 310 204 T3

	465				470					475				480		
	Tyr	Gly	Val	Pro	Tyr	Gln	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	Phe	Ser	Ala	Tyr	Phe
					485					490				495		
5	Lys	Met	Leu	Ser	His	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Asn	Glu	Asp	Leu	Thr	Ala
				500					505					510		
	Trp	Ser	Thr													
			515													
10	<210> 20															
	<211> 515															
	<212> PRT															
15	<213> <i>Thraustochytrium aureum</i>															
	<400> 20															
20	Met	Thr	Val	Gly	Phe	Asp	Glu	Thr	Val	Thr	Met	Asp	Thr	Val	Arg	Asn
	1				5					10					15	
	His	Asn	Met	Pro	Asp	Asp	Ala	Trp	Cys	Ala	Ile	His	Gly	Thr	Val	Tyr
				20					25					30		
25	Asp	Ile	Thr	Lys	Phe	Ser	Lys	Val	His	Pro	Gly	Gly	Asp	Ile	Ile	Met
			35					40					45			
	Leu	Ala	Ala	Gly	Lys	Glu	Ala	Thr	Ile	Leu	Phe	Glu	Thr	Tyr	His	Ile
		50					55					60				
30	Lys	Gly	Val	Pro	Asp	Ala	Val	Leu	Arg	Lys	Tyr	Lys	Val	Gly	Lys	Leu
	65					70					75					80
	Pro	Gln	Gly	Lys	Lys	Gly	Glu	Thr	Ser	His	Met	Pro	Thr	Gly	Leu	Asp
				85						90					95	
	Ser	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Trp	Asp	Ser	Glu	Phe	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg
35				100					105					110		
	Glu	Arg	Val	Ala	Lys	Lys	Leu	Ala	Glu	Pro	Gly	Leu	Met	Gln	Arg	Ala
			115					120					125			
	Arg	Met	Glu	Leu	Trp	Ala	Lys	Ala	Ile	Phe	Leu	Leu	Ala	Gly	Phe	Trp
		130					135						140			
40	Gly	Ser	Leu	Tyr	Ala	Met	Cys	Val	Leu	Asp	Pro	His	Gly	Gly	Ala	Met
	145					150					155					160
	Val	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Gly	Val	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	Cys
				165						170					175	
45	Ile	Gln	His	Asp	Gly	Ser	His	Gly	Ala	Phe	Ser	Lys	Ser	Arg	Phe	Met
			180						185					190		
	Asn	Lys	Ala	Ala	Gly	Trp	Thr	Leu	Asp	Met	Ile	Gly	Ala	Ser	Ala	Met
			195					200					205			
	Thr	Trp	Glu	Met	Gln	His	Val	Leu	Gly	His	His	Pro	Tyr	Thr	Asn	Leu
50		210					215						220			
	Ile	Glu	Met	Glu	Asn	Gly	Leu	Ala	Lys	Val	Lys	Gly	Ala	Asp	Val	Asp
	225					230						235				240
	Pro	Lys	Lys	Val	Asp	Gln	Glu	Ser	Asp	Pro	Asp	Val	Phe	Ser	Thr	Tyr
				245						250					255	
55	Pro	Met	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Trp	His	Arg	Gln	Arg	Phe	Tyr	His	Lys
				260						265					270	
	Phe	Gln	His	Leu	Tyr	Ala	Pro	Leu	Ile	Phe	Gly	Phe	Met	Thr	Ile	Asn
			275					280					285			
60	Lys	Val	Ile	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	Val	Val	Leu	Arg	Lys	Arg	Leu	Phe
		290					295					300				
	Gln	Ile	Asp	Ala	Asn	Cys	Arg	Tyr	Gly	Ser	Pro	Trp	Asn	Val	Ala	Arg
	305					310						315				320
	Phe	Trp	Ile	Met	Lys	Leu	Leu	Thr	Thr	Leu	Tyr	Met	Val	Ala	Leu	Pro
				325						330					335	
65	Met	Tyr	Met	Gln	Gly	Pro	Ala	Gln	Gly	Leu	Lys	Leu	Phe	Phe	Met	Ala

ES 2 310 204 T3

340 345 350
 His Phe Thr Cys Gly Glu Val Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn His
 355 360 365
 5 Ile Ile Glu Gly Val Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ala Val Lys Gly Val
 370 375 380
 Met Ala Pro Pro Arg Thr Val His Gly Val Thr Pro Met Gln Val Thr
 385 390 395 400
 10 Gln Lys Ala Leu Ser Ala Ala Glu Ser Thr Lys Ser Asp Ala Asp Lys
 405 410 415
 Thr Thr Met Ile Pro Leu Asn Asp Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr
 420 425 430
 Ser Val Asn Trp Ala Val Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly
 435 440 445
 15 Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His Cys Phe Pro Gln Asn Pro His
 450 455 460
 Thr Val Asn Val Tyr Ile Ser Gly Ile Val Lys Glu Thr Cys Glu Glu
 465 470 475 480
 20 Tyr Gly Val Pro Tyr Gln Ala Glu Ile Ser Leu Phe Ser Ala Tyr Phe
 485 490 495
 Lys Met Leu Ser His Leu Arg Thr Leu Gly Asn Glu Asp Leu Thr Ala
 500 505 510
 25 Trp Ser Thr
 515

<210> 21

<211> 515

30 <212> PRT

<213> *Thraustochytrium aureum*

<400> 21

35 Met Thr Val Gly Phe Asp Glu Thr Val Thr Met Asp Thr Val Arg Asn
 1 5 10 15
 His Asn Met Pro Asp Asp Ala Trp Cys Ala Ile His Gly Thr Val Tyr
 20 25 30
 40 Asp Ile Thr Lys Phe Ser Lys Val His Pro Gly Gly Asp Ile Ile Met
 35 40 45
 Leu Ala Ala Gly Lys Glu Ala Thr Ile Leu Phe Glu Thr Tyr His Ile
 50 55 60
 45 Lys Gly Val Pro Asp Ala Val Leu Arg Lys Tyr Lys Val Gly Lys Leu
 65 70 75 80
 Pro Gln Gly Lys Lys Gly Glu Thr Ser His Met Pro Thr Gly Leu Asp
 85 90 95
 50 Ser Ala Ser Tyr Tyr Ser Trp Asp Ser Glu Phe Tyr Arg Val Leu Arg
 100 105 110
 Glu Arg Val Ala Lys Lys Leu Ala Glu Pro Gly Leu Met Gln Arg Ala
 115 120 125
 Arg Met Glu Leu Trp Ala Lys Ala Ile Phe Leu Leu Ala Gly Phe Trp
 130 135 140
 55 Gly Ser Leu Tyr Ala Met Cys Val Leu Asp Pro His Gly Gly Ala Met
 145 150 155 160
 Val Ala Ala Val Thr Leu Gly Val Phe Ala Ala Phe Val Gly Thr Cys
 165 170 175
 60 Ile Gln His Asp Gly Ser His Gly Ala Phe Ser Lys Ser Arg Phe Met
 180 185 190
 Asn Lys Ala Ala Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met
 195 200 205
 65 Thr Trp Glu Met Gln His Val Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Leu

