



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 306 523**

51 Int. Cl.:

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

A23D 9/00 (2006.01)

A23L 1/29 (2006.01)

A61K 31/185 (2006.01)

A61K 8/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99943978 .9**

86 Fecha de presentación : **30.08.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1108039**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2001**

54 Título: **Genes de elongación y utilización de estos genes.**

30 Prioridad: **02.09.1998 US 145828**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73 Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
Chad 0377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-6050, US

72 Inventor/es: **Mukerji, Pradip;**
Leonard, Amanda, Eun-Yeong;
Huang, Yung-Sheng;
Thurmond, Jennifer;
Kirchner, Stephen, J.;
Parker-Barnes, Jennifer, M. y
Das, Tapas

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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 elongación y utilización de estos genes.

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

La invención sujeto se refiere a la identificación de numerosos genes implicados en la elongación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (esto es, "elongasas") y a los usos de los mismos. En particular, la enzima elongasa se utiliza en la conversión de un ácido graso en otro. Por ejemplo, la elongasa cataliza la conversión de ácido gamma-linolénico (GLA) en ácido dihomo- γ -linolénico (DGLA, 20:3n-6) y la conversión de ácido estearidónico (STA, 18:4n-3) en ácido (n-3)-eicosatetraenoico (20:4n-3). La elongasa también cataliza la conversión de ácido araquidónico (AA, 20:4n-6) en ácido adrénico (ADA, 22:4n-6), la conversión de ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) en ácido ω 3-docosapentaenoico (22:5n-3), y la conversión de ácido α -linolenico (ALA, 18:3n-3) en 20:3n-3. Se puede utilizar DGLA, por ejemplo, en la producción de otros ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), tales como ácido araquidónico (AA) que pueden ser añadidos a composiciones farmacéuticas, composiciones nutricionales, alimentos para animales, así como otros productos tales como cosméticos.

20 **Información antecedente**

Las elongasas que se han identificado en el pasado difieren en términos de los sustratos sobre los cuales actúan. Además, están presentes tanto en animales como en plantas. Aquellas encontradas en mamíferos tienen la capacidad de actuar sobre ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. En contraste, aquellas encontradas en plantas son específicas de ácidos grasos saturados o monoinsaturados. De este modo, con el fin de generar ácidos grasos poliinsaturados en plantas, existe la necesidad de una elongasa específica de PUFA.

Tanto en plantas como en animales, se cree que el procedimiento de elongación es el resultado de un mecanismo de cuatro etapas (Lassner *et al.*, The Plant Cell 8:281-292 (1996)). El CoA es el portador acilado. La etapa uno implica la condensación de malonil-CoA con una acil-CoA de cadena larga para producir dióxido de carbono y β -cetoacil-CoA en el que el radical acilo ha sido prolongado en dos átomos de carbono. Las reacciones subsiguientes incluyen la reducción a β -hidroxiacil-CoA, la deshidratación a enoil-CoA, y una segunda reducción para producir el acil-CoA prolongado. La reacción de condensación inicial no sólo es la etapa específica del sustrato si no también la etapa limitante de la velocidad.

Como se ha observado previamente, las elongasas, más específicamente, aquellas que utilizan PUFA como sustratos, son críticas en la producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que tienen muchas funciones importantes. Por ejemplo, los PUFA son componentes importantes de la membrana plasmática de una célula donde se encuentran en forma de fosfolípidos. También sirven como precursores para las prostaciclina, los eicosanoides, los leucotrienos y las prostaglandinas de mamíferos. Adicionalmente, los PUFA son necesarios para el desarrollo apropiado del cerebro del lactante en desarrollo así como para la formación y reparación de tejidos. A la vista de la trascendencia biológica de los PUFA, se están realizando intentos para producirlos, así como intermedios que conduzcan a su producción eficazmente.

Numerosas enzimas están implicadas en la biosíntesis de los PUFA incluyendo las elongasas (elo) (véase la Figura 1). Por ejemplo, el ácido linoleico (LA, 18:2- Δ 9,12 o 18:2n-6) es producido a partir de ácido oleico (OA, 18:1- Δ 9 o 18:1n-9) por medio de una Δ 12 desaturasa. El GLA (18:3- Δ 6,9,12) es producido a partir de ácido linoleico por medio de una Δ 6-desaturasa. El AA (20:4- Δ 5,8,11,14) es producido a partir de ácido dihomo- γ -linolenico (DGLA, 20:3- Δ 8,11,14) por medio de una Δ 5-desaturasa. Como se ha indicado antes, el DGLA es producido a partir de GLA por medio de una elongasa.

Se debe observar que los animales no se pueden desaturar más allá de la posición Δ 9 y por lo tanto no pueden convertir ácido oleico en ácido linolénico. Del mismo modo, el ácido α -linolenico (ALA, 18:3- Δ 9,12,15 o 18:3n-3) no puede ser sintetizado por los mamíferos, puesto que carecen de actividad Δ 15 desaturasa. Sin embargo, el ácido α -linolenico se puede convertir en ácido estearidónico (STA, 18:4- Δ 6,9,12,15) por medio de una Δ 6-desaturasa (véase la publicación PCT WO 96/13591; véase también la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.552.306), seguido de elongación a ácido (n-3)-eicosatetraenoico (20:4- Δ 8,11,14,17 o 20:4n-3) en mamíferos y algas. Este ácido graso poliinsaturado (esto es, 20:4- Δ 8,11,14,17) se puede convertir después en ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5- Δ 5,8,11,14,17) por medio de una Δ 5-desaturasa. Otros eucariotas, incluyendo hongos y plantas, tienen enzimas que desaturan en los carbonos 12 (véase la publicación PCT WO 94/11516 y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.443.974) y 15 (véase la publicación PCT WO 93/11245). La mayoría de los ácidos grasos poliinsaturados de los animales por lo tanto derivan de la dieta y/o de la desaturación y elongación de ácido linoleico o ácido α -linolenico. A la vista de la incapacidad de los mamíferos para producir estos ácidos grasos de cadena larga esenciales, tiene un interés significativo aislar los genes implicados en la biosíntesis de PUFA a partir de especies que producen naturalmente estos ácidos grasos y expresar estos genes en un sistema microbiano, vegetal o animal que pueda ser alterado para proporcionar la producción de cantidades comerciales de uno o más PUFA. Por consiguiente, existe una necesidad definida para la enzima elongasa, el gen que codifica la enzima, así como los métodos recombinantes de producción de esta enzima. Adicionalmente, existe la necesidad de aceites que contengan niveles de PUFA más allá de aquellos presentes natu-

ralmente así como aquellos enriquecidos en PUFA novedosos. Tales aceites solamente se pueden elaborar mediante aislamiento y expresión del gen de la elongasa.

Uno de los PUFA de cadena larga más importantes, indicados antes, es el ácido araquidónico (AA). El AA se encuentra en hongos filamentosos y también se puede purificar a partir de tejidos de mamíferos incluyendo el hígado y las glándulas suprarrenales. Como se ha indicado antes, la producción de AA a partir de DGLA está catalizada por $\Delta 5$ -desaturasa, y la producción de DGLA a partir de ácido γ -linolénico (GLA) está catalizada por una elongasa. No obstante, hasta la presente invención, no se había identificado ninguna elongasa que fuera activa sobre ácidos grasos sustrato en las rutas para la producción de PUFA de cadena larga y, en particular, de AA, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido adrenico, ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), ácido $\omega 3$ -docosapentaenoico (22:5n-3) o ácido $\omega 6$ -docosapentaenoico (22:5n-6).

Dos genes parecían tener interés en la presente búsqueda del gen de la elongasa. En particular, β -cetoacil-coenzima A sintetasa (KCS) de jojoba, o KCS de jojoba (Núm. de Acceso GenBank U37088), cataliza la reacción inicial de la ruta de elongación del acil-CoA graso (esto es, la condensación de malonil-CoA con acil-CoA de cadena larga (Lassner *et al.*, The Plant Cell 8:281-292 (1996)). La preferencia de sustrato de la KCS de jojoba es 18:0, 20:0, 20:1, 18:1, 22:1, 22:0 y 16:0. La elongasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ELO2) también cataliza la conversión de ácidos grasos saturados y monoinsaturados de cadena larga, produciendo elevados niveles de 22:0, 24:0, y también 18:0, 18:1, 20:0, 20:1, 22:0, 22:1, y 24:1 (Oh *et al.*, The Journal of Biological Chemistry 272 (28):17376-17384 (1997); véase también la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.484.724 para una secuencia de nucleótidos que incluye la secuencia de ELO2; véase la publicación PCT WO 88/07577 para un estudio de la secuencia de un factor de inhibición de la glicosilación que se describe en el Ejemplo V). La búsqueda de una elongasa específica de PUFA de cadena larga en *Mortierella alpina* comenzó basándose en una revisión de las homologías compartidas entre estos dos genes y escrutando la expresión de la actividad elongasa de PUFA.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada correspondiente o complementaria a al menos aproximadamente 50% de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 6.

La secuencia codifica una elongasa funcionalmente activa que utiliza un ácido graso poliinsaturado o un ácido graso monoinsaturado como sustrato. En particular, la secuencia puede derivar de un hongo del género *Mortierella* y se puede aislar específicamente de *Mortierella alpina*.

La presente invención también incluye una proteína purificada codificada por la secuencia de nucleótidos anterior.

Adicionalmente, la presente invención abarca un método de producción de una enzima elongasa que comprende las etapas de: a) aislar la secuencia de nucleótidos representada por la Figura 6; b) construir un vector que comprende: i) la secuencia de nucleótidos aislada conectada operablemente a ii) un promotor; y c) introducir el vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de la enzima elongasa. La célula anfitriona puede ser una célula eucariótica o una célula procariótica.

La célula procariótica puede ser, por ejemplo una célula de *E. coli*, una célula cianobacteriana, o una célula de *B. subtilis*. La célula eucariótica puede ser, por ejemplo, una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula vegetal o una célula fúngica. La célula fúngica puede ser, por ejemplo, *Saccharomyces spp.*, *Candida spp.*, *Lipomyces spp.*, *Yarrowia spp.*, *Kluyveromyces spp.*, *Hansenula spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Neurospora spp.*, *Trichoderma spp.* o *Pichia spp.* En concreto, la célula fúngica puede ser una célula de levadura tal como *Saccharomyces spp.*, en concreto, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida spp.*, *Hansenula spp.* o *Pichia spp.*

La invención también incluye un vector que comprende: a) una secuencia de nucleótidos representada por la Figura 6 conectada operablemente a b) un promotor, así como una célula anfitriona que comprende este vector. El anfitrión puede ser una célula procariótica o una célula eucariótica. Los ejemplos adecuados de células procarióticas incluyen células de *E. coli*, Cyanobacteria, y *B. subtilis*. Los ejemplos adecuados de células eucarióticas incluyen una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula vegetal y una célula fúngica. La célula fúngica puede ser, por ejemplo, *Saccharomyces spp.*, *Candida spp.*, *Lipomyces spp.*, *Yarrowia spp.*, *Kluyveromyces spp.*, *Hansenula spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Neurospora spp.*, *Trichoderma spp.* y *Pichia spp.* En concreto, la célula fúngica puede ser, por ejemplo, una célula de levadura tal como, por ejemplo, *Saccharomyces spp.*, en concreto, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida spp.*, *Hansenula spp.* y *Pichia spp.*

La presente invención incluye una célula vegetal, planta o tejido vegetal que comprende el vector descrito antes, donde la expresión de la secuencia de nucleótidos del vector da como resultado la producción de al menos un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en un ácido graso monoinsaturado y un ácido graso poliinsaturado por la célula vegetal, planta o tejido vegetal. El ácido graso poliinsaturado puede ser, por ejemplo, ácido dihomogamma-linolénico (DGLA), 20:4n-3, y ácido adrenico (ADA). La invención también incluye uno o más aceites vegetales o ácidos grasos expresados por la célula vegetal, planta o tejido vegetal. Adicionalmente, la presente invención abarca una planta transgénica que comprende el vector descrito antes, donde 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.

ES 2 306 523 T3

Además, la presente invención incluye un mamífero transgénico, no humano cuyo genoma comprende una secuencia de ADN que codifica una elongasa conectada operablemente a un promotor. La secuencia de ADN puede estar representada por el SEQ ID NO: 1 (Figura 6).

5 El transgénico, no humano puede producir un fluido (p. ej., leche) donde el fluido comprende un nivel detectable de al menos una elongasa o productos de la misma tales como, por ejemplo, DGLA, ácido ω 6-docosapentaenoico, ADA y/o 20:4n-3 (véase la Figura 1).