ES 2 310 204 T3

	210		215		220												
	Ile	Glu	Met	Glu	Asn	Gly	Leu	Ala	Lys	Val	Lys	Gly	Ala	Asp	Val	Asp	
	225					230					235					240	
5	Pro	Lys	Lys	Val	Asp	Gln	Glu	Ser	Asp	Pro	Asp	Val	Phe	Ser	Thr	Tyr	
					245					250					255		
	Pro	Met	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Trp	His	Arg	Gln	Arg	Phe	Tyr	His	Lys	
				260					265					270			
10	Phe	Gln	His	Leu	Tyr	Ala	Pro	Phe	Ile	Phe	Gly	Ser	Met	Thr	Ile	Asn	
			275					280					285				
	Lys	Val	Ile	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	Val	Val	Leu	Arg	Lys	Arg	Leu	Phe	
			290				295					300					
	Gln	Ile	Asp	Ala	Asn	Cys	Arg	Tyr	Gly	Ser	Pro	Trp	Tyr	Val	Ala	Arg	
15	305					310					315					320	
	Phe	Trp	Ile	Met	Lys	Leu	Leu	Thr	Thr	Leu	Tyr	Met	Val	Ala	Leu	Pro	
				325						330					335		
	Met	Tyr	Met	Gln	Gly	Pro	Ala	Gln	Gly	Leu	Lys	Leu	Phe	Phe	Met	Ala	
				340					345					350			
20	His	Phe	Thr	Cys	Gly	Glu	Val	Leu	Ala	Thr	Met	Phe	Ile	Val	Asn	His	
			355					360					365				
	Ile	Ile	Glu	Gly	Val	Ser	Tyr	Ala	Ser	Lys	Asp	Ala	Val	Lys	Gly	Val	
			370				375					380					
25	Met	Ala	Pro	Pro	Arg	Thr	Val	His	Gly	Val	Thr	Pro	Met	Gln	Val	Thr	
	385					390						395				400	
	Gln	Lys	Ala	Leu	Ser	Ala	Ala	Glu	Ser	Ala	Lys	Ser	Asp	Ala	Asp	Lys	
				405						410					415		
	Thr	Thr	Met	Ile	Pro	Leu	Asn	Asp	Trp	Ala	Ala	Val	Gln	Cys	Gln	Thr	
				420					425					430			
30	Ser	Val	Asn	Trp	Ala	Val	Gly	Ser	Trp	Phe	Trp	Asn	His	Phe	Ser	Gly	
			435					440					445				
	Gly	Leu	Asn	His	Gln	Ile	Glu	His	His	Cys	Phe	Pro	Gln	Asn	Pro	His	
			450				455					460					
35	Thr	Val	Asn	Val	Tyr	Ile	Ser	Gly	Ile	Val	Lys	Glu	Thr	Cys	Glu	Glu	
	465					470					475					480	
	Tyr	Gly	Val	Pro	Tyr	Gln	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	Phe	Ser	Ala	Tyr	Phe	
				485						490					495		
40	Lys	Met	Leu	Ser	His	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Asn	Glu	Asp	Leu	Thr	Ala	
				500					505					510			
	Trp	Ser	Thr														
			515														

45 <210> 22
 <211> 879
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 50 <400> 22

	atggagcagc	tgaaggcctt	tgataatgaa	gtcaatgctt	tcttggacaa	catgtttgga	60
	ccacgagatt	ctcgagttcg	cggttggttc	ctgctggact	cttaccttcc	caccttcac	120
55	ctcaccatca	cgtacctgct	ctcgatatgg	ctgggtaaca	agtacatgaa	gaacaggcct	180
	gctctgtctc	tcaggggcat	cctcaccttg	tataacctcg	caatcacact	tctttctgcg	240
	tatatgctgg	tggagctcat	cctctccagc	tgggaaggag	gttacaactt	gcagtgtcag	300
	aatctcgaca	gtgcaggaga	aggtgatgtc	cggttagcca	aggtcttgtg	gtggtactac	360
	ttctccaaac	tagtggagtt	cctggacacg	atthttcttg	ttctacgaaa	aaagaccaat	420
60	cagatcacct	tccttcatgt	ctatcaccac	gcgtccatgt	tcaacatctg	gtggtgtggt	480
	ttgaaactga	taccttgtgg	tcaaagcttc	tttggaccca	ccctgaacag	ctttatccac	540
	attctcatgt	actcctaacta	cggcctgtct	gtgttcccg	ccatgcacaa	gtacctttgg	600
	tggaagaagt	acctcacaca	ggctcagctg	gtgcagttcg	tactcaccat	cacgcacacg	660
	ctgagtgccg	tggatgaagcc	ctgtggcttc	ccctttggct	gtctcatctt	ccagtcttcc	720
65	tatatgatga	cgtctggtcat	cctgtttctta	aacttctata	ttcagacata	ccggaaaaag	780
	ccagtgaaga	aagagctgca	agagaaagaa	gtgaagaatg	gtttccccaa	agcccactta	840
	attgtggcta	atggcatgac	ggacaagaag	gctcaataa			879

ES 2 310 204 T3

<210> 23

<211> 292

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 23

10 Met Glu Gln Leu Lys Ala Phe Asp Asn Glu Val Asn Ala Phe Leu Asp
 1 5 10 15
 Asn Met Phe Gly Pro Arg Asp Ser Arg Val Arg Gly Trp Phe Leu Leu
 20 25 30
 15 Asp Ser Tyr Leu Pro Thr Phe Ile Leu Thr Ile Thr Tyr Leu Leu Ser
 35 40 45
 Ile Trp Leu Gly Asn Lys Tyr Met Lys Asn Arg Pro Ala Leu Ser Leu
 50 55 60
 20 Arg Gly Ile Leu Thr Leu Tyr Asn Leu Ala Ile Thr Leu Leu Ser Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Leu Val Glu Leu Ile Leu Ser Ser Trp Glu Gly Gly Tyr Asn
 85 90 95
 Leu Gln Cys Gln Asn Leu Asp Ser Ala Gly Glu Gly Asp Val Arg Val
 100 105 110
 25 Ala Lys Val Leu Trp Trp Tyr Tyr Phe Ser Lys Leu Val Glu Phe Leu
 115 120 125
 Asp Thr Ile Phe Phe Val Leu Arg Lys Lys Thr Asn Gln Ile Thr Phe
 130 135 140
 30 Leu His Val Tyr His His Ala Ser Met Phe Asn Ile Trp Trp Cys Val
 145 150 155 160
 Leu Asn Trp Ile Pro Cys Gly Gln Ser Phe Phe Gly Pro Thr Leu Asn
 165 170 175
 35 Ser Phe Ile His Ile Leu Met Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu Ser Val Phe
 180 185 190
 Pro Ser Met His Lys Tyr Leu Trp Trp Lys Lys Tyr Leu Thr Gln Ala
 195 200 205
 40 Gln Leu Val Gln Phe Val Leu Thr Ile Thr His Thr Leu Ser Ala Val
 210 215 220
 Val Lys Pro Cys Gly Phe Pro Phe Gly Cys Leu Ile Phe Gln Ser Ser
 225 230 235 240
 Tyr Met Met Thr Leu Val Ile Leu Phe Leu Asn Phe Tyr Ile Gln Thr
 245 250 255
 45 Tyr Arg Lys Lys Pro Val Lys Lys Glu Leu Gln Glu Lys Glu Val Lys
 260 265 270
 Asn Gly Phe Pro Lys Ala His Leu Ile Val Ala Asn Gly Met Thr Asp
 275 280 285
 50 Lys Lys Ala Gln
 290