Adicionalmente, la presente invención incluye un método para producir un ácido graso poliinsaturado que comprende las etapas de: a) aislar dicha secuencia de nucleótidos representada por el SEQ ID NO:1 (Figura 6); b) construir un vector que comprende la secuencia de nucleótidos aislada; c) introducir el vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de la enzima elongasa codificada por la secuencia de nucleótidos aislada; y d) exponer la enzima elongasa expresada a un ácido graso poliinsaturado "sustrato" con el fin de convertir el sustrato en un ácido graso poliinsaturado "producto". El ácido graso poliinsaturado sustrato se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en ácido γ -linolenico (GLA), ácido estearidonico (STA) y ácido araquidónico (AA), y el ácido graso poliinsaturado producto se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en DGLA, 20:4n-3, y ADA, respectivamente. El método puede comprender adicionalmente la etapa de exponer el ácido graso poliinsaturado producto a al menos una desaturasa con el fin de convertir el ácido graso poliinsaturado producto en "otro" ácido graso poliinsaturado. El ácido graso poliinsaturado producto se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en DGLA, 20:4n-3, y ADA. El otro ácido graso poliinsaturado se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en AA, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido ω 6-docosapentaenoico, respectivamente, y la al menos una desaturasa es Δ 5-desaturasa, con respecto a la producción de AA o EPA, y Δ 4-desaturasa, con respecto a la producción de ácido ω 6-docosapentaenoico. El método puede comprender adicionalmente la etapa de exponer el otro ácido graso poliinsaturado a una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en al menos una elongasa y al menos una desaturasa adicional con el fin de convertir el otro ácido graso poliinsaturado en un ácido graso poliinsaturado "final". El ácido graso poliinsaturado final puede ser, por ejemplo, ácido docosahexaenoico (DHA), AA, ácido ω 6-docosapentaenoico, o ácido ω 3-docosapentaenoico.

La presente invención también incluye una secuencia de nucleótidos aislada correspondiente o complementaria a al menos aproximadamente 35% de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 22. La secuencia codifica una elongasa funcionalmente activa que utiliza un ácido graso poliinsaturado como sustrato. Esta secuencia también puede derivar, por ejemplo, de un hongo del género *Mortierella*. En particular, puede derivar el *M. alpina*.

Adicionalmente, la presente invención incluye una proteína purificada codificada por la secuencia de nucleótidos anterior.

La presente invención también incluye un método de producción de una enzima elongasa como se ha descrito antes. La secuencia insertada en el vector está representada por la Figura 22. La célula anfitriona puede ser procariótica o eucariótica. Los ejemplos adecuados se describen más abajo.

La presente invención también incluye un vector que comprende: a) una secuencia de nucleótidos como se representa en la Figura 22 conectada operablemente a b) un promotor, así como una célula anfitriona que comprende este vector. De nuevo, la célula anfitriona puede ser eucariótica o procariótica. Los ejemplos adecuados se han descrito antes.

La invención también incluye una célula vegetal, una planta o tejido vegetal que comprende el vector anterior, donde la expresión de la secuencia de nucleótidos del vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado por la célula vegetal, la planta o el tejido vegetal. El ácido graso poliinsaturado puede ser, por ejemplo, DGLA, 20:4n-3, o ADA. Adicionalmente, la invención incluye uno o más aceites o ácidos grasos vegetales expresados por la célula vegetal, la planta o el tejido vegetal.

Además, la presente invención también incluye una planta transgénica que comprende el vector anterior, donde la expresión de la secuencia de nucleótidos de la figura 22 del vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado en semillas de la planta transgénica.

La invención también incluye un mamífero transgénico, no humano cuyo genoma comprende una secuencia de ADN de la figura 22 que codifica una elongasa conectada operablemente a un promotor. Este mamífero transgénico, no humano puede producir un fluido, donde el fluido comprende un nivel detectable de al menos una elongasa o productos de la misma.

La presente invención también incluye un método para producir un ácido graso poliinsaturado que comprende las etapas de: a) aislar la secuencia de nucleótidos representada por la Figura 22; b) construir un vector que comprende la secuencia de nucleótidos aislada; c) introducir el vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de una enzima elongasa codificada por la secuencia de nucleótidos aislada; y d) exponer la enzima elongasa expresada a un ácido graso poliinsaturado sustrato con el fin de convertir el sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto. El ácido graso poliinsaturado sustrato puede ser, por ejemplo, GLA, STA, o AA, el ácido graso poliinsaturado producto puede ser, por ejemplo, DGLA, 20:4n-3, o ácido ω 6-docosapentaenoico, respectivamente. El método puede comprender adicionalmente la etapa de exponer la enzima elongasa expresada a al

ES 2 306 523 T3

menos una desaturasa con el fin de convertir el ácido graso poliinsaturado producto en otro ácido graso poliinsaturado. El ácido graso poliinsaturado producto puede ser, por ejemplo, DGLA, 20:4n-3, o ADA, el otro ácido graso poliinsaturado puede ser, por ejemplo, AA, EPA, o ácido ω 6-docosapentaenoico, respectivamente, y la al menos una desaturasa es Δ 5-desaturasa con respecto a la producción de AA o EPA, y Δ 4-desaturasa con respecto a la producción de ácido ω 6-docosapentaenoico. El método puede comprender adicionalmente la etapa de exponer el otro ácido graso poliinsaturado a una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en al menos una elongasa y una desaturasa adicional con el fin de convertir el otro ácido graso poliinsaturado en un ácido graso poliinsaturado final. El ácido graso poliinsaturado final puede ser, por ejemplo, ácido docosahexaenoico, AA, ácido ω 6-docosapentaenoico, o ácido ω 3-docosapentaenoico.

Además, la presente invención incluye una secuencia de nucleótidos aislada correspondiente o complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 43.

Esta secuencia codifica una elongasa funcionalmente activa que utiliza un ácido graso poliinsaturado o un ácido graso monoinsaturado como sustrato. La secuencia deriva de un mamífero tal como por ejemplo un ser humano.

La invención también incluye una proteína purificada codificada por esta secuencia de nucleótidos.

Adicionalmente, la invención incluye un método de producción de una enzima elongasa que comprende las etapas de: a) aislar la secuencia de nucleótidos representada por la Figura 43; b) construir un vector que comprende: i) la secuencia de nucleótidos aislada conectada operablemente a ii) un promotor; y c) introducir dicho vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de la enzima elongasa. La célula anfitriona puede ser la misma descrita antes con respecto a los métodos correspondientes utilizando las Figuras 6 o 22. La invención también incluye un vector que comprende: a) una secuencia de nucleótidos representada por la Figura 43 conectada operablemente a b) un promotor, así como una célula anfitriona que comprende este vector. La célula anfitriona puede ser la misma descrita antes.

La invención también incluye una célula vegetal, planta o tejido vegetal que comprende el vector descrito antes que comprende la secuencia de la Figura 43 donde la expresión de la secuencia de nucleótidos del vector da como resultado la producción de al menos un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en un ácido graso monoinsaturado y un ácido graso poliinsaturado por dicha célula vegetal, planta o tejido vegetal. El ácido graso poliinsaturado puede ser, por ejemplo, DGLA, 20:4n-3 o ADA. La invención también incluye uno o más aceites vegetales o ácidos expresados por la célula vegetal, planta o tejido vegetal.

La invención también incluye una planta transgénica que comprende el vector que comprende la secuencia de la figura 43, donde 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.

Adicionalmente, la presente invención incluye un mamífero transgénico, no humano cuyo genoma comprende una secuencia de ADN humana que codifica una elongasa conectada operablemente a un promotor. La secuencia de ADN está representada por la Figura 43. Dicho mamífero transgénico, no humano puede producir un fluido donde dicho fluido comprende un nivel detectable de al menos una elongasa o productos de la misma.

La invención también abarca un método para producir un ácido graso poliinsaturado que comprende las etapas de: a) aislar la secuencia de nucleótidos representada por la Figura 43; b) construir un vector que comprende dicha secuencia de nucleótidos; c) introducir el vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de la enzima elongasa codificada por la secuencia de nucleótidos aislada; y d) exponer la enzima elongasa expresada a un ácido graso poliinsaturado sustrato con el fin de convertir el sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto. El ácido graso poliinsaturado sustrato puede ser, por ejemplo, GLA, STA o AA, y el ácido graso poliinsaturado producto puede ser, por ejemplo, DGLA, 20:4n-3, o ADA, respectivamente. El método puede comprender adicionalmente la etapa de exponer el ácido graso poliinsaturado producto a al menos una desaturasa con el fin de convertir el ácido graso poliinsaturado producto en otro ácido graso poliinsaturado. El ácido graso poliinsaturado producto puede ser, por ejemplo, DGLA, 20:4n-3 y ADA, el otro ácido graso poliinsaturado puede ser, por ejemplo, AA, EPA, y ácido ω 6-docosapentaenoico, respectivamente, y la al menos una desaturasa es Δ 5-desaturasa con respecto a la producción de AA o EPA y Δ 4-desaturasa con respecto a la producción de ácido ω 6-docosapentaenoico. El método puede comprender adicionalmente la etapa de exponer el otro ácido graso poliinsaturado a una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en al menos una elongasa y al menos una desaturasa adicional con el fin de convertir el otro ácido graso poliinsaturado en un ácido graso poliinsaturado final. El ácido graso poliinsaturado final puede ser, por ejemplo, DHA, ADA, ácido ω 6-docosapentaenoico, y ácido ω 3-docosapentaenoico.

Adicionalmente, la presente invención incluye una secuencia de nucleótidos aislada correspondiente o complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 46. Ésta codifica una elongasa funcionalmente activa que utiliza un ácido graso poliinsaturado como sustrato. La secuencia puede derivar o ser aislada de un nematodo del género *Caenorhabditis* y, en particular, puede ser aislada de *C. elegans*.

Adicionalmente, la presente invención incluye un método de producción de una enzima elongasa que comprende las etapas de: a) aislar la secuencia de nucleótidos representada por la Figura 46; b) construir un vector que comprende:

ES 2 306 523 T3

i) secuencia de nucleótidos aislada conectada operablemente a ii) un promotor; y c) introducir el vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de la enzima elongasa. Las propiedades de la célula anfitriona son las mismas descritas antes con respecto a las secuencias de las Figuras 6, 22 y 43.

5 La presente también abarca un vector que comprende: a) una secuencia de nucleótidos representada por la Figura 46 conectada operablemente a b) un promotor, así como una célula anfitriona que comprende este vector. La célula anfitriona tiene las mismas propiedades que las citadas antes con respecto a la célula anfitriona citada antes para las secuencias de las Figuras 6, 22 y 43.

10 Por otra parte, la presente invención incluye una célula vegetal, planta o tejido vegetal que comprende el vector anterior que comprende la secuencia de la Figura 46, donde la expresión de dicha 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 ser, por ejemplo, DGLA, 20:4n-3, o ADA. La invención también incluye uno o más aceites vegetales o ácidos grasos expresados por esta célula vegetal, planta o tejido vegetal.

15 La invención también incluye una planta transgénica que comprende el vector anterior incluyendo la secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de la Figura 46, donde 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.

20 Adicionalmente, la presente invención incluye un mamífero transgénico, no humano cuyo genoma comprende una secuencia de ADN de *C. elegans* que codifica una elongasa conectada operablemente a un promotor. La secuencia de ADN puede estar representada por la Figura 46. El mamífero transgénico, no humano, puede producir un fluido cuyo fluido comprende un nivel detectable de al menos una elongasa o productos de la misma.

25 La invención también incluye un método para producir un ácido graso poliinsaturado que comprende las etapas de: a) aislar la secuencia de nucleótidos representada por la Figura 46; b) construir un vector que comprende la secuencia de nucleótidos aislada; c) introducir el vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de una enzima elongasa codificada por la secuencia de nucleótidos aislada; y d) exponer la enzima elongasa expresada a un ácido graso poliinsaturado sustrato con el fin de convertir el sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto. El ácido graso poliinsaturado sustrato puede ser, por ejemplo, GLA, STA, o AA, y el ácido graso poliinsaturado producto puede ser, por ejemplo, DGLA, 20:4n-3, o ADA, respectivamente. El método puede comprender adicionalmente la etapa de exponer la enzima elongasa expresada a al menos una desaturasa con el fin de convertir dicho ácido graso poliinsaturado producto en otro ácido graso poliinsaturado. El ácido graso poliinsaturado producto puede ser, por ejemplo, DGLA, 20:4n-3 o ADA, el otro ácido graso poliinsaturado puede ser, por ejemplo, AA, EPA o ácido ω 6-docosapentaenoico, respectivamente, y la al menos una desaturasa es Δ 5-desaturasa con respecto a la producción de AA o EPA, y Δ 4-desaturasa con respecto a la producción de ácido ω 6-docosapentaenoico. El método puede comprender adicionalmente la etapa de exponer el otro ácido graso poliinsaturado a una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en al menos una elongasa y al menos una desaturasa adicional con el fin de convertir el otro ácido graso poliinsaturado en un ácido graso poliinsaturado final. El ácido graso poliinsaturado final puede ser, por ejemplo, DHA, ADA, ácido ω 6-docosapentaenoico, o ácido ω 3-docosapentaenoico.

Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 representa diversas rutas de biosíntesis de ácidos grasos. Se debe observar el papel de la enzima elongasa (elo).

La Figura 2 representa el porcentaje de similitud y el porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de KCS de joboba y ELO2.

50 La Figura 3 representa la secuencia de ELO2 de *S. cerevisiae* homóloga a la secuencia de KCS de joboba (secuencia del cebador subrayada) de la Figura 2.

55 La Figura 4A muestra el mapa físico de pRAE-2 que contiene el ADNc de MAELO. La Figura 4B representa el mapa físico del vector de expresión constitutivo, pRAE-5, utilizado para la producción de la enzima elongasa en levadura.

La Figura 5 representa una comparación de la secuencia de nucleótidos de los clones pRAE-5 y pRAE-6.

60 La Figura 6 ilustra la secuencia de nucleótidos completa de la elongasa de *Mortierella alpina* (MAELO).

La Figura 7 representa la secuencia de aminoácidos de la elongasa de *Mortierella alpina* traducida a partir de MAELO (véase la Figura 6).

65 La Figura 8 representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos entre 3 elongasas: *S. cerevisiae* ELO2 (GNS1), *S. cerevisiae* ELO3 (SUR4) y la secuencia de MAELO traducida mostrada en la Figura 7.

La Figura 9 representa una comparación entre la secuencia de nucleótidos MAELO y la secuencia de nucleótidos de ELO2 de *S. cerevisiae*.

ES 2 306 523 T3

Las Figuras 10A y 10B representan la actividad elongasa de PUFA de MAELO expresada en levadura panadera.

La Figura 11 ilustra la actividad elongasa de PUFA de MAELO cuando es expresada simultáneamente con ADNc de $\Delta 5$ -desaturasa de *M. alpina* para producir AA.

La Figura 12 compara la actividad elongasa de PUFA de MAELO con respecto a la expresión al alza de ELO2 de *S. cerevisiae* en levadura panadera.

Las Figuras 13, 14 y 15 representan tres comparaciones separadas de secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de nucleótidos de *C. elegans* en la base de datos GenEMBL con la MAELO traducida.

La Figura 16 muestra la comparación entre las traducciones a aminoácidos de dos secuencias de mamífero diferentes en la base de datos GenEMBL y la MAELO traducida.

La Figura 17 muestra la comparación de una secuencia de ADN traducida (véase la solicitud PCT publicada WO 88/07577) con la secuencia de aminoácidos derivada de MAELO, que se detectó durante una búsqueda en la base de datos.

La Figura 18 muestra secuencia de nucleótidos completa de la $\Delta 5$ -desaturasa de *M. alpina*.

La Figura 19 representa el análisis GC-FAME inicial de la reserva MAD708. Se debe observar la detección de un pico DGLA (C20:3n-6).

La Figura 20 representa la actividad elongasa de PUFA de los cinco clones MAD708 en levadura con GLA como sustrato. Todos los clones tienen una actividad elongasa aparente.

La Figura 21 representa el análisis de secuenciación de ADN del plásmido pRPB2. El análisis revela un marco de lectura abierto de 957 pb de longitud.

La Figura 22 muestra la secuencia de nucleótidos completa del ADNc de *M. alpina*, contenido en el plásmido pRPB2, que se denominó GLELO por su actividad elongasa de GLA.

La Figura 23 representa la secuencia de aminoácidos de la elongasa de *M. alpina* traducida a partir de GLELO (véase la Figura 22).

La Figura 24 ilustra la actividad elongasa de PUFA n-6 en un cultivo inducido de 334(pRPB2) cuando se le añade un suplemento de GLA.

La Figura 25 representa la actividad elongasa de PUFA n-3 y n-6 en un cultivo inducido de 334(pRPB2) cuando se le añade un suplemento de 25 μm de otros sustratos de ácido graso.

La Figura 26A ilustra la actividad elongasa de GLELO con GLA como sustrato cuando se expresa simultáneamente con el ADNc de $\Delta 5$ -desaturasa de *M. alpina* para producir AA. La Figura 26B ilustra la actividad elongasa de GLELO con STA como sustrato cuando se expresa simultáneamente con el ADNc de $\Delta 5$ -desaturasa de *M. alpina* para producir EPA.

La Figura 27 ilustra la comparación entre la secuencia de GLELO traducida (véase la Figura 23) y la secuencia de MAELO traducida (véase la Figura 7).

La Figura 28 representa una comparación de la secuencia de aminoácidos de 4 elongasas: la secuencia de aminoácidos traducida de GLELO (véase la Figura 23), MAELO (véase la Figura 7), ELO2 de *S. cerevisiae* (GNS1), y ELO3 de *S. cerevisiae* (SUR4). La caja de histidina está subrayada.

La Figura 29 representa un alineamiento entre la secuencia de MAELO traducida y la supuesta secuencia de HS1 homóloga humana traducida.

La Figura 30 representa un alineamiento entre la secuencia MAELO traducida y la supuesta secuencia de HS2 homóloga humana traducida.

La Figura 31 muestra un alineamiento entre la secuencia de MAELO traducida y la supuesta secuencia de MM2 homóloga de ratón traducida.

La Figura 32 representa un alineamiento entre la MAELO traducida y la supuesta secuencia de AI225632 homóloga de ratón traducida.

La Figura 33 ilustra un alineamiento entre la secuencia de GLELO traducida y la secuencia de AI815960 homóloga humana traducida.

ES 2 306 523 T3

La Figura 34 muestra un alineamiento entre la secuencia de GLELO traducida y la supuesta secuencia de HS1 homóloga humana traducida.

La Figura 35 representa un alineamiento entre la secuencia de GLELO traducida y la supuesta secuencia de AC004050 homóloga humana traducida.

La Figura 36 ilustra un alineamiento entre la secuencia de GLELO y la supuesta secuencia de MM2 homóloga de ratón traducida.

La Figura 37 representa un alineamiento de la secuencia de GLELO traducida y una supuesta secuencia de AI225632 homóloga de ratón traducida.

La Figura 38 ilustra un alineamiento de la secuencia de GLELO traducida y una supuesta U97107 homóloga de ratón traducida.

La Figura 39 representa un alineamiento de la secuencia de GLELO traducida y una supuesta secuencia homóloga de U68649 de *C. elegans* U68749 (F56H11.4) traducida.

La Figura 40 muestra un alineamiento entre la secuencia de MAELO traducida y una supuesta secuencia homóloga de U68749 de *C. elegans* (F56H11.4) traducida.

La Figura 41 representa un alineamiento entre la secuencia de GLELO traducida y una supuesta secuencia homóloga de *Drosophila melanogaster* traducida, DM1.

La Figura 42 ilustra un alineamiento entre la secuencia de MAELO traducida y una supuesta secuencia homóloga de *Drosophila melanogaster* traducida, DM1.

La Figura 43 ilustra la secuencia de nucleótidos completa de una elongasa humana HSELO1.

La Figura 44 representa la secuencia de aminoácidos deducida de la elongasa humana HSELO1.

La Figura 45 ilustra la actividad elongasa (PUFA y otros) de un cultivo inducido de 334(pRAE-58-A1) cuando se le añade un suplemento de GLA o AA.

La Figura 46 muestra la secuencia de nucleótidos completa de la elongasa de *C. elegans* CEELO.

La Figura 47 representa el aminoácido deducido de la elongasa de *C. elegans* CEELO.

La Figura 48 ilustra la actividad elongasa PUFA de un cultivo inducido de 334(pret-21) y 334(pRET-22) cuando se le añade un suplemento de GLA y AA.

La Figura 49 representa la secuencia de nucleótidos completa del gen de la supuesta elongasa humana HS3.

La Figura 50 ilustra la secuencia de aminoácidos deducida de la supuesta enzima elongasa humana HS3.

Descripción detallada de la invención

La invención sujeto hace referencia a las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos correspondientes de dos ADNc de elongasa derivados de *Mortierella alpina*, así como a las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos correspondientes de un ADNc de elongasa derivado de ser humano y uno derivado de *C. elegans*. Además, la invención sujeto también incluye los usos de los ADNc y de las proteínas codificadas por los genes. Por ejemplo, los genes y las correspondientes enzimas se pueden utilizar en la producción de ácidos grasos poliinsaturados y/o ácidos grasos monoinsaturados tales como DGLA, AA, ADA, EPA y/o DHA que se pueden añadir a las composiciones farmacéuticas, composiciones nutricionales y a otros productos valiosos.

Los Genes de la Elongasa y las Enzimas Codificadas por los Mismos

Como se ha indicado antes, una enzima elongasa codificada por un ADNc de elongasa es esencial en la producción de diversos ácidos grasos poliinsaturados, en particular, PUFA de 20-24 carbonos. Con respecto a la presente invención, la secuencia de nucleótidos del ADNc aislado de elongasa de *M. alpina* (MAELO) se muestra en la Figura 6, y la secuencia de aminoácidos de la proteína o enzima purificada correspondiente codificada por esta secuencia de nucleótidos se muestra en la Figura 7. Adicionalmente, la secuencia de nucleótidos del ADNc aislada de elongasa de GLA (GLELO) se muestra en la Figura 22, y la secuencia de aminoácidos de la proteína o enzima purificada correspondiente codificada por esta secuencia de nucleótidos se muestra en la Figura 23. La secuencia de nucleótidos de la elongasa de la secuencia 1 de la secuencia humana aislada (HSELO1) se muestra en la Figura 43, y la secuencia de aminoácidos de la correspondiente proteína o enzima purificada codificada por esta secuencia se muestra en la Figura 44. Además, la secuencia de nucleótidos del ADNc aislada de elongasa de *C. elegans* (CEELO1) se muestra en la Figura 46, y la secuencia de aminoácidos de la proteína o enzima correspondiente codificada de ese modo se muestra en la Figura 47.

Como ejemplo, las elongasas aisladas codificadas por los ADNc de la presente invención prolongan GLA a DGLA o prolongan STA a 20:4n-3 o prolongan AA a ADA. La producción de ácido araquidónico a partir de DGLA, o EPA a partir de 20:4n-3, está catalizada después por una $\Delta 5$ -desaturasa. De este modo, ni AA (o EPA), ni DGLA (o 20:4n-3) ni ADA (o ácido $\omega 3$ -docosapentaenoico), pueden ser sintetizados sin al menos un ADNc de elongasa y la enzima codificada por él.

Se debe observar que la presente invención también abarca las secuencias de nucleótidos (y las correspondientes proteínas codificadas) que tienen las secuencias correspondientes a (esto es, que tienen identidad con) o complementarias a al menos aproximadamente un 50%, preferiblemente al menos aproximadamente un 60%, y más preferiblemente al menos aproximadamente un 70% de los nucleótidos de la secuencia de nucleótidos del ADNc de MAELO descrito en la presente memoria (véase la Figura 6)). Además, la presente invención también incluye las secuencias de nucleótidos (y las correspondientes proteínas codificadas) que tienen secuencias correspondientes a (esto es, que tienen una identidad con) o complementarias a al menos aproximadamente un 35%, preferiblemente al menos aproximadamente un 45%, y más preferiblemente al menos aproximadamente un 55% de los nucleótidos de la secuencia de nucleótidos del ADNc de GLELO descrito en la presente memoria (véase la Figura 22). Adicionalmente, la presente memoria también incluye secuencias de nucleótidos (y las correspondientes proteínas codificadas) que tienen las secuencias correspondientes a (esto es, que tienen identidad con) o complementaria a la secuencia de nucleótidos del ADNc de la secuencia 1 humana (HSELO1) descrita en la presente memoria (véase la Figura 43). Además, la presente invención también incluye las secuencias de nucleótidos que tienen secuencias correspondientes (esto es, que tienen identidad con) o complementarias a los nucleótidos de la secuencia de nucleótidos del ADNc de *C. elegans*, CELO1, descrita en la presente memoria (véase la Figura 46). Tales secuencias pueden derivar de fuentes distintas de *Mortierella* (p. ej., un eucariota (p. ej., *Thraustochytrium spp.* (p. ej., *Thraustochytrium aureum* y *Thraustochytrium roseum*), *Schizochytrium spp.* (p. ej., *Schizochytrium aggregatum*), *Conidiobolus spp.* (p. ej., *Conidiobolus nanodes*), *Entomophthora spp.* (p. ej., *Entomophthora exitalis*), *Sarolegnia spp.* (p. ej., *Saproleania parasitica* y *Saprolegnia diclina*), *Leptomitus spp.* (p. ej., *Leptomitus lacteus*), *Entomophthora spp.*, *Pythium spp.*, *Porphyridium spp.* (p. ej., *Porohyridium cruentum*), *Conidiobolus spp.*, *Phytophthora spp.*, *Penicillium spp.*, *Coidosporium spp.*, *Mucor spp.* (p. ej., *Mucor circinelloides* y *Mucor javanicus*), *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* y *Rhodotorula spp.*), una levadura (p. ej., *Dipodascopsis uninucleata*), un organismo no mamífero tal como una mosca (p. ej., *Drosophila melanogaster*) o *Caenorhabditis spp.* (p. ej., *Caenorhabditis elegans*), o un mamífero (p. ej., un ser humano o un ratón). Tales secuencias pueden derivar de especies dentro del género *Mortierella*, otras especies distintas de *alpina*, por ejemplo, *Mortierella elongata*, *Mortierella exigua*, *Mortierella isabellina*, *Mortierella hygrophila*, y *Mortierella ramanniana*, va. *angulispora*. Además, la presente invención también abarca fragmentos y derivados de las secuencias de nucleótidos de la presente invención (esto es la secuencia de la Figura 6 (MAELO), la secuencia de la Figura 22 (GLELO), la secuencia de la Figura 43 (HSELO1) y la secuencia de la Figura 46 (CELO1)), así como las secuencias derivadas de fuentes distintas de *Mortierella* y que tienen la complementariedad o correspondencia/identidad descritas antes. Los equivalentes funcionales de las secuencias anteriores (esto es, las secuencias que tienen actividad elongasa) también están abarcadas por la presente invención.