<210> 24

55 <211> 754

<212> ADN

<213> *Schizochytrium aggregatum*

60 <400> 24

ccagtgtgct ggaattcagg tactactact araccatact tacacgaacc tgatecgat

60

65

ES 2 310 204 T3

```

ggagaacggc acccaaaagg tcaccaacgc cgacgtcgac cccaagaagg cgcaccagga      120
gagcgaccgc gacgtcttca gcacctaccc catgtctcgt ctgcaccctg ggcaccgcaa      180
gcgcttctac caccgcttcc agcacctgta cgcgcgcgtg ctcttcggtt tcatgaccat      240
caacaagggtg atcaccacagg atgtggggagt tgtcctcagc aagcgtctgt ttcagatcga      300
5  tgccaactgc cgttacgccca gcaagtogta cgttgcgcgc ttctggatca tgaagctgct      360
caccgtcctc tacatggtcg ccctccccgt gtacaccagc gcccttgtcg acgggctcaa      420
gctcttcttc atcgcccact tttcgtgcgg cgagctgctg gccaccatgt tcatcgtcaa      480
ccacatcacc gagggcgtct cgtacgcctc caaggactct gtcaagggca ccatggcgcc      540
gccgcgcaag gtgcacggcg tgaccccgat gcatgacacc cgcgacgcgc tcggcaagga      600
10 gaaggcagcc accaagcacg tgccgctcaa cgactgggcc gcggtccagt gccagacctc      660
ggtcaactgg tcgatcggct cgtggttctg gaaccacttc tccggcgggc tcaaccacca      720
gatcgaacac caccttttcc ccatgatgat gatg                                     754

```

15 <210> 25

<211> 251

<212> PRT

<213> *Schizochytrium aggregatum*

20

<400> 25

```

      Gln Cys Ala Gly Ile Gln Val Leu Leu Leu His His Thr Tyr Thr Asn
      1          5          10          15
25  Leu Ile Glu Met Glu Asn Gly Thr Gln Lys Val Thr His Ala Asp Val
      20          25          30
      Asp Pro Lys Lys Ala Asp Gln Glu Ser Asp Pro Asp Val Phe Ser Thr
      35          40          45
30  Tyr Pro Met Leu Arg Leu His Pro Trp His Arg Lys Arg Phe Tyr His
      50          55          60
      Arg Phe Gln His Leu Tyr Ala Pro Leu Leu Phe Gly Phe Met Thr Ile
      65          70          75          80
      Asn Lys Val Ile Thr Gln Asp Val Gly Val Val Leu Ser Lys Arg Leu
      85          90          95
35  Phe Gln Ile Asp Ala Asn Cys Arg Tyr Ala Ser Lys Ser Tyr Val Ala
      100          105          110
      Arg Phe Trp Ile Met Lys Leu Leu Thr Val Leu Tyr Met Val Ala Leu
      115          120          125
40  Pro Val Tyr Thr Gln Gly Leu Val Asp Gly Leu Lys Leu Phe Phe Ile
      130          135          140
      Ala His Phe Ser Cys Gly Glu Leu Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn
      145          150          155          160
45  His Ile Ile Glu Gly Val Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ser Val Lys Gly
      165          170          175
      Thr Met Ala Pro Pro Arg Thr Val His Gly Val Thr Pro Met His Asp
      180          185          190
      Thr Arg Asp Ala Leu Gly Lys Glu Lys Ala Ala Thr Lys His Val Pro
      195          200          205
50  Leu Asn Asp Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr Ser Val Asn Trp Ser
      210          215          220
      Ile Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly Gly Leu Asn His Gln
      225          230          235          240
55  Ile Glu His His Leu Phe Pro Met Met Met Met
      245          250

```

<210> 26

60 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Cebador RO1240

ES 2 310 204 T3

<400> 26
ccctcgaatga tgggttgac gatgaac 27
5 <210> 27
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> Cebador anidado 5' RO1239
15 <400> 27
cggagcatgg ggtaggtgct gaagac 26
20 <210> 28
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> Cebador RO1236
30 <400> 28
ccaactgccg ttacgccagc aagt 24
35 <210> 29
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
40 <220>
<223> Cebador anidado 3' RO1237
45 <400> 29
caagctcttc tcatcgccc actttcg 28
50 <210> 30
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
55 <220>
<223> Cebador RO1240 y cebador 5' de GeneRacer
60 <400> 30
cgactggagc acgaggacac tga 23
65 <210> 31
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 310 204 T3

<220>

<223> Cebador RO1236 y cebador 3' de GeneRacer

5 <400> 31

gctgtcaacg atacgctacg taacg 25

<210> 32

10 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador anidado RO1239 y cebador 5' anidado de GeneRacer

20 <400> 32

ggacactgac atggactgaa ggagta 26

<210> 33

25 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador anidado RO1237 y cebador 3' anidado de GeneRacer

<400> 33

35

cgctacgtaa cggcatgaca gtg 23

<210> 34

<211> 34

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Cebador RO1241

<400> 34

50

gatatcgaat tcatgacggt gggcggcgat gagg 34

<210> 35

<211> 34

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60

<223> Cebador RO1242

<400> 35

65

gtacttaagc ttctacttgg acttggggtg gtcc 34

<210> 36

ES 2 310 204 T3

<211> 1530

<212> ADN

<213> *Schizochytrium aggregatum*

5

<400> 36

```

    atgacggtag gggcgatga ggtgtacagc atggcgcagg tgcgcgacca caacaccccg      60
    gacgagcctt ggtgcgccat ccacggcgag gtgtacgagc tgaccaagtt cgcccgcacc      120
10  caccocgggg gggacatcat ctgtctggcc gccggcaagg aggccacat cctgttogag      180
    acgtaccacg tgcgccccat ctccgacgcg gtccctgcga agtaccgcat cggcaagctc      240
    gccgcgcgcg gcaaggatga gccggccaac gacagcacct actacagctg ggacagcgac      300
    ttttacaagg tgetecgcca gcgtgtcgtg gcgcgcctcg aggagcgcaa gatcgcccgc      360
15  cgcggcgggc ccgagatctg gatcaaggcc gccatectcg tcagcggctt ctggtccatg      420
    ctctacctca tgtgcaacct ggacccgaac cgcggcgcca tcctggccgc catcgcgctg      480
    ggcacgctcg ccgccttctt cggcacgtgc attcagcacg acggcaacca cggcgcggtt      540
    gcctttctctc cgttcatgaa caagctctct ggctggacgc tcgacatgat cggcgccagt      600
    gccatgacct gggagatgca gcacgtgctt ggccaccacc cgtacacca cctgatcgag      660
20  atggagaacg gcacccaaaa ggtcacccac gccgacgtcg accccaagaa ggccgaccag      720
    gagagcgacc cggacgtctt cagcacctac cccatgctcc gtctgcaccc gtggcacccg      780
    aagcgtctct accaccgctt ccagcacctg tacgcgcgcg tgetcttcgg tttcatgacc      840
    atcaacaagg tgatcaccca ggatgtggga gttgtctca gcaagcgtct gtttcagatc      900
    gatgccaaact gccgttacgc cagcaagctg tacggttgcg gcttctggat catgaagctg      960
25  ctcaaccgtc tctacatggt cgcctcccc gtgtacaccc agggccttgt cgacgggctc      1020
    aagctctctt tcategceca cttttogtgc ggcgagctgc tggccacat gttcatcgtc      1080
    aaccacatca tcgagggcgt ctgtagcgc tccaaggact ctgtcaaggg caccatggcg      1140
    ccgcccgcga cggtgacgg cgtgaccccg atgcatgaca cccgcgacgc gctcggcaag      1200
    gagaaggcag ccaccaagca cgtgccgctc aacgactggg ccgcggtcca gtgccagacc      1260
30  tcgggtcaact ggtcgatcgg ctctgtggtc tggaaacct tctccggcgg gctcaaccac      1320
    cagatcgagc accacctctt ccccgccctc acccacacca cctacgtgta cattcaggat      1380
    gtgggtgcagg cgacgtgcgc cgagtagcgg gtcccgtacc agtcggagca gaggcctctc      1440
    tccgcctact tcaagatget ctcccacctt cgggcgctcg gcaacgagcc gatgccctcg      1500
35  tgggagaagg accaccccaa gtccaagtga