Para los fines de la presente invención, “complementariedad” se define como el grado de relación entre dos segmentos de ADN. Se determina midiendo la capacidad de la hebra efectora de un segmento de ADN para hibridar con la hebra antisentido del otro segmento de ADN, en condiciones apropiadas, para formar una doble hélice. En la doble hélice, siempre que aparece adenina en una hebra, aparece timina en la otra hebra. De un modo similar, siempre que se encuentra guanina en una hebra, se encuentra citosina en la otra. A mayor relación entre las secuencias de nucleótidos de dos segmentos de ADN, mayor capacidad para formar dúplex híbridos entre las hebras de los dos segmentos de ADN.

La “identidad” entre dos secuencias de nucleótidos se define como el grado de igualdad, correspondencia o equivalencia entre las mismas hebras (efectora o antisentido) de dos segmentos de ADN. A mayor porcentaje de identidad, mayor correspondencia, igualdad o equivalencia entre las hebras.

La “similitud” entre dos secuencias de aminoácidos se define como la presencia de una serie de restos aminoácido idénticos y conservados en ambas secuencias. A mayor grado de similitud entre dos secuencias de aminoácidos, mayor 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 aminoácido exactamente iguales o invariables en ambas secuencias).

Las definiciones de “complementariedad”, “identidad”, y “similitud” son bien conocidas por los expertos normales en la técnica.

La invención también incluye un polipéptido purificado que prolonga ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados (donde los polipéptidos (véase, p. ej., la Figura 7 (MAELO)) están codificados por las secuencias de nucleótidos descritas antes. Adicionalmente, la presente invención incluye un polipéptido purificado que prolonga ácidos grasos poliinsaturados (donde los polipéptidos (véase, p. ej., la Figura 23 (GLELO)) están codificados por las secuencias de nucleótidos anteriormente descritas. Además, la invención también incluye un polipéptido purificado que prolonga ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados (donde los polipéptidos (véase, p. ej., la Figura 44 (HSELO1)) están codificados por las secuencias de nucleótidos descritas antes.

La presente invención también abarca una secuencia de nucleótidos aislada que codifica la actividad elongasa de PUPA y que es hibridable, en condiciones moderadamente restrictivas, con un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente o complementaria a la secuencia de nucleótidos representada por la Figura 6 (MAELD) y/o la Figura 22 (GLELO) y/o la secuencia (HSELO1) mostrada en la Figura 43 y/o la secuencia (CEELO1) mostrada en la Figura 46. Una molécula de ácido nucleico es “hibridable” con otra molécula de ácido nucleico cuando una forma de hebra sencilla de la molécula de ácido nucleico puede reconocerse con la otra molécula de ácido nucleico en 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, New York)). Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan el “carácter restrictivo” de la hibridación. La “hibridación” requiere que dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias. No obstante, dependiendo del carácter restrictivo de la hibridación, se pueden producir emparejamientos erróneos entre las bases. El carácter restrictivo apropiado para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementariedad. Tales variables son bien conocidas en la técnica. Más específicamente, a mayor grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor valor de Tf, temperatura de fusión, para los híbridos de ácidos nucleicos que tienen esas secuencias. Para los híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han derivado ecuaciones para calcular la Tf (véase Sambrook *et al.*, *supra*). 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.*, *supra*).

20 Producción de la Enzima Elongasa

Una vez que el gen que codifica la elongasa ha sido aislado, se puede introducir en una célula anfitriona procariótica o eucariótica por medio del uso de un vector, plásmido o constructo.

El vector, por ejemplo, un bacteriófago, cósmido o plásmido, puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica la elongasa así como cualquier promotor que sea funcional en la célula anfitriona y sea capaz de obtener la expresión de la elongasa codificada por la secuencia de nucleótidos. El promotor está asociado operablemente o conectado operablemente a la secuencia de nucleótidos. (Se dice que un promotor está “conectado operablemente” a una secuencia codificadora si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificadora). Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos de genes que codifican la alcohol deshidrogenasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la fosfoglicoisomerasa, la fosfoglicerato quinasa, la fosfatasa ácida, T7, TP1, la lactasa, la metalotioneína, temprano inmediato de citomegalovirus, proteína ácida del suero, glucoamilasa, y promotores activados en presencia de galactosa, por ejemplo, GAL1 y GAL10. Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos que codifican otras proteínas, oligosacáridos, lípidos, etc. también pueden estar incluidas en el vector así como otras secuencias reguladoras tales como una señal de poliadenilación (p. ej., la señal poli-A del antígeno SV-40T, la ovoalbúmina o la hormona del crecimiento bovina). La elección de las secuencias presentes en el constructo depende de los productos de expresión deseados así como de la naturaleza de la célula anfitriona.

Como se ha observado antes, una vez que el vector ha sido construido, puede ser introducido en la célula anfitriona de elección mediante métodos conocidos por los expertos normales en la técnica incluyendo, por ejemplo, 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 anfitriona es cultivada en condiciones adecuadas que permiten la expresión del PUFA que después es recuperado y purificado.

También se debe observar que se puede diseñar un único triglicérido o aceite si se utiliza un constructo o un vector que comprende las secuencias de nucleótidos de dos o más ADNc (p. ej., MAELO, GLELO, HSELO1 y/o CEELO1). Este vector se puede introducir después en una célula anfitriona. Alternativamente, cada una de estas secuencias puede ser introducida en un vector separado. Estos vectores se pueden introducir después en dos células anfitrionas, respectivamente, o en una célula anfitriona.

Los ejemplos de las células anfitrionas procarióticas adecuadas incluyen, por ejemplo, bacterias tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* así como cianobacterias tales como *Spirulina spp.* (esto es, algas verde-azuladas). Los ejemplos de las células anfitrionas eucarióticas adecuadas incluyen, por ejemplo, células de mamífero, células vegetales, células de levadura tales como *Saccharomyces spp.*, *Lipomyces spp.*, *Candida spp.* tales como *Yarrowia (Candida) spp.*, *Kluyveromyces spp.*, *Pichia spp.*, *Trichoderma spp.* o *Hansenula spp.*, o células fúngicas tales como células fúngicas filamentosas, por ejemplo, *Aspergillus*, *Neurospora* y *Penicillium*. Preferiblemente, se utilizan células de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura panadera).

La expresión en una célula anfitriona se puede completar de una manera transitoria o estable. La expresión transitoria se puede producir a partir de constructos introducidos que contienen señales de expresión funcionales en la célula anfitriona, pero cuyos constructos no replican y raramente se integran en la célula anfitriona, o donde la célula anfitriona no es proliferante. La expresión transitoria también se puede completar induciendo la actividad de un promotor regulable conectado operablemente al gen de interés, aunque tales sistemas inducibles muestran frecuentemente un bajo nivel de expresión basal. La expresión estable se puede lograr mediante la introducción de un constructo que se puede integrar en el genoma anfitrión o que replica autónomamente en la célula anfitriona. La expresión estable del gen de interés se puede seleccionar por medio del uso de un marcador seleccionable localizado en o transfectedo con el constructo de expresión, seguido de la selección de células que expresan el marcador. Cuando la expresión estable es el resultado de la integración, el sitio de integración del constructo puede existir al azar dentro del genoma del

anfitrión o puede ser elegido como diana por medio del uso de constructos que contienen regiones de homología con el genoma del anfitrión suficiente para dirigir la recombinación con el locus del anfitrión. Cuando los constructos están dirigidos a un locus endógeno, todas o algunas de las regiones reguladoras de la transcripción y la traducción pueden ser proporcionadas por los locus endógenos.

5

También se puede utilizar un mamífero transgénico con el fin de expresar la enzima de interés (esto es, la elongasa) codificada por una o ambas de las secuencias de nucleótidos descritas antes. Más específicamente, una vez que se ha creado el constructo descrito antes, puede ser insertado en el pronúcleo de un embrión. Después el embrión puede ser implantado en una hembra receptora. Alternativamente, también se podría utilizar un método de transferencia nuclear (Schnieke *et al.*, Science 278:2130-2133 (1997)). Después se permite que se produzcan la gestación y el nacimiento (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.750.176 y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.700.671). La leche, los tejidos u otras muestras de fluido del vástago deben contener en ese caso niveles alterados de PUFA, en comparación con los niveles encontrados normalmente en el animal no transgénico. Las generaciones siguientes pueden ser controladas en cuanto a la producción de niveles alterados y aumentados de PUFA y de este modo la incorporación del gen o los genes que codifican la enzima elongasa en sus genomas. El mamífero utilizado como anfitrión puede ser seleccionado por ejemplo del grupo que consiste en un ratón, una rata, un conejo, un cerdo, una cabra, una oveja, un caballo y una vaca. Sin embargo, se puede utilizar cualquier mamífero siempre que tenga la capacidad de incorporar ADN que codifica la enzima de interés en su genoma.

10

15

20

25

30

35

40

Para la expresión de un polipéptido elongasa, las regiones de inicio y terminación de la transcripción y la traducción funcionales están conectadas operablemente al ADN que codifica el polipéptido elongasa. Las regiones de inicio y terminación de la transcripción y la traducción derivan de una variedad de fuentes no exclusivas, incluyendo el ADN que se va a expresar, genes que se sabe o se sospecha que son susceptibles de expresión en el sistema deseado, vectores de expresión, síntesis química, o de un locus endógeno en una célula anfitriona. La expresión en un tejido vegetal y/o una parte de una planta presenta ciertas eficacias, concretamente cuando el tejido o parte es uno que se cosecha tempranamente, tal como una semilla, hojas, frutos, flores, raíces, etc. La expresión puede estar dirigida a esa localización en la planta utilizando secuencias reguladoras específicas tales como las de las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.463.174, 4.943.674, 5.106.739, 5.175.095, 5.420.034, 5.188.958, y 5.589.379. Alternativamente, la proteína expresada puede ser una enzima que forma un producto que puede ser incorporado, ya sea directamente o después de modificaciones adicionales, a una fracción de fluido de la planta anfitriona. La expresión de uno o varios genes de elongasa, o de transcritos de elongasa antisentido, puede alterar los niveles de PUFA específicos, o derivados de los mismos, encontrados en las partes de las plantas y/o los tejidos de las plantas. La región codificadora del polipéptido elongasa se puede expresar por sí misma o con otros genes, con el fin de producir tejidos y/o partes de plantas que contienen mayores proporciones de los PUFA deseados o en los que la composición de PUFA se asemeja más íntimamente a la de la leche materna humana (Prieto *et al.*, publicación PCT WO 95/24494). La región de terminación puede derivar de la región 3' del gen del cual se obtuvo la región de inicio o de un gen diferente. Se conocen un gran número de regiones de terminación y se ha encontrado que son satisfactorias en una variedad de anfitriones de los mismos géneros y especies o de géneros y especies diferentes. La región de terminación se selecciona normalmente por asuntos de conveniencia en lugar de por cualquier propiedad concreta.