```

<210> 37

<211> 509

<212> PRT

40

<213> *Schizochytrium aggregatum*

<400> 37

```

45  Met Thr Val Gly Gly Asp Glu Val Tyr Ser Met Ala Gln Val Arg Asp
     1  His Asn Thr Pro Asp Asp Ala Trp Cys Ala Ile His Gly Glu Val Tyr
     20  Glu Leu Thr Lys Phe Ala Arg Thr His Pro Gly Gly Asp Ile Ile Leu
50  Leu Ala Ala Gly Lys Glu Ala Thr Ile Leu Phe Glu Thr Tyr His Val
     35  Arg Pro Ile Ser Asp Ala Val Leu Arg Lys Tyr Arg Ile Gly Lys Leu
     50  Ala Ala Ala Gly Lys Asp Glu Pro Ala Asn Asp Ser Thr Tyr Tyr Ser
55  Trp Asp Ser Asp Phe Tyr Lys Val Leu Arg Gln Arg Val Val Ala Arg
     65  Leu Glu Glu Arg Lys Ile Ala Arg Arg Gly Gly Pro Glu Ile Trp Ile
     80  Lys Ala Ala Ile Leu Val Ser Gly Phe Trp Ser Met Leu Tyr Leu Met
60  Cys Thr Leu Asp Pro Asn Arg Gly Ala Ile Leu Ala Ala Ile Ala Leu
     95  Gly Ile Val Ala Ala Phe Val Gly Thr Cys Ile Gln His Asp Gly Asn
     110  His Gly Ala Phe Ala Phe Ser Pro Phe Met Asn Lys Leu Ser Gly Trp
65  Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met Thr Trp Glu Met Gln His
     125  Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met Thr Trp Glu Met Gln His
     140  Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met Thr Trp Glu Met Gln His
     155  Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met Thr Trp Glu Met Gln His
     170  Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met Thr Trp Glu Met Gln His
     185  Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met Thr Trp Glu Met Gln His
     200  Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met Thr Trp Glu Met Gln His

```

ES 2 310 204 T3

		195				200				205						
	Val	Leu	Gly	His	His	Pro	Tyr	Thr	Asn	Leu	Ile	Glu	Met	Glu	Asn	Gly
		210					215					220				
5	Thr	Gln	Lys	Val	Thr	His	Ala	Asp	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Ala	Asp	Gln
	225					230					235					240
	Glu	Ser	Asp	Pro	Asp	Val	Phe	Ser	Thr	Tyr	Pro	Met	Leu	Arg	Leu	His
					245					250					255	
10	Pro	Trp	His	Arg	Lys	Arg	Phe	Tyr	His	Arg	Phe	Gln	His	Leu	Tyr	Ala
			260					265						270		
	Pro	Leu	Leu	Phe	Gly	Phe	Met	Thr	Ile	Asn	Lys	Val	Ile	Thr	Gln	Asp
			275					280					285			
15	Val	Gly	Val	Val	Leu	Ser	Lys	Arg	Leu	Phe	Gln	Ile	Asp	Ala	Asn	Cys
		290					295					300				
	Arg	Tyr	Ala	Ser	Lys	Ser	Tyr	Val	Ala	Arg	Phe	Trp	Ile	Met	Lys	Leu
	305					310					315					320
	Leu	Thr	Val	Leu	Tyr	Met	Val	Ala	Leu	Pro	Val	Tyr	Thr	Gln	Gly	Leu
					325					330					335	
20	Val	Asp	Gly	Leu	Lys	Leu	Phe	Phe	Ile	Ala	His	Phe	Ser	Cys	Gly	Glu
			340						345					350		
	Leu	Leu	Ala	Thr	Met	Phe	Ile	Val	Asn	His	Ile	Ile	Glu	Gly	Val	Ser
			355				360						365			
25	Tyr	Ala	Ser	Lys	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Thr	Met	Ala	Pro	Pro	Arg	Thr
		370					375					380				
	Val	His	Gly	Val	Thr	Pro	Met	His	Asp	Thr	Arg	Asp	Ala	Leu	Gly	Lys
	385					390					395					400
	Glu	Lys	Ala	Ala	Thr	Lys	His	Val	Pro	Leu	Asn	Asp	Trp	Ala	Ala	Val
					405					410					415	
30	Gln	Cys	Gln	Thr	Ser	Val	Asn	Trp	Ser	Ile	Gly	Ser	Trp	Phe	Trp	Asn
				420					425					430		
	His	Phe	Ser	Gly	Gly	Leu	Asn	His	Gln	Ile	Glu	His	His	Leu	Phe	Pro
			435				440						445			
35	Gly	Leu	Thr	His	Thr	Thr	Tyr	Val	Tyr	Ile	Gln	Asp	Val	Val	Gln	Ala
		450					455					460				
	Thr	Cys	Ala	Glu	Tyr	Gly	Val	Pro	Tyr	Gln	Ser	Glu	Gln	Ser	Leu	Phe
	465					470					475					480
	Ser	Ala	Tyr	Phe	Lys	Met	Leu	Ser	His	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Asn	Glu
				485						490					495	
40	Pro	Met	Pro	Ser	Trp	Glu	Lys	Asp	His	Pro	Lys	Ser	Lys			
				500					505							

45 <210> 38

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Cebador R01201

55 <400> 38

cggtgtcgt gcctttgtcg gaacttgcac cc 32

<210> 39

60 <211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Cebador R01202

ES 2 310 204 T3

<400> 39
 ttgacaataa acatggaggc gaggacctct ccg 33

5 <210> 40
 <211> 30
 <212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador RO1210

15 <400> 40
 gctggttgga cttggacat gattgatcc 30

20 <210> 41
 <211> 30
 <212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador R01211

30 <400> 41
 tacattggca ggccaacccat gtagagaacg 30

35 <210> 42
 <211> 30
 <212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador interno RO1214

45 <400> 42
 ggattcaatc atgtcaaag tccaaccagc 30

50 <210> 43
 <211> 34
 <212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 5' R01223