45

50

55

60

Como se ha observado antes, también se puede utilizar una planta (p. ej., *Glycine max* (soja) o *Brassica napus* (canola)), un tejido vegetal, maíz, patata, girasol, cártamo o lino como anfitrión o célula anfitriona, respectivamente, para la expresión de las enzimas elongasas que pueden, a su vez, ser utilizados en la producción de ácidos grasos poliinsaturados. Más específicamente, los PUFA deseados pueden ser expresados en semillas. Los métodos de aislamiento de aceites de semillas son conocidos en la técnica. De este modo, además de proporcionar una fuente de PUFA, los componentes de los aceites de semillas se pueden manipular por medio de la expresión de los genes de elongasa, así como quizás de genes de desaturasa, con el fin de proporcionar aceites de semillas que se pueden añadir a composiciones nutricionales, composiciones farmacéuticas, alimentos para animales y cosméticos. Una vez más, se introducirá un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica la elongasa conectada operablemente a un promotor en el tejido vegetal o la planta durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la expresión del gen de la elongasa. El vector también puede comprender uno o más genes que codifican otras enzimas, por ejemplo, $\Delta 4$ -desaturasa, $\Delta 5$ -desaturasa $\Delta 6$ -desaturasa, $\Delta 8$ -desaturasa, $\Delta 9$ -desaturasa, $\Delta 10$ -desaturasa, $\Delta 12$ -desaturasa, $\Delta 13$ -desaturasa, $\Delta 15$ -desaturasa, $\Delta 17$ -desaturasa y/o $\Delta 19$ -desaturasa. El tejido vegetal o planta puede producir el sustrato relevante (p. ej., DGLA, GLA, STA, AA, ADA, EPA, 20:4n-3, etc.) sobre el cual actúan las enzimas o un vector que codifica las enzimas que producen tales sustratos se pueden introducir en el tejido vegetal, célula vegetal, o célula anfitriona de interés. Además, se puede pulverizar el sustrato sobre tejidos vegetales que expresan las enzimas apropiadas. Utilizando estas diversas técnicas, se pueden producir PUFA (p. ej., ácidos grasos n-6 insaturados tales como DGLA, AA o ADA, o ácidos grasos n-3 tales como EPA o DHA) mediante el uso de una célula vegetal, tejido vegetal, planta, o célula anfitriona de interés. También se debe observar que la invención abarca asimismo una planta transgénica que comprende el vector descrito antes, donde 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.

65

Los sustratos que pueden ser producidos por la célula anfitriona naturalmente o transgénicamente, así como las enzimas que pueden ser codificadas por las secuencias de ADN presentes en el vector, que es introducido con posterioridad en la célula anfitriona, se muestran en la Figura 1.

A la vista de lo anterior, la presente invención también abarca un método de producción de una de las enzimas elongasa descritas antes que comprende las etapas de: 1) aislar la secuencia de nucleótidos deseada del ADNc de la elongasa; 2) construir un vector que comprende dicha secuencia de nucleótidos; y 3) introducir dicho vector en una célula anfitriona en un tiempo y en unas condiciones suficientes para la producción de la enzima elongasa.

5 La presente invención también abarca un método de producción de ácidos grasos poliinsaturados que comprende exponer un ácido a la elongasa o las elongasas producidas como antes de manera que la elongasa convierte el ácido en un ácido graso poliinsaturado. Por ejemplo, cuando se expone GLA a la elongasa, se convierte en DGLA. Después se puede exponer DGLA a $\Delta 5$ -desaturasa que convierte el DGLA en AA. El AA se puede convertir después en EPA
10 mediante el uso de $\Delta 17$ -desaturasa que se puede convertir, a su vez, en DHA mediante el uso de elongasa y una $\Delta 4$ -desaturasa. Alternativamente, se puede utilizar elongasa para convertir 18:4n-3 en 20:4n-3 que se puede exponer a una $\Delta 5$ -desaturasa y convertir en EPA. La elongasa también se puede utilizar para convertir 18:3n-3 en 20:3n-3, que se puede convertir, a su vez, en 20:4n-3 por medio de una $\Delta 8$ -desaturasa. De este modo, se puede utilizar la elongasa en la producción de ácidos grasos poliinsaturado que se pueden utilizar, a su vez, para fines beneficiosos concretos. (Véase
15 la Figura 1 para una ilustración de los muchos papeles críticos que juega la elongasa en diversas rutas biosintéticas).

Usos del Gen de la Elongasa y la Enzima Codificada De Ese Modo

Como se ha observado antes, los ADNc de elongasa aislados y las correspondientes enzimas elongasa (o péptidos purificados) codificados de ese modo tienen muchos usos. Por ejemplo, cada ADNc y la enzima correspondiente se pueden utilizar indirecta o directamente en la producción de ácidos grasos poliinsaturados, por ejemplo, DGLA, AA, ADA, 20:4n-3 o EPA. (Se pretende que "directamente" abarque la situación en la que la enzima convierte directamente el ácido en otro ácido, el último de los cuales se utiliza en una composición (p. ej., la conversión de GLA en DGLA)). Se pretende que "indirectamente" abarque la situación en la que un ácido graso es convertido en otro ácido graso
25 (esto es, una ruta intermedia) por medio de una elongasa (p. ej., GLA en DGLA) y después el último ácido graso es convertido en otro ácido graso mediante el uso de una enzima diferente de elongasa (p. ej., DGLA en AA por medio de $\Delta 5$ -desaturasa)). Estos ácidos grasos poliinsaturados (esto es, aquellos producidos directamente o indirectamente por la actividad de la enzima elongasa) se pueden añadir, por ejemplo, a composiciones nutricionales, composiciones farmacéuticas, cosméticos, y alimentos para animales, todos los cuales están abarcados por la presente invención.
30 Estos usos se describen con detalle más abajo.

Composiciones Nutricionales

Uno de los usos de los ácidos grasos poliinsaturados de acuerdo con los métodos de la presente invención incluye
35 composiciones nutricionales. Tales composiciones, para los fines de la presente invención, incluyen cualquier alimento o preparación para consumo humano incluyendo el consumo entérico o parenteral, que cuando son absorbidas en el organismo (a) sirven para nutrir o construir tejidos o suministrar energía y/o (b) mantienen, restauran o soportan un estatus nutricional o una función metabólica adecuada.

40 La composición nutricional comprende al menos un aceite o ácido producido mediante el uso de al menos una enzima elongasa, producida utilizando el respectivo gen de elongasa, y puede estar en forma sólida o líquida. Adicionalmente, la composición puede incluir macronutrientes comestibles, vitaminas y minerales en las cantidades deseadas para un uso concreto. La cantidad de tales ingredientes variará dependiendo de si la composición está destinada al uso con lactantes sanos normales, niños o adultos que tienen necesidades especializadas tales como aquellas que acompañan a ciertas condiciones metabólicas (p. ej., trastornos metabólicos).
45

Los ejemplos de los macronutrientes que se pueden añadir a la composición incluyen pero no están limitados a grasas comestibles, carbohidratos y proteínas. Los ejemplos de tales grasas comestibles incluyen pero no están limitados a aceite de coco, aceite de soja, y mono- y diglicéridos. Los ejemplos de tales carbohidratos incluyen pero no están limitados a glucosa, lactosa comestible y almidón hidrolizado. Adicionalmente, los ejemplos de las proteínas que se pueden utilizar en la composición nutricional de la invención incluyen pero no están limitados a proteínas de soja, suero sometido a electrodiálisis, leche desnatada sometida a electrodiálisis, suero de leche, o productos hidrolizados de estas proteínas.
50

55 Con respecto a las vitaminas y minerales, se pueden añadir los siguientes a las composiciones nutricionales: calcio, fósforo, potasio, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc; selenio, yoduro, y Vitaminas A, E, D, C, y el complejo B. También se pueden añadir otras de tales vitaminas y minerales.

Los componentes utilizados en las composiciones nutricionales serán de origen semi-purificado o purificado. Por
60 semi-purificado o purificado se quiere significar un material que ha sido preparado mediante purificación de un material natural o mediante síntesis.

Los ejemplos de las composiciones nutricionales incluyen pero no están limitadas a fórmulas para lactantes, suplementos dietéticos, sustitutos dietéticos, y composiciones para rehidratación. Las composiciones nutricionales de particular interés incluyen pero no están limitadas a aquellas utilizadas para suplementos entéricos y parenterales para lactantes, fórmulas especiales para lactantes, suplementos para ancianos, y suplementos para aquellos con dificultades gastrointestinales y/o mala absorción.
65

ES 2 306 523 T3

La composición nutricional también puede ser añadida al alimento incluso cuando no se requiere un suplemento de la dieta. Por ejemplo, la composición puede ser añadida a alimento de cualquier tipo incluyendo pero no limitado a margarinas, mantequillas modificadas, quesos, leche, yogur, chocolate, dulces, aperitivos, aceites para ensaladas, aceites para cocinar, grasas para cocinar, carnes, pescado y bebidas.

5 En una realización preferida, la composición nutricional es un producto nutricional entérico, más preferiblemente, un producto nutricional entérico para adultos o pediátrico. Esta composición se puede administrar a adultos o niños que experimentan estrés o que tienen necesidades especiales debido a estados de enfermedad crónicos o agudos. La composición puede comprender, además de los ácidos grasos poliinsaturados producidos de acuerdo con la presente
10 invención, macronutrientes, vitaminas y minerales como se ha descrito antes. Los macronutrientes pueden estar presentes en cantidades equivalentes a aquellas presentes en la leche humana o basándose en la energía, esto es, basándose en las calorías.

15 Los métodos para formular fórmulas nutricionales entéricas y parenterales líquidas o sólidas son bien conocidos en la técnica. (Véanse también los Ejemplos de más abajo).

La fórmula entérica, por ejemplo, puede ser esterilizada y utilizada con posterioridad en una base lista para tomar (RTF) o almacenada en un líquido o polvo concentrado. El polvo se puede preparar secando por pulverización la fórmula preparada como se ha indicado antes, y reconstituyéndola mediante rehidratación del producto concentrado.
20 Las fórmulas nutricionales para adultos o pediátricas son bien conocidas en la técnica y se encuentran disponibles en el mercado (p. ej., Similac[®], Ensure[®], Jevity[®] y Alimentum[®] de Ross Products Division, Abbott Laboratories, Columbus, Ohio). Se puede añadir un aceite o ácido graso producido de acuerdo con la presente invención a cualquiera de estas fórmulas.

25 La densidad de energía de las composiciones nutricionales de la presente invención, cuando están en forma líquida, pueden oscilar entre aproximadamente 0,6 Kcal y aproximadamente 3 Kcal por ml. Cuando están en forma sólida o pulverizada, los suplementos nutricionales pueden contener de aproximadamente 1,2 a más de 9 Kcals por gramo, preferiblemente aproximadamente 3 a 7 Kcals por gm. En general, la osmolaridad de un producto líquido debe ser menor de 700 mOsm y, más preferiblemente, menos de 660 mOsm.

30 La fórmula nutricional puede incluir macronutrientes, vitaminas, y minerales, como se ha indicado antes, además de los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención. La presencia de estos componentes adicionales ayuda al individuo a ingerir los requerimientos diarios mínimos de estos elementos. Además de la provisión de PUFA, también puede ser deseable añadir cinc, cobre, ácido fólico y antioxidantes a la composición. Se cree que estas sustancias refuerzan el sistema inmunitario estresado y por lo tanto proporcionarán beneficios adicionales al individuo que recibe la composición. Una composición farmacéutica también puede ser suplida con estos elementos.
35

La composición nutricional comprende, además de antioxidantes y al menos un PUFA, una fuente de carbohidrato donde al menos el 5% en peso del carbohidrato es un oligosacárido no digerible. La composición nutricional puede comprender adicionalmente proteína, taurina, y carnitina.
40

Como se ha observado antes, los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención, o los derivados de los mismos, pueden ser añadidos a un sustituto o suplemento dietético, concretamente una fórmula para lactantes, para pacientes que se someten a alimentación intravenosa o para evitar o tratar la malnutrición u otras condiciones o estados de enfermedad. Como fondo, se debe observar que la leche materna humana tiene un perfil de ácidos grasos que comprende de aproximadamente 0,15% a aproximadamente 0,36% en forma de DHA, de aproximadamente 0,03% a aproximadamente 0,13% en forma de EPA, de aproximadamente 0,30% a aproximadamente 0,88% en forma de AA, de aproximadamente 0,22% a aproximadamente 0,67% en forma de DGLA, y de aproximadamente 0,27% a aproximadamente 1,04% en forma de GLA. De este modo, los ácidos grasos tales como DGLA, AA, EPA y/o ácido docosahexaenoico (DHA), producidos de acuerdo con la presente invención, se pueden utilizar para alterar, por ejemplo, la composición de las fórmulas para lactantes con el fin de imitar mejor el contenido de PUFA de la leche materna humana en una leche de mamífero no humano. En particular, una composición para su uso en un suplemento farmacológico o alimenticio, concretamente un sustituto o suplemento de la leche materna, comprenderá uno o más de AA, DGLA y GLA. Más preferiblemente, la combinación de aceite comprenderá de aproximadamente 0,3 a 30% de AA, de aproximadamente 0,2 a 30% de DGLA, y/o de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 30% de GLA.
45
50
55

Las composiciones nutricionales parenterales que comprenden de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 por ciento en peso de ácidos grasos calculado como triglicéridos son ejemplos de usos de los ácidos poliinsaturados de la presente invención. La composición preferida tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 por ciento en peso de la composición total de PUFA en forma de GLA (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.196.198). Otras vitaminas, concretamente vitaminas liposolubles tales como las vitaminas A, D, E y L-carnitina pueden ser incluidas opcionalmente. Cuando se desea, se puede añadir un conservante tal como alfa-tocoferol en una cantidad de aproximadamente 0,1% en peso.
60
65

Además, las proporciones de AA, DGLA y GLA se pueden adaptar para un uso final concreto dado. Cuando se formula en forma de suplemento o sustituto de leche materna, la 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, res-

pectivamente. Por ejemplo, la leche materna de los animales puede variar en las proporciones de AA:DGLA:GLA oscilando entre 1:19:30 y 6:1:0.2, lo que incluye proporciones intermedias que son preferiblemente de aproximadamente 1:1:1, 1:2:1, 1:1:4. Cuando se producen juntas en una célula anfitriona, se puede utilizar el ajuste de la velocidad y el porcentaje de conversión de un sustrato precursor tal como GLA y DGLA en AA para controlar precisamente las proporciones de PUFA. Por ejemplo, se puede utilizar una velocidad de conversión del 5% al 10% de DGLA en AA para producir proporción de AA con respecto a DGLA de aproximadamente 1:19, mientras se puede utilizar una velocidad de conversión de aproximadamente 75% a 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 anfitrión, se pueden utilizar la regulación del momento, el grado y la especificidad de la expresión de la elongasa, así como la expresión de otras desaturasas, para modular los niveles y proporciones de PUFA. Los PUFA/ácidos producidos de acuerdo con la presente invención (p. ej., AA y DGLA) se pueden combinar después con otros PUFA/ácidos (p. ej., GLA) a las concentraciones y proporciones deseadas.

Adicionalmente, los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención o las células anfitrionas que los contienen también se pueden utilizar como suplementos alimenticios para animales para alterar un tejido de un animal o la composición de ácidos grasos de la leche materna a una más deseable para consumo humano o animal.

Composiciones Farmacéuticas

Otro uso de los ácidos grasos poliinsaturados de la presente invención se encuentra en la producción de una composición farmacéutica que comprende uno o más de los ácidos grasos y/o aceites resultantes producidos utilizando al menos uno de los ADNc de elongasa (i.e., MAELO, GLELO, HSELO1, o CELO), de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Más específicamente, semejante composición farmacéutica puede comprender uno o más de los ácidos y/o aceites así como un portador, coadyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable no tóxico, bien conocido, normalizado 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/aceite. La composición puede estar en forma líquida o sólida. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un comprimido, cápsula, líquido o polvo ingerible, inyectable, o pomada tópica o crema. Se puede mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. Puede ser deseable también incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. Además de tales diluyentes inertes, la composición también puede incluir coadyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes suspensores, agentes edulcorantes; agentes aromatizantes y agentes perfumantes.

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

Las formas de dosificación sólida tales como comprimidos y cápsulas se pueden preparar utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención pueden ser comprimidos con bases para comprimidos tales como lactosa, sacarosa, y almidón de maíz combinados con aglutinantes tales como acacia, 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. Las cápsulas se pueden preparar incorporando estos excipientes a una cápsula de gelatina junto con antioxidantes y los PUFA relevantes. El antioxidante y los componentes PUFA deben ajustarse a las pautas presentadas antes.

Para la administración intravenosa, los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención o los derivados de los mismos se pueden incorporar a formulaciones comerciales tales como IntralipidsTM. El perfil de ácidos grasos en plasma de adulto normal típico comprende de de 6,64 a 9,46% de AA, de 1,45 a 3,11% de DGLA, y de 0,02 a 0,08% de GLA. Estos PUFA o sus precursores metabólicos se pueden administrar solos o combinados con otros PUFA con el fin de lograr un perfil de ácidos grasos normal en un paciente. Cuando se desea, los componentes individuales de las formulaciones se pueden proporcionar individualmente, en forma de kit, para uso único o múltiple. Una dosificación típica de un ácido graso concreto es de 0,1 mg a 20 g (hasta 100 g) diariamente y es preferiblemente de 10 mg a 1, 2, 5 o 10 g diariamente.

Las posibles rutas de administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, por ejemplo, entérica (p. ej., oral y rectal) y parenteral. Por ejemplo, se puede administrar una preparación líquida, por ejemplo, oralmente o rectalmente. Adicionalmente, se puede dispersar completamente una mezcla homogénea en agua, mezclada en condiciones estériles con diluyentes, conservantes, tampones o propelentes fisiológicamente aceptables con el fin de formar una pulverización o inhalante.

La ruta de administración dependerá, por supuesto, del efecto deseado. Por ejemplo, si la composición está siendo utilizada para tratar una piel áspera, seca, o envejecida, para tratar una piel dañada o quemada, o para tratar una piel o un cabello afectados por una enfermedad o afección, quizás se puede aplicar tópicamente.

La dosificación de la composición que se va a administrar a un paciente puede ser determinada por un experto normal en la técnica y depende de diversos factores tales como el peso del paciente, la edad del paciente, el estado inmunitario del paciente, etc.

ES 2 306 523 T3

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 es reconstituido.

Las composiciones farmacéuticas y/o nutricionales anteriores son útiles en el tratamiento de diversos trastornos. En particular, estas composiciones se pueden utilizar para tratar estenosis después de angioplastia. Además, también se pueden tratar con estas composiciones los síntomas de inflamación, la artritis reumatoide, el asma, y la psoriasis. La evidencia también indica que los PUFA pueden estar implicados en el metabolismo del calcio; de este modo, las composiciones se pueden utilizar, quizás, en el tratamiento de la osteoporosis y de las piedras del riñón o el tracto urinario.

Adicionalmente, estas composiciones también se pueden utilizar en el tratamiento del cáncer. Se ha demostrado que las células malignas tienen composiciones alteradas de ácidos grasos. Se ha demostrado que la adición de ácidos grasos ralentiza su crecimiento, ocasiona la muerte celular e incrementa su susceptibilidad a los agentes quimioterapéuticos. Por otra parte, las composiciones de la presente invención también pueden ser útiles para tratar la caquexia asociada con el cáncer.

Estas composiciones también se pueden utilizar para tratar la diabetes (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.826.877 y Horrobin *et al.*, Am. J. Clin. Nutr. Vol. 57 (Suppl.) 732S-737S). Se han demostrado un metabolismo y una composición alterados de los ácidos grasos en animales diabéticos.

Además, estas composiciones, que comprenden PUFA producidos directa o indirectamente por medio del uso de una o varias enzimas elongasas, también se pueden utilizar en el tratamiento del eczema, en la reducción de la presión sanguínea, y en la mejora de las puntuaciones de exámenes matemáticos. Adicionalmente, estas composiciones se pueden utilizar en la inhibición de la agregación de plaquetas, la inducción de vasodilatación, la reducción de los niveles de colesterol, la inhibición de la proliferación de tejido muscular liso y fibroso de la pared del vaso (Brenner *et al.*, Adv. Exp. Med. Siol. Vol. 83, p.85-101, 1976), la reducción o prevención del sangrado gastrointestinal y otros efectos secundarios de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.666.701), la prevención o el tratamiento de la endometriosis y el síndrome premenstrual (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.758.592), y el tratamiento de la encefalomiélitis miálgica y la fatiga crónica después de las infecciones virales (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.116.871).

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

Adicionalmente, estas composiciones se pueden utilizar con fines cosméticos. Se pueden añadir a composiciones cosméticas pre-existentes de manera que se forme una mezcla o se pueden utilizar como una única composición.

Aplicaciones Veterinarias

Se debe observar que las composiciones farmacéuticas y nutricionales descritas antes se pueden utilizar en relación con animales (esto es, domésticos o no domésticos), así como seres humanos, ya que los animales tienen muchas de las necesidades y condiciones de los seres humanos. Por ejemplo, el aceite o los ácidos de la presente invención se pueden utilizar en suplementos alimenticios para animales, sustitutos alimenticios para animales, vitaminas para animales o en pomadas tópicas para animales.

La presente invención se puede ilustrar mediante el uso de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo I

Determinación del Uso de Codones en Mortierella alpina

El extremo 5' de 1.000 clones de ADNc al azar se secuenciaron a partir de una genoteca de ADNc de *Mortierella alpina*. Las secuencias se tradujeron en seis marcos de lectura abiertos utilizando GCG (Genetics Computer Group (Madison, Wisconsin)) con el algoritmo FastA (Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448 (1988)) para investigar la similitud entre la secuencia problema "query sequence" y un grupo de secuencias del mismo tipo (ácido nucleico o proteína), específicamente con la base de datos Swissprot (GeneBio, Ginebra, Suiza). Muchos de los clones se identificaron como un supuesto gen constitutivo ("housekeeping") basado en la homología de la secuencia de proteínas con genes conocidos. Se seleccionaron veintiuna secuencias de ADNc de *M. alpina* que se emparejaban con genes constitutivos conocidos de la base de datos (véase la Tabla 1 de más abajo). La tabla de preferencias codónicas de *M. alpina* (véase la Tabla 2) se generó basándose en estas 21 secuencias así como las secuencias de $\Delta 5$ - (véase Figura 18), $\Delta 6$ -, y $\Delta 12$ -desaturasa de *M. alpina* completas. Puesto que la alineación FastA entre la supuesta proteína codificada por la secuencia de ADN de *M. alpina* y la secuencia de la proteína conocida era débil en algunas zonas, solamente se utilizaron los codones de las zonas de fuerte homología.

ES 2 306 523 T3

TABLA I

| Núm. Clon | Emparejamiento | Núm. de pb | Núm. de aa |
|--------------|---|---------------|---------------|
| 193 | Factor de elongación 1-alfa | 426 | 142 |
| 143 | Proteína ribosomal 60S L17 | 417 | 139 |
| 235 | Actina I | 360 | 120 |
| 299 | Proteína ribosomal 40S YS11 | 387 | 129 |
| 390 | Proteína rab-la relacionada con ras | 342 | 114 |
| 65 | Proteína ribosomal 40S RP10 | 366 | 122 |
| 289 | Enzima de conjugación con Ubiquitina E2-16 KD | 294 | 98 |
| 151 | Ubiquinol-citocromo C reductasa | 375 | 125 |
| 80 | Factor de iniciación 5A-2 | 183 | 61 |
| 33 | Proteína ribosomal 60S L15 | 252 | 84 |
| 132 | Proteína ribosomal 60S L3-2 | 300 | 100 |
| 198 | Histona H3 | 285 | 95 |
| 286 | 6-fosfogluconato deshidrogenasa, descarboxilante | 363 | 121 |
| 283 | Proteína ribosomal 40S S22 | 261 | 87 |
| 127 | Factor de elongación 2 | 231 | 77 |
| 197 | Actina, gamma | 252 | 84 |
| 496 | Proteína ribosomal 40S S16 | 270 | 90 |
| 336 | Histona H4 | 219 | 73 |
| 262 | Ubiquitina | 228 | 76 |
| 188 | Proteína de tipo subunidad beta de la proteína de unión al nucleótido guanina | 213 | 71 |
| 81 | Ubiquitina | 228 | 76 |
| 21 | TOTAL | 6252 | 2084 |

ES 2 306 523 T3

TABLA 2

| | Aminoácido | Preferencia Codónica | % usado | Aminoácido | Preferencia Codónica | % usado |
|----|------------|----------------------|---------|-------------|----------------------|---------|
| 5 | Ala | GCC | 63% | Lys | AAG | 96% |
| 10 | Arg | CGC | 50% | Met | ATG | 100% |
| | Asn | AAC | 97% | Phe | TTC | 78% |
| 15 | Asp | GAC | 65% | Pro | CCC | 68% |
| | Cys | TGC | 87% | Ser | TCC | 46% |
| 20 | Gln | CAG | 78% | Thr | ACC | 78% |
| | Glu | GAG | 85% | Trp | TGG | 100% |
| 25 | Gly | GGT | 47% | Tyr | TAC | 95% |
| | His | CAC | 91% | Val | GTC | 72% |
| 30 | Ile | ATC | 72% | Terminación | TAA | 50% |
| | Leu | CTC | 49% | | | |

35

Ejemplo II

Clonación de un ADNc de tipo Elongasa Completo de *M. alpina*

40

Se alinearon la β -cetoacil-coenzima A sintetasa (KCS) de jojoba y la elongasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ELO2) para determinar una zona de homología de aminoácidos (véase la Figura 2). La preferencia codónica se aplicó a la zona de la secuencia correspondiente a los aminoácidos homólogos entre las dos elongasas, y se diseñaron cebadores basándose en esta preferencia codónica (véase la Figura 3). Se escindió el ADNc de la genoteca de ADNc de *M. alpina* M11 (Knutzon *et al.*, J. Biol. Chem. 273:29360-29366 (1998)), que contiene aproximadamente 6 X 10⁵ clones con un tamaño medio de inserto de 1,1 Kb. El ADNc escindido se amplificó con el cebador interno RO339 (5' -TTG GAG AGG AGG AAG CGA CCA CCG AAG ATG ATG- 3') y un cebador directo del vector RO317 (5' -CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC G - 3'). Se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un volumen de 100 μ l que contenía: 300 ng de la genoteca de ADNc de *M. alpina* escindido, 50 pmoles de cada cebador, 10 μ l de tampón 10X, 1 μ l de Mezcla de Nucleótidos para PCR 10 mM (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) y 1,0 U de Polimerasa Taq. Las condiciones del Termociclador Perkin Elmer 9600 (Norwalk, CT) fueron las siguientes: 94°C durante 2 mins., después 30 ciclos de 94°C durante 1 min., 58°C durante 2 mins., y 72°C durante 3 mins. La PCR estuvo seguida de una prolongación adicional a 72°C durante 7 minutos.