60 <400> 43
 tctgatgaat tcatgacggc cggattgaa gaag 34

65 <210> 44
 <211> 35
 <212> ADN

ES 2 310 204 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador 3' RO1224

<400> 44

10 gctagctcg agtagtct tgcaccaggc aggca 35

<210> 45

<211> 1542

<212> ARN

15 <213> *Thraustochytrium aureum*

<400> 45

```

20 atgacggccg gatttgaaga agtgatcacc atgaagcagg tgaaggaccg gaatacgccg      60
   gacgatgcgt ggtgcgtggt gcatggcaag gtgtacgaca tcaccaagtt caagaacgct      120
   cccccgggtg gagatataat catggttggcg gctggcaagg acgccaccat cctgttcgag      180
   acttaccaca tccgcggtgt gcccgatgcc gtgttgcgca agtatcagat cggcaaaact      240
   ccggacggaa agaacaaaga gggcggcaac ggctcgata gcgcctcgta ctactcctgg      300
25 gacagcgagt ttaccgcgt ccttcgcgag cgcgtcttga agcgcctgaa cgagctcaag      360
   ctgtccagac gcggaggctt cgagatttgg gccaaaggcta tctttctctt gaccggettc      420
   tggctttgcc tctacctcat gtgcacactc aacccaaatg ggcttgcgat tcctgcccgc      480
   atgatgttgg gaatccttgc tgccttcgta ggaacctgca ttcagcacga cgggaatcac      540
   ggtgcgtteg cccaatcttc gtggettaac aaggccgctg gttggacttt ggacatgatt      600
30 ggatccagcg ccatgacctg ggagatgcag cacgtgcttg gacatcatcc gtacaccaac      660
   ttgattgaaa tggagaatgg caatcaaaag gtctccggca agcctgttga caccaagact      720
   gtcgaccagg agagcgaccc tgatgtcttt agcacctacc ctatgcttcg ccttcaccct      780
   tggcacagca aaaagtggta ccacaaatac cagcacatct atgcaccatt catctttggg      840
   ttcattgacca tcaacaaggt cattgcacag gacgttggcg ttatcacacg caagcgtctc      900
35 ttccagattg acgccaaactg ccgctacgct tctccgactt acgtegctcg cttctggatc      960
   atgaaggttc ttaccgttct ctacatggtt ggctgcgcaa tgtacatgca aggtccatgg     1020
   gagggtctca agttgttctt tattgvcgac tttacttgcg gcgagctgct ggccacaatg     1080
   ttcattcgtaa accacatcat cgaggggtgct agctacgcaa gcaaagatgc catcaagggc     1140
   gagatggctc caccgaaaac ggtccgcggt gtcaccccaa tgcacgagac gaaaaggtt     1200
40 ctcgaccagc gcgagaaaaga catggacgaa acttctaaga agagccgcat cctctcaac     1260
   gactgggccc ctgtacagtg ccagaccacc gtgaactggg ctatcggttc ttggttctgg     1320
   aaccactttt ccgggggctt caatcatcag attgagcadc atctgttccc cggcttgact     1380
   cacaccacct atgttcaact tcacgatgtg gtcaaagata cttgcgctga gtacgggggt     1440
   ceataccagc acgaggagag tctatacact gcctacttta agatgttgaa tcatctcaag     1500
45 accctaggca acgagccaat gcctgcctgg gacaagaact aa                          1542

```

<210> 46

<211> 513

<212> PRT

50 <213> *Thraustochytrium aureum*

<400> 46

```

55 Met Thr Ala Gly Phe Glu Glu Val Ile Thr Met Lys Gln Val Lys Asp
   1 Arg Asn Thr Pro Asp Asp Ala Trp Cys Val Val His Gly Lys Val Tyr
   Asp Ile Thr 20 Phe Lys Asn Ala 25 His Pro Gly Gly Asp 30 Ile Ile Met
   Leu Ala Ala Gly Lys Asp Ala Thr Ile Leu Phe Glu Thr Tyr His Ile
60 50 Arg Gly Val Pro Asp Ala Val Leu Arg Lys Tyr Gln Ile Gly Lys Leu
   65 Pro Asp Gly Lys Asn Lys Glu Gly Gly Asn Gly Leu Asp Ser Ala Ser
   Tyr Tyr Ser Trp Asp Ser Glu Phe Tyr Arg Val Leu Arg Glu Arg Val
65 85 Leu Lys Arg Leu Asn Glu Leu Lys Leu Ser Arg Arg Gly Gly Phe Glu
   100

```

ES 2 310 204 T3

		115				120					125					
	Ile	Trp	Ala	Lys	Ala	Ile	Phe	Leu	Leu	Thr	Gly	Phe	Trp	Ser	Cys	Leu
		130					135					140				
5	Tyr	Leu	Met	Cys	Thr	Leu	Asn	Pro	Asn	Gly	Leu	Ala	Ile	Pro	Ala	Ala
	145					150					155					160
	Met	Met	Leu	Gly	Ile	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	Cys	Ile	Gln	His
					165					170					175	
10	Asp	Gly	Asn	His	Gly	Ala	Phe	Ala	Gln	Ser	Ser	Trp	Leu	Asn	Lys	Ala
				180					185					190		
	Ala	Gly	Trp	Thr	Leu	Asp	Met	Ile	Gly	Ser	Ser	Ala	Met	Thr	Trp	Glu
				195				200					205			
	Met	Gln	His	Val	Leu	Gly	His	His	Pro	Tyr	Thr	Asn	Leu	Ile	Glu	Met
		210					215					220				
15	Glu	Asn	Gly	Asn	Gln	Lys	Val	Ser	Gly	Lys	Pro	Val	Asp	Thr	Lys	Thr
	225					230					235					240
	Val	Asp	Gln	Glu	Ser	Asp	Pro	Asp	Val	Phe	Ser	Thr	Tyr	Pro	Met	Leu
					245					250					255	
20	Arg	Leu	His	Pro	Trp	His	Ser	Lys	Lys	Trp	Tyr	His	Lys	Tyr	Gln	His
				260						265				270		
	Ile	Tyr	Ala	Pro	Phe	Ile	Phe	Gly	Phe	Met	Thr	Ile	Asn	Lys	Val	Ile
			275					280					285			
25	Ala	Gln	Asp	Val	Gly	Val	Ile	Thr	Arg	Lys	Arg	Leu	Phe	Gln	Ile	Asp
		290					295					300				
	Ala	Asn	Cys	Arg	Tyr	Ala	Ser	Pro	Thr	Tyr	Val	Ala	Arg	Phe	Trp	Ile
	305					310					315					320
	Met	Lys	Val	Leu	Thr	Val	Leu	Tyr	Met	Val	Gly	Leu	Pro	Met	Tyr	Met
					325					330					335	
30	Gln	Gly	Pro	Trp	Glu	Gly	Leu	Lys	Leu	Phe	Phe	Ile	Ala	His	Phe	Thr
				340						345				350		
	Cys	Gly	Glu	Leu	Leu	Ala	Thr	Met	Phe	Ile	Val	Asn	His	Ile	Ile	Glu
			355					360				365				
35	Gly	Val	Ser	Tyr	Ala	Ser	Lys	Asp	Ala	Ile	Lys	Gly	Glu	Met	Ala	Pro
		370					375					380				
	Pro	Lys	Thr	Val	Arg	Gly	Val	Thr	Pro	Met	His	Glu	Thr	Gln	Lys	Val
	385					390					395					400
40	Leu	Asp	Gln	Arg	Glu	Lys	Asp	Met	Asp	Glu	Thr	Ser	Lys	Lys	Ser	Arg
				405						410					415	
	Ile	Pro	Leu	Asn	Asp	Trp	Ala	Ala	Val	Gln	Cys	Gln	Thr	Thr	Val	Asn
				420					425					430		
	Trp	Ala	Ile	Gly	Ser	Trp	Phe	Trp	Asn	His	Phe	Ser	Gly	Gly	Leu	Asn
		435						440					445			
45	His	Gln	Ile	Glu	His	His	Leu	Phe	Pro	Gly	Leu	Thr	His	Thr	Thr	Tyr
		450					455					460				
	Val	His	Phe	His	Asp	Val	Val	Lys	Asp	Thr	Cys	Ala	Glu	Tyr	Gly	Val
	465					470					475					480
50	Pro	Tyr	Gln	His	Glu	Glu	Ser	Leu	Tyr	Thr	Ala	Tyr	Phe	Lys	Met	Leu
				485						490					495	
	Asn	His	Leu	Lys	Thr	Leu	Gly	Asn	Glu	Pro	Met	Pro	Ala	Trp	Asp	Lys
				500					505					510		
55	Asn															

<210> 47

<211> 23

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Cebador directo M13

ES 2 310 204 T3

<400> 47

agcggataac aatttcacac agg 23

5 <210> 48

<211> 26

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador RO1270

15

<400> 48

cacctggctc gagtcgacga tgatgg 26

20 <210> 49

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador RO1286

30 <400> 49

cgtaccgggt gcaatagaag gtgag 25

35 <210> 50

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Cebador RO1287

45 <400> 50

ccatcatcgt cgactcgagc caggtg 26

50 <210> 51

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Cebador RO1288

60 <400> 51

tgaggagcca tgggtgctc gatctg 26

65 <210> 52

<211> 42

<212> ADN

ES 2 310 204 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador directo RO1400

<400> 52

tcaacagaat tcatgtgcaa cgcggcgag gtcgagacgc ag 42

10

<210> 53

<211> 42

<212> ADN

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso RO1401

20

<400> 53

aaaagaaagc ttttagtccg ccttgaccgt gtcgaccaa gc 42

25

<210> 54

<211> 1301

<212> ADN

30

<213> *Isochrysis galbana*

<400> 54

35	atgtgcaacg cggcgcaggt cgagacgcag gccttgccgc ccaaggaggc ggcaaaaccg	60
	acgtggacga agattcatgg gcgcacagtc gacgtggaga cgttccgcca cccagggcgc	120
	aacatcctcg atttgttctt gggcatggag ccacaactgc ctttgagacg ttccacggtc	180
	accacaagg agcatggaag atgctcaaga cgctgccga gaaggaggtc gccgcccgcg	240
	acattcccgc qcagaaggag gagcacgtgg ccgagatgac acgcctcatg gcctcatggc	300
40	gcgagcgcgg gctgttcaag ccgcgtcccg tgcctcctc catctatggc ctgtgcgtga	360
	tettcgcctat cgcggcatcg gtcgcgtgcg ctccgtacgc gccagtgcct gctggcatcg	420
	cggtgggac ctgctgggct cagtgcggct tcttgacga catggcggc caccgggagt	480
	gggggcgcac ttggtcgttt gcgtttcagc atctgtttga aggctgctc aaggggcggc	540
	cggcctcgtg gtggcgcaac cgccacaaca agcaccatgc caagaccaac gtgctcggcg	600
45	aggacggcga cctgcgcacc acacccttct tgcgatggga ccctactctg gccaaagaaag	660
	tgcccgactg gtctctgcgc acgcaagcct tcacctttct gccagcactg ggagcttacg	720
	tcttctctt tgccttcacg gtacgcaagt acagtgtggt gaagcgtctc tggcacgagg	780
	tcgcctgat ggtggcccac tacgctctct tttcctgggc gctcagcgc gccggcgcct	840
	ccctcagctc cggcctcacc ttctattgca ccgggtacgc ctggcagggc atctacctcg	900
50	gcttctctt cggcctatcg cactttgcgg tggagcgcgt gccgtcgacc gccacctggc	960
	tcgagtcgac gatgatgggc accgttgact ggggcggctc ctccgccttc tggggctacc	1020
	tctccgcctt cctcaatc cagatcgagc accacatggc tccacaaatg ccaatggaga	1080
	acctgcgcca gatccgggac gactgcaagg ccgcggccca caagttcggg ctgccgtacc	1140
	gcgagctgac attcgtcgcg gcgaccaagc tcatgatgag cggcctctac cggaccggca	1200
55	aggacgagct caagctgcgc gcggaccgcc gcaagttcac gagggcacag gcgtacatgg	1260
	gcgccgcccag cgttttggtc gacacgctca aggcggacta a	1301

<210> 55

60

<211> 433

<212> PRT

<213> *Isochrysis galbana*

65

ES 2 310 204 T3

<400> 55

5 Met Cys Asn Ala Ala Gln Val Glu Thr Gln Ala Leu Arg Ala Lys Glu
 1 5 10 15
 Ala Ala Lys Pro Thr Trp Thr Lys Ile His Gly Arg Thr Val Asp Val
 20 30
 Glu Thr Phe Arg His Pro Gly Gly Asn Ile Leu Asp Leu Phe Leu Gly
 35 40 45
 10 Met Asp Ala Thr Thr Ala Phe Glu Thr Phe His Gly His His Lys Gly
 50 55 60
 Ala Trp Lys Met Leu Lys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Val Ala Ala Ala
 65 70 75 80
 Asp Ile Pro Ala Gln Lys Glu Glu His Val Ala Glu Met Thr Arg Leu
 85 90 95
 Met Ala Ser Trp Arg Glu Arg Gly Leu Phe Lys Pro Arg Pro Val Ala
 100 105 110
 20 Ser Ser Ile Tyr Gly Leu Cys Val Ile Phe Ala Ile Ala Ala Ser Val
 115 120 125
 Ala Cys Ala Pro Tyr Ala Pro Val Leu Ala Gly Ile Ala Val Gly Thr
 130 135 140
 25 Cys Trp Ala Gln Cys Gly Phe Leu Gln His Met Gly Gly His Arg Glu
 145 150 155 160
 Trp Gly Arg Thr Trp Ser Phe Ala Phe Gln His Leu Phe Glu Gly Leu
 165 170 175
 30 Leu Lys Gly Gly Ser Ala Ser Trp Trp Arg Asn Arg His Asn Lys His
 180 185 190
 His Ala Lys Thr Asn Val Leu Gly Glu Asp Gly Asp Leu Arg Thr Thr
 195 200 205
 Pro Phe Phe Ala Trp Asp Pro Thr Leu Ala Lys Lys Val Pro Asp Trp
 210 215 220
 35 Ser Leu Arg Thr Gln Ala Phe Thr Phe Leu Pro Ala Leu Gly Ala Tyr
 225 230 235 240
 Val Phe Val Phe Ala Phe Thr Val Arg Lys Tyr Ser Val Val Lys Arg
 245 250 255
 40 Leu Trp His Glu Val Ala Leu Met Val Ala His Tyr Ala Leu Phe Ser
 260 265 270
 Trp Ala Leu Ser Ala Ala Gly Ala Ser Leu Ser Ser Gly Leu Thr Phe
 275 280 285
 Tyr Cys Thr Gly Tyr Ala Trp Gln Gly Ile Tyr Leu Gly Phe Phe Phe
 290 295 300
 45 Gly Leu Ser His Phe Ala Val Glu Arg Val Pro Ser Thr Ala Thr Trp
 305 310 315 320
 Leu Glu Ser Thr Met Met Gly Thr Val Asp Trp Gly Gly Ser Ser Ala
 325 330 335
 50 Phe Cys Gly Tyr Leu Ser Gly Phe Leu Asn Ile Gln Ile Glu His His
 340 345 350
 Met Ala Pro Gln Met Pro Met Glu Asn Leu Arg Gln Ile Arg Ala Asp
 355 360 365
 55 Cys Lys Ala Ala Ala His Lys Phe Gly Leu Pro Tyr Arg Glu Leu Thr
 370 375 380
 Phe Val Ala Ala Thr Lys Leu Met Met Ser Gly Leu Tyr Arg Thr Gly
 385 390 395 400
 Lys Asp Glu Leu Lys Leu Arg Ala Asp Arg Arg Lys Phe Thr Arg Ala
 405 410 415
 60 Gln Ala Tyr Met Gly Ala Ala Ser Ala Leu Val Asp Thr Leu Lys Ala
 420 425 430
 Asp