55

El producto amplificado mediante PCR se hizo correr sobre un gel, se purificó en gel un fragmento amplificado de aproximadamente 360 pb, y el fragmento aislado se secuenció directamente utilizando un ABI 373A DNA Sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA). El paquete para el análisis de la secuencia de GCG se utilizó para comparar la secuencia obtenida con secuencias conocidas. La secuencia fue traducida en los seis marcos de lectura del Programa de Análisis de GCG utilizando el algoritmo FastA (Pearson y Lipman, *supra*). Se investigó la base de datos Swissprot (GeneBio, Ginebra, Suiza) de proteínas. Este fragmento de ADN traducido se identificó como parte de una supuesta elongasa basándose en la homología de la supuesta secuencia de proteínas para la ELO2 de *S. cerevisiae* (GNS1), que tenía una identidad del 41,3% en 63 aminoácidos.

60

65

Se diseñaron nuevos cebadores basándose en la supuesta secuencia de elongasa y se utilizó la secuencia del vector, pZL1 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) para construir la genoteca de ADNc de *M. alpina*. La genoteca de ADNc escindido de *M. alpina* se amplificó mediante PCR utilizando cebadores R0350 (5' -CAT CTC ATG GAT CCG CCA TGG CCG CCG CAA TCT TG- 3'), que tiene un sitio de restricción *Bam*HI añadido (subrayado), y el

cegador inverso del vector R0352 (5' -ACG CGT ACG TAA AGC TTG- 3') para aislar el ADNc de elongasa de *M. alpina* completo, utilizando las condiciones previamente descritas. Los extremos del fragmento amplificado por PCR de aproximadamente 1,5 Kb se rellenaron con ADN polimerasa de T4 (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) para crear extremos romos y se clonaron en el vector romo pCR (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Esto dio como resultado dos clones, pRAE-1 y pRAE-2 (véase la Figura 4A). (El plásmido DNA pRAE-2 se depositó en la Colección de Cultivos Tipo Americana, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, el 28 de Agosto de 1998, bajo los términos del Tratado de Budapest, y se acordó el número de depósito ATCC 203166.) Los ADNc de elongasa de estos vectores se cortaron en forma de un fragmento *EcoRI* y se clonaron en el vector pYX242 digerido con *EcoRI* (Novagen, Madison, WI). Los clones pRAE-5 y pRAE-6 (véase la Figura 4B) tienen los ADNc de elongasa de pRAE-1 y pRAE-2, respectivamente. (El plásmido DNA pRAE-5 se depositó en la Colección de Cultivos Tipo Americana, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, el 28 de Agosto de 1998, bajo los términos del Tratado de Budapest, y se acordó el número de depósito ATCC 203167). La secuenciación de pRAE-5 y pRAE-6 reveló que la región 5' no traducida del gen de la elongasa de pRAE-5 es 16 pb más corta que la de pRAE-6 (véase la Figura 5). La secuencia del ADNc de elongasa de *M. alpina* completa, denominada MAELO se obtuvo a partir de pRAE-2 (véase la Figura 6). La Figura 7 es la secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la traducción de MAELO. La base de datos Swissprot (GeneBio, Ginebra, Suiza) se investigó de nuevo, como se ha descrito previamente, con MAELO traducida: MAELO tiene una identidad del 44,3% en 317 aminoácidos con GNS1 (ELO2) de *S. cerevisiae* y una identidad del 44,7% en 318 aminoácidos con SUR4 (ELO3) de *S. cerevisiae*. El alineamiento FastA entre las tres elongasas se muestra en la Figura 8. A nivel de nucleótidos (véase la Figura 9), MAELO tiene una identidad del 57,4% en el solapamiento de 549 pb con GNS1 (ELO2) de *S. cerevisiae* (Núm. de Acceso GenBank S78624). No obstante, la identidad entre el gen MAELO completo de 954 pb y GNS1(ELO2) de *S. cerevisiae* es del 33,0%.

25 Ejemplo III

Expresión del ADNc de Elongasa de M. alpina en Levadura Panadera

Los constructos pRAE-5, y pRAE-6 se transformaron en *S. cerevisiae* 334 (Hoveland *et al.*, Gene 83:57-64 (1989)) y se escrutaron en cuanto a la actividad elongasa. El plásmido pCGN7875 (Calgene LLC, Davis, CA) que contenía el gen KCS de jojoba en el vector pYES2 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) se utilizó como control positivo. El sustrato utilizado para detectar la actividad elongasa en la elongasa de *M. alpina* (MAELO) fue GLA y el de la KCS de jojoba fue el ácido oleico (OA). La cepa de control negativo fue *S. cerevisiae* 334 que contenía el vector pYX242. Los cultivos se hicieron crecer durante 40-48 horas a 25°C, en medio selectivo (Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, Cap. 13, págs. 3-5 (1992)), en presencia de un sustrato concreto. La expresión del gen KCS de jojoba clonado en pYES2 estaba bajo el control del promotor GAL1, mientras el promotor en pYX242 era TP1, que es constitutivo. Por tanto, los cultivos de 334(pCGN7875) y 334(pYES2) fueron inducidos con galactosa. El análisis GC-FAME de la fracción lipídica de cada sedimento celular se realizó como se ha descrito previamente (Knutzon *et al.*, *supra*).

Los resultados de la actividad elongasa de diferentes experimentos se proporcionan en las Figuras 10A y 10B. La KCS de jojoba prolonga los ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga 18:1n-9 a 20:1n-9. La homología de aminoácidos entre la elongasa de *M. alpina* (MAELO) y ELO2 y ELO3 de *S. cerevisiae* sugirió que las proteínas codificadas por estos genes pueden tener una especificidad de sustrato similar. La actividad de la elongasa de *M. alpina*, la elongación (MAELO) de los ácidos grasos monoinsaturados y saturados de cadena larga, se observa en la conversión de 18:1n-9 en 20:1n-9 y también en la síntesis de 24:0. La cepa de control, 334(pYX242) tiene una cantidad muy pequeña o no detectable de 20:1 y 24:0 (véase la Figura 10A). La elongasa de *M. alpina* (MAELO) también actúa sobre al menos un PUFA, convirtiendo 18:3n-6(GLA) en 20:3n-6(DGLA). El porcentaje de 20:3n-6 en los lípidos totales es mayor en la cepa 334(pRAE-5) y 334(pRAE-6) con el ADNc de elongasa de *M. alpina* (MAELO) cuando se comparaba con el de 334(pYX242) de control. Los porcentajes de 20:3n-6 producidos fueron 0,092% para 334(pYX242) vs. 0,324% para 334(pRAE-5) y 0,269% para 334(pRAE-6) (mostrado entre paréntesis en las Figuras 10A y 10B). Esta diferencia en el perfil de ácidos grasos también se observa en la cantidad total de 20:3n-6 producido. Solamente se produjeron 0,226 µg de 20:3n-6 por medio de 334(pYX242) mientras 334(pRAE-5) y 334(pRAE-6) produjeron 2,504 µg de 20:3n-6 y 1.006 µg de 20:3n-6, respectivamente. Asimismo, cuando no se añade sustrato, el nivel de 20:3n-6 no es detectable.

Una vez que 20:3n-6 es generado por la elongasa de *M. alpina* (MAELO), la Δ5-desaturasa puede convertirlo en AA en el sistema de expresión deseado. Para someter a ensayo esta hipótesis, los constructos pRAE-5 y pCGR-4 (un plásmido que contiene Δ5-desaturasa) fueron co-transformados en *S. cerevisiae* 334 y escrutados en cuanto a la producción de AA. El sustrato utilizado fue GLA 25 µM (18:3n-6). Si la elongasa de *M. alpina* (MAELO) es activa en levadura, el sustrato se convertirá en DGLA(20:3n-6), que la Δ5-desaturasa convertirá en AA(20:4n-6). Los resultados de la Figura 11 confirman la producción de AA y por lo tanto, la actividad de la elongasa de *M. alpina* (MAELO).

La expresión de las Δ5-, Δ6-, y Δ12-desaturasas, en levadura, junto con la elongasa, debe dar como resultado la producción de AA (véase la Figura 1) sin la necesidad de un suministro exógeno de ácidos grasos.

Ejemplo IV

Una Comparación de la Expresión del ADNc de Elongasa de M. alpina MAELO y Elongasa de S. cerevisiae ELO2 en Levadura Panadera

5 El gen de ELO2 que codifica la elongasa de levadura se clonó a partir de la genoteca genómica de *S. cerevisiae* (Origene, Rockville, MD) utilizando los cebadores R0514 (5' -GGC TAT GGA TCC ATG AAT TCA CTC GTT ACT CAA TAT G-3') y R0515 (5' -CCT GCC AAG CTT TTA CCT TTT TCT TCT GTG TTG AG-3') que incorporan los sitios de restricción (subrayados) *Bam*HI y *Hind*III (respectivamente). El gen de ELO2 se clonó en el vector pYX242 en los sitios *Bam*HI y *Hind*III, denominado pRELO, se transformó en el anfitrión *S. cerevisiae* 334 (Hoveland *et al.*, *supra*) y se escrutó en cuanto a la actividad elongasa de PUFA. Se utilizó el vector plasmídico como control negativo y se hizo crecer 334(pRAE-5) para comparar la actividad elongasa de PUFA. Los cultivos se hicieron crecer como se ha descrito previamente sin galactosa en el medio y se añadió GLA 25 μ M como sustrato. La Figura 12 muestra que la cantidad de 20:3n-6 o DGLA producida (elongada a partir de 18:3n-6 o GLA) por medio de 334(pRAE-5) era aproximadamente 4 veces el control negativo que contenía el vector pYX242 inalterado, mientras los dos clones individuales 334(pRELO-1) y 334(pRELO-2) eran solamente dos veces el control negativo. Adicionalmente, cuando el DGLA producido es expresado como un porcentaje de los lípidos totales (mostrado entre paréntesis, Figura 12), los clones 334(pRELO-1) y 334(pRELO-2) produjeron 0,153% y 0,2% de DGLA respectivamente, mientras 334 (pYX242) produjo 0,185% de DGLA. Por tanto todas estas cepas produjeron porcentajes comparables de DGLA. La cepa 334(pRAE-5), sin embargo, produjo 0,279% de DGLA, un incremento de 50,8% sobre 334(pYX242) (control negativo). Estos datos muestran que el gen ELO2 de elongasa de *S. cerevisiae*, incluso cuando se expresaba al alza en levadura, no prolongaba GLA a DGLA eficazmente. La actividad elongasa de PUFA de *M. alpina* es específica para esta conversión como evidencia la mayor cantidad de DGLA producido en comparación con el control, 334(pYX242).

Ejemplo V

Identificación de Elongasas de Otras Fuentes Utilizando MAELO

30 Se utiliza el algoritmo TFASTA (Pearson y Lipman, *supra*) para investigar la similitud entre una secuencia peptídica problema y la secuencia de ADN de la base de datos traducida en cada uno de los seis marcos de lectura. Se utilizó MAELO traducida como problema para la búsqueda TFASTA en GCG con la base de datos GenEMBL (6/98) a partir de GCG para identificar otras secuencias de elongasa potenciales basadas en sus comparaciones de la similitud de aminoácidos con la MAELO traducida. Por ejemplo, en las Figuras 13 y 14, se muestran dos alineamientos entre las traducciones de dos secuencias de *C. elegans* diferentes del cromosoma III y MAELO. La secuencia de ADN de *C. elegans* (Núm. de Acceso GenBank Z68749) se anotó indicando la similitud con GNS1 (ELO2), mientras la secuencia de ADN de *C. elegans* adicional (Núm. de Acceso GenBank U61954) se anotó como similar tanto a GNS1 como a SUR4 (ELO3). Estos son fragmentos de ADN empalmados en los que se han eliminado los intrones de la secuencia genómica, y los exones se han ensamblado y traducido. La cantidad de identidad de aminoácidos entre las supuestas elongasas de PUFA de *C. elegans* y la MAELO traducida están en torno al 30%. Esto apuntaría a una función común en el metabolismo de los ácidos grasos, p. ej., una elongasa de PUFA. La Figura 15 es otro ejemplo de secuencia de *C. elegans* traducida (Núm. de Acceso GenBank AF003134) del cromosoma III. Se identificó que la secuencia de ADN tenía homología con ELO2 de *S. cerevisiae*. Una inspección adicional de esta secuencia de ADN y su traducción a aminoácidos determinó que había homología con la MAELO traducida. Por lo tanto, *C. elegans* puede contener una elongasa de PUFA.