65 <210> 56

<211> 14

ES 2 310 204 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Motivo proteico nº 1
 <400> 56

10
 Val Tyr Asp Val Thr Glu Trp Val Lys Arg His Pro Gly Gly
 1 5 10

15 <210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Motivo proteico nº 2

25 <400> 57

30 Gly Ala Ser Ala Asn Trp Trp Lys His Gln His Asn Val His His
 1 5 10 15

<210> 58
 <211> 12
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Motivo proteico nº 3
 <400> 58

45 Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met
 1 5 10

50 <210> 59
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Thraustochytrium aureum*

55 <400> 59

 Gln His Asp Gly Ser His
 1 5

60 <210> 60
 <211> 7
 65 <212> PRT
 <213> *Thraustochytrium aureum*

ES 2 310 204 T3

<400> 60

5 Gln His Val Leu Gly His His
 1 5

<210> 61

10 <211> 4

<212> PRT

<213> *Thraustochytrium aureum*

15 <400> 61

 His Pro Trp His
 1

20

<210> 62

<211> 5

25 <212> PRT

<213> *Thraustochytrium aureum*

<400> 62

30

 His Lys Phe Gln His
 1 5

35 <210> 63

<211> 6

<212> PRT

40 <213> *Thraustochytrium aureum*

<400> 63

45 His Gln Ile Glu His His
 1 5

<210> 64

50 <211> 7

<212> PRT

<213> *Dictyostelium discoideum*

55 <400> 64

60 Gln His Val Ile Gly His His
 1 5

<210> 65

65 <211> 6

<212> PRT

<213> *Dictyostelium discoideum*

ES 2 310 204 T3

<400> 65

5 His Gln Val Val His His
1 5

<210> 66

10 <211> 7

<212> PRT

<213> *Mortierella alpina*

15 <400> 66

20 Gln His Met Leu Gly His His
1 5

<210> 67

<211> 6

25 <212> PRT

<213> Desconocida

<220>

30 <223> *Synechocystis* (especie desconocida)

<400> 67

35 His Gln Val Thr His His
1 5

40 <210> 68

<211> 335

<212> PRT

45 <213> *Schizochytrium aggregatum*

<220>

<221> VARIANTE

50 <222> (335)...(335)

<223> Xaa = Desconocido u otro en posición 335

55

60

65

ES 2 310 204 T3

<400> 68

5 Ser His Gly Ala Phe Ser Lys Ser Arg Phe Met Asn Lys Ala Ala Gly
1 5 10 15
Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met Thr Trp Glu Met Gln
20 25 30
His Val Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Leu Ile Glu Met Glu Asn
35 40 45
10 Gly Leu Ala Lys Val Lys Gly Ala Asp Val Asp Pro Lys Lys Val Asp
50 55 60
Gln Glu Ser Asp Pro Asp Val Phe Ser Thr Tyr Pro Met Leu Arg Leu
65 70 75 80
15 His Pro Trp His Arg Gln Arg Phe Tyr His Lys Phe Gln His Leu Tyr
85 90 95
Ala Pro Leu Ile Phe Gly Phe Met Thr Ile Asn Lys Val Ile Ser Gln
100 105 110
20 Asp Val Gly Val Val Leu Arg Lys Arg Leu Phe Gln Ile Asp Ala Asn
115 120 125
Cys Arg Tyr Gly Ser Pro Trp Asn Val Ala Arg Phe Trp Ile Met Lys
130 135 140
25 Leu Leu Thr Thr Leu Tyr Met Val Ala Leu Pro Met Tyr Met Gln Gly
145 150 155 160
Pro Ala Gln Gly Leu Lys Leu Phe Phe Met Ala His Phe Thr Cys Gly
165 170 175
30 Glu Val Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn His Ile Ile Glu Gly Val
180 185 190
Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ala Val Lys Gly Val Met Ala Pro Pro Arg
195 200 205
Thr Val His Gly Val Thr Pro Met Gln Val Thr Gln Lys Ala Leu Ser
210 215 220
35 Ala Ala Glu Ser Thr Lys Ser Asp Ala Asp Lys Thr Thr Met Ile Pro
225 230 235 240
Leu Asn Asp Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr Ser Val Asn Trp Ala
245 250 255
Val Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly Gly Leu Asn His Gln
260 265 270
40 Ile Glu His His Cys Phe Pro Gln Asn Pro His Thr Val Asn Val Tyr
275 280 285
Ile Ser Gly Ile Val Lys Glu Thr Cys Glu Glu Tyr Gly Val Pro Tyr
290 295 300
45 Gln Ala Glu Ile Ser Leu Phe Ser Ala Tyr Phe Lys Met Leu Ser His
305 310 315 320
Leu Arg Thr Leu Gly Asn Glu Asp Leu Thr Ala Trp Ser Thr Xaa
325 330 335