La Figura 16 muestra los alineamientos de las secuencias de ADN traducidas de ratón y ser humano, respectivamente, con MAELO traducida. La secuencia de ratón CIG30, Núm. de Acceso GenBank U97107, se aisló a partir de tejido adiposo pardo y se informó que era "similar a la proteína SUR4 de levadura". Como se muestra en la Figura 16, los aminoácidos numerados de 130 a 152 en la traducción de U97107 contienen un alto grado de similitud con la MAELO traducida. La secuencia humana, Núm. de Acceso GenBank AC004050, del cromosoma 4 era de una HTGS (Secuencia Genómica de Alto Rendimiento "High Throughput Genome Sequence"). No había anotaciones en esta secuencia. No obstante, AC004050 traducido tenía una identidad del 28,7% en 150 aminoácidos con MAELO traducida. Este fragmento génico podría ser un fragmento de una elongasa de PUFA humana basándose en su similitud de aminoácidos con la MAELO traducida.

La Figura 17 muestra el alineamiento de aminoácidos de MAELO traducida y una secuencia de mamífero (Núm. de Acceso GenBank 105465, PCT Núm. WO 88/07577) que reivindica que la proteína derivada de la expresión de esta secuencia es un factor de inhibición de la glicosilación. Las identidades de aminoácidos entre las dos proteínas, significaban que podía haber una función relacionada, tal como una actividad elongasa de PUFA.

Estos ejemplos de otras secuencias de ADN traducidas y su homología con la MAELO traducida ilustran que cualquiera de los ejemplos anteriores podría ser potencialmente una elongasa de PUFA. Estos ejemplos no incluyen todas las posibles elongasas. Sin embargo, el uso de MAELO o de su traducción a aminoácidos como interrogante para las búsquedas de bases de datos puede identificar otros genes que tienen actividades elongasa de PUFA.

ES 2 306 523 T3

Ejemplo VI

Escrutinio de la Genoteca de ADNc de M. alpina Utilizando un Método de Hibridación en Placa

5 En un esfuerzo para aislar genes de elongasa de PUFA adicionales de *M. alpina*, se utilizó un método de hibridación en placa convencional para escrutar una genoteca de ADNc de *M. alpina* elaborada en un vector lambda. La sonda de ADN se generó basándose en la secuencia de nucleótidos de MAELO y se utilizó para escrutar la genoteca de ADNc de *M. alpina* M7+8 elaborada en un vector λ Ziplox (Knutzon *et al.*, J. Biol. Chem. 273:29360-29366 (1998)).

10 Para elaborar la sonda de ADN para escrutar la genoteca, se digirió el ADNc de MAELO con las endonucleasas de restricción *NspI* y *PvuI*. Se produjeron tres pequeños fragmentos de ADN, con un tamaño medio de aproximadamente 300 pb, y se utilizaron como sondas.

15 La razón fundamental para utilizar una mezcla de ADNc de MAELO fragmentado se basaba en la suposición de que podría haber una región común o dominio en la secuencia de aminoácidos que estuviera conservada entre diferentes elongasas de PUFA presentes en *M. alpina*. Utilizando las sondas de ADN de MAELO, se escrutó la genoteca de ADNc mediante la técnica de hibridación en placa de acuerdo con el protocolo normalizado (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, 1989).

20 Brevemente, se cultivaron 50.000 clones primarios y se transfirieron a membranas de nailon. Las membranas se desnaturalizaron y se hibridaron con sondas de ADN de MAELO marcadas con dCTP-P³²-alfa durante la noche en el tampón de hibridación que contenía formamida al 20%, PVP al 0,2%, BSA, Ficoll, SDS al 0,1% y NaCl 0,5 M. Los filtros se lavaron con 0,5X SSC a 37°C y se expusieron a película de rayos X para la autorradiografía. Este procedimiento se repitió tres veces. Cuatro clones (denominados F1, F2, F3, y F4) que hibridaban repetidamente se seleccionaron y se suspendieron en tampón SM (Sambrook *et al.*, *supra*) que contenía DMSO al 7%.

25 El marco de lectura abierto más grande de cada candidato se subclonó en el vector de expresión de levadura pYX242 (Novagen, Inc., Madison, Wisconsin). Los clones de ADNc F1 y F3 se subclonaron en pYX242 en el sitio *EcoRI* mientras F2 y F4 se subclonaron en los sitios *NcoI/HindIII*. El pYX242 recombinante que contenía cada candidato se transformó en SC334 (Hoveland *et al.*, *supra*) para su expresión en levadura. Para determinar la actividad elongasa, así como la especificidad de sustrato, se hizo crecer SC334 que contenía cada clon de ADNc en medio mínimo carente de leucina en presencia de 25 μ M de sustrato GLA como se describe en el Ejemplo III. El análisis de ácidos grasos se realizó como describen Knutzon *et al.* (J. Biol. Chem. 273:29360-29366 (1998)). Los resultados indicaron que ninguno de estos cuatro clones de ADNc mostraba actividad significativa alguna en la conversión de GLA en DGLA. De este modo, el enfoque de la hibridación parecía no tener éxito en la identificación de elongasas de PUFA adicionales.

Ejemplo VII

40 *Construcción de la Genoteca de Expresión de ADNc Directa de M. alpina en Levadura*

Para identificar los genes de elongasa de PUFA distintos de MAELO, se adoptó un enfoque diferente para escrutar la genoteca de ADNc de *M. alpina*. En particular, puesto que la levadura panadera es incapaz de producir PUFA de cadena larga debido a la ausencia de las respectivas desaturasas y elongasas, se realizó un intento para construir una genoteca de expresión de ADNc de *M. alpina* en *Saccharomyces cerevisiae*. El vector pYES2 (Novagen, Inc., Madison, Wisconsin), que contenía el promotor GALL, se seleccionó para la expresión de la genoteca de ADNc en *S. cerevisiae*.

50 El modo convencional por medio del cual se elabora una genoteca de ADNc (esto es, la transformación de una mezcla de ADNc/ADN ligado al vector en células anfitrionas) es difícil en levadura debido a que la eficacia de transformación mediante electroporación directa de la mezcla de ADN ligada es muy baja en comparación con la eficacia del ADN plasmídico superenrollado purificado. No obstante, la mayor ventaja de este método es que evita la amplificación de clones primarios que se produce cuando la genoteca está elaborada en *E. coli* como intermedio. Debido a la limitación en el número de colonias que se iba a escrutar, se decidió optimizar primero la eficacia de transformación en diferentes cepas de *S. cerevisiae* utilizando la mezcla ADNc/ligado al vector. Los mejores resultados se obtuvieron con un rendimiento de 4-5 x 10⁵ transformantes por μ g de ADN ligado en la cepa SC334 de *S. cerevisiae* (Hoveland *et al.*, *supra*).

60 Para elaborar una genoteca de ADNc de *M. alpina* directa en levadura se aisló el ARN total del hongo. El hongo *M. alpina* (Núm. ATCC 32221) se cultivó en placa sobre agar de harina de maíz (Difco Laboratories, Detroit, MI) y se hizo crecer a la temperatura ambiente durante 3-4 días. Una vez que el crecimiento del hongo fue visible, se inoculó en 50 ml de caldo de dextrosa patata y se sacudió a la temperatura ambiente muy lentamente para formular esporas. Una vez que las esporas fueron visibles, se inocularon los 50 ml de cultivo en un cultivo de 1 litro de dextrosa patata, y las esporas se hicieron crecer durante 72 horas. Después de filtrar a través de una gasa estéril, las células se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para la futura extracción del ARN. El ARN total se preparó a partir de 36 g de sedimento celular utilizando el método de extracción con fenol/LiCl caliente (Sambrook *et al.*, *supra*). Los sedimentos celulares se homogeneizaron en una solución de EDTA 10 mM, SDS al 1% y acetato de sodio 200 mM, pH 4,8. Se

ES 2 306 523 T3

añadieron fenol y cloroformo a los productos homogeneizados, y la capa acuosa se extrajo. La capa acuosa se volvió a extraer una vez más con fenol y cloroformo. Después se añadió un volumen igual de cloruro de litio 4 M. Las muestras se precipitaron con etanol sobre hielo durante 3 horas, y los sedimentos se obtuvieron mediante centrifugación. Los sedimentos de ARN se lavaron con etanol del 70% y se resuspendieron en agua tratada con DEPC. El ARN total se cuantificó mediante espectrofotometría y se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar la presencia de bandas ribosomales 28S y 18S. Aproximadamente, se obtuvieron 15 mg del ARN total a partir de 36 g de sedimento celular.

La genoteca se construyó de acuerdo con el protocolo normalizado (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, 2ª Ed. Cold Spring Harbor, 1989). Se preparó ARN mensajero a partir del ARN total utilizando la purificación por afinidad en oligo dT celulosa. El ARN mensajero fue transcrito inversamente con cebador oligo dT que contenía un sitio de restricción *XhoI* utilizando la transcriptasa inversa de AMV. Después de la síntesis de la primera hebra de ADNc, se sintetizó la segunda hebra añadiendo ADN polimerasa de *E. coli*, ADN ligasa de *E. coli* y ARNasa H.

El adaptador *EcoRI* se ligó en el ADNc con extremos romos por medio de la ADN ligasa de T4. La muestra de ADN se trató con quinasa utilizando polinucleótido quinasa y se digirió con *XhoI*, se diluyó con tampón de la columna y se hizo pasar a través de una columna Sephacryl S-400. Las muestras de ADN se hicieron eluir mediante un tampón con un alto contenido de sal. Las muestras que contenían ADN de 400-5.000 pb se reunieron y se utilizaron para la ligación en un vector pYES2 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). El ADNc se ligó en el vector pYES2 digerido con *EcoRI/XhoI* utilizando ADN ligasa de T4. Se llevó a cabo una reacción de ligación a gran escala puesto que se requiere una gran cantidad del ADN ligado (2-3 μ g) en la transformación directa de levadura.

Para transformar células de levadura directamente con la mezcla ligada ADNc/pYES2, se prepararon células SC334 competentes utilizando el método LiAc TRAF0 (Gietz *et al.*, Mol. Cell. Biol, 5: 255-269, 1995). Brevemente, se inoculó cultivo fresco de SC334 de la placa en 50 ml de medio YPD. El cultivo se hizo crecer a 30°C con sacudimiento hasta alcanzar una DO a 600 de 1,0. Se inocularon 30 ml de este iniciador en 300 ml de medio líquido YPD y se incubaron con sacudimiento hasta que el número de células del cultivo alcanzó $\sim 3-5 \times 10^6$ células/ml (aproximadamente 3-4 h). Las células se cosecharon y se lavaron con agua estéril. El sedimento celular completo se resuspendió en 1,5 ml de 1X TE/LiAc (LiAc 0,1M) recién preparado. Estas células se utilizaron inmediatamente para las transformaciones.

Se tomaron alícuotas de 750 μ l de células SC334 competentes en tubos falcon de 15 ml. Aproximadamente se añadieron 2 μ g de ADNc/ADN pYES2 ligado a las células junto con ADN portador y se mezclaron suavemente. Se añadieron tres mililitros de PEG/LiAc al 40% estéril a las células y se mezclaron suave pero cuidadosamente. Las células se incubaron a 30°C durante 30 minutos con sacudimiento y con posterioridad se les dio un choque térmico a 42°C durante 15 minutos. Las células se enfriaron, se sedimentaron, y se resuspendieron en 5 ml de 1X TE. Se cultivó en placa una alícuota de 100 μ l de las células anteriores sobre cincuenta placas de agar selectivo de 150 mm que carecían de uracilo (Ausubel *et al.*, *supra*) y se incubaron a 30°C durante 3 días. Se obtuvieron un total de 8×10^5 colonias primarias. Se reunieron cinco colonias en 1 ml de medio mínimo carente de uracilo (Ausubel *et al.*, *supra*) y se añadió glicerol para preparar soluciones de partida. Se elaboraron un total de 5.000 reservas para el escrutinio.

Ejemplo VIII

Escrutinio de MAD (*M. alpina* Directo) en Levadura

La calidad de la genoteca se analizó determinando el tamaño medio de los ADNc de la genoteca. Puesto que el escrutinio de la genoteca se basó en la expresión del ADNc, fue importante determinar el tamaño medio del ADNc presente en la genoteca. La genoteca de expresión que contenía los ADNc más largos sería la elección más apropiada para aislar los ADNc completos de interés. A este fin, las reservas seleccionadas al azar se cultivaron en placa sobre placas de agar selectivo, como se describe en el Ejemplo VII, para obtener colonias individuales. Se seleccionaron al azar cuarenta colonias de levadura diferentes, y cada colonia se inoculó en 5 ml de medio líquido selectivo carente de uracilo (como se describe en el Ejemplo VII) y se hicieron crecer, mientras se sacudían, durante 24 horas a 30°C. El ADN plasmídico se extrajo de estas colonias