50

<210> 69

<211> 430

<212> PRT

55

<213> *Isochrysis galbana*

60

65

ES 2 310 204 T3

<400> 69

5 Met Cys Asn Ala Ala Gln Val Glu Thr Gln Ala Leu Arg Ala Lys Glu
 1 5 10
 Ala Ala Lys Pro Thr Trp Thr Lys Ile His Gly Arg Thr Val Asp Val
 20 25 30
 Glu Thr Phe Arg His Pro Gly Gly Asn Ile Leu Asp Leu Phe Leu Gly
 35 40 45
 10 Met Asp Ala Thr Thr Ala Phe Glu Thr Phe His Gly His His Lys Gly
 50 55 60
 Ala Trp Lys Met Leu Lys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Val Ala Ala Ala
 65 70 75 80
 15 Asp Ile Pro Ala Gln Lys Glu Glu His Val Ala Glu Met Thr Arg Leu
 85 90 95
 Met Ala Ser Trp Arg Glu Arg Gly Leu Phe Lys Pro Arg Pro Val Ala
 100 105 110
 Ser Ser Ile Tyr Gly Leu Cys Val Ile Phe Ala Ile Ala Ala Ser Val
 115 120 125
 20 Ala Cys Ala Pro Tyr Ala Pro Val Leu Ala Gly Ile Ala Val Gly Thr
 130 135 140
 Cys Trp Ala Gln Cys Gly Phe Leu Gln His Met Gly Gly His Arg Glu
 145 150 155 160
 25 Trp Gly Arg Thr Trp Ser Phe Ala Phe Gln His Leu Phe Glu Gly Leu
 165 170 175
 Leu Lys Gly Gly Ser Ala Ser Trp Trp Arg Asn Arg His Asn Lys His
 180 185 190
 30 His Ala Lys Thr Asn Val Leu Gly Glu Asp Gly Asp Leu Arg Thr Thr
 195 200 205
 Pro Phe Phe Ala Trp Asp Pro Thr Leu Ala Lys Lys Val Pro Asp Trp
 210 215 220
 Ser Leu Arg Thr Gln Ala Phe Thr Phe Leu Pro Ala Leu Gly Ala Tyr
 225 230 235 240
 35 Val Phe Val Phe Ala Phe Thr Val Arg Lys Tyr Ser Val Val Lys Arg
 245 250 255
 Leu Trp His Glu Val Ala Leu Met Val Ala His Tyr Ala Leu Phe Ser
 260 265 270
 40 Trp Ala Leu Ser Ala Ala Gly Ala Ser Leu Ser Ser Gly Leu Thr Phe
 275 280 285
 Tyr Cys Thr Gly Tyr Ala Trp Gln Gly Ile Tyr Leu Gly Phe Phe Phe
 290 295 300
 45 Gly Leu Ser His Phe Ala Val Glu Arg Val Pro Ser Thr Ala Thr Trp
 305 310 315 320
 Leu Glu Ser Thr Met Met Gly Thr Val Asp Trp Gly Gly Ser Ser Ala
 325 330 335
 Phe Cys Gly Tyr Leu Ser Gly Phe Leu Asn Ile Gln Ile Glu His His
 340 345 350
 50 Met Ala Pro Gln Met Pro Met Glu Asn Leu Arg Gln Ile Arg Ala Asp
 355 360 365
 Cys Lys Ala Ala Ala His Lys Phe Gly Leu Pro Tyr Arg Glu Leu Thr
 370 375 380
 55 Phe Val Ala Ala Thr Lys Leu Met Met Ser Gly Leu Tyr Arg Thr Gly
 385 390 395 400
 Lys Asp Glu Leu Lys Leu Arg Ala Asp Arg Arg Lys Phe Thr Arg Ala
 405 410 415
 60 Gln Ala Tyr Met Gly Ala Ala Ser Ala Leu Val Asp Thr Leu
 420 425 430

<210> 70

<211> 515

65 <212> PRT

<213> *Thraustochytrium aureum*

ES 2 310 204 T3

<400> 70

5 Met Thr Val Gly Phe Asp Glu Thr Val Thr Met Asp Thr Val Arg Asn
1 5 10
His Asn Met Pro Asp Asp Ala Trp Cys Ala Ile His Gly Thr Val Tyr
20 25 30
10 Asp Ile Thr Lys Phe Ser Lys Val His Pro Gly Gly Asp Ile Ile Met
35 40 45
Leu Ala Ala Gly Lys Glu Ala Thr Ile Leu Phe Glu Thr Tyr His Ile
50 55 60
15 Lys Gly Val Pro Asp Ala Val Leu Arg Lys Tyr Lys Val Gly Lys Leu
65 70 75 80
Pro Gln Gly Lys Lys Gly Glu Thr Ser His Met Pro Thr Gly Leu Asp
85 90 95
Ser Ala Ser Tyr Trp Ser Trp Asp Ser Glu Phe Tyr Arg Val Leu Arg
100 105 110
20 Glu Arg Val Ala Lys Lys Leu Ala Glu Pro Gly Leu Met Gln Arg Ala
115 120 125
Arg Met Glu Leu Trp Ala Lys Ala Ile Phe Leu Leu Ala Gly Phe Trp
130 135 140
25 Gly Ser Leu Tyr Ala Met Cys Val Leu Asp Pro His Gly Gly Ala Met
145 150 155 160
Val Ala Ala Val Thr Leu Gly Val Phe Ala Ala Phe Val Gly Thr Cys
165 170 175
30 Ile Gln His Asp Gly Ser His Gly Ala Phe Ser Lys Ser Arg Phe Met
180 185 190
Asn Lys Ala Ala Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met
195 200 205
Thr Trp Glu Met Gln His Val Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Leu
210 215 220
35 Ile Glu Met Glu Asn Gly Leu Ala Lys Val Lys Gly Ala Asp Val Asp
225 230 235 240
Pro Lys Lys Val Asp Gln Glu Ser Asp Pro Asp Val Phe Ser Thr Tyr
245 250 255
40 Pro Met Leu Arg Leu His Pro Trp His Arg Gln Arg Phe Tyr His Lys
260 265 270
Phe Gln His Leu Tyr Ala Pro Leu Ile Phe Gly Phe Met Thr Ile Asn
275 280 285
45 Lys Val Ile Ser Gln Asp Val Gly Val Val Leu Arg Lys Arg Leu Phe
290 295 300
Gln Ile Asp Ala Asn Cys Arg Tyr Gly Ser Pro Trp Asn Val Ala Arg
305 310 315 320
Phe Trp Ile Met Lys Leu Leu Thr Thr Leu Tyr Met Val Ala Leu Pro
325 330 335
50 Met Tyr Met Gln Gly Pro Ala Gln Gly Leu Lys Leu Phe Phe Met Ala
340 345 350
His Phe Thr Cys Gly Glu Val Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn His
355 360 365
55 Ile Ile Glu Gly Val Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ala Val Lys Gly Val
370 375 380
Met Ala Pro Pro Arg Thr Val His Gly Val Thr Pro Met Gln Val Thr
385 390 395 400
Gln Lys Ala Leu Ser Ala Ala Glu Ser Thr Lys Ser Asp Ala Asp Lys

60

65

ES 2 310 204 T3

```

                405                410                415
    Thr Thr Met Ile Pro Leu Asn Asp Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr
                420                425                430
5   Ser Val Asn Trp Ala Val Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly
                435                440                445
    Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His Cys Phe Pro Gln Asn Pro His
                450                455                460
10  Thr Val Asn Val Tyr Ile Ser Gly Ile Val Lys Glu Thr Cys Glu Glu
    465                470                475                480
    Tyr Gly Val Pro Tyr Gln Ala Glu Ile Ser Leu Phe Ser Ala Tyr Phe
                485                490                495
15  Lys Met Leu Ser His Leu Arg Thr Leu Gly Asn Glu Asp Leu Thr Ala
                500                505                510
    Trp Ser Thr
                515

```

20 <210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Motivo rico en histidina

30 <400> 71

```

    His Met Gly Gly His
    1                5

```

35 <210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Motivo rico en histidina

45

<400> 72

```

    His Asn Lys His His
    1                5

```

50 <210> 73

<211> 5

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Motivo rico en histidina

60

<400> 73

```

    Gln Ile Glu His His
    1                5

```

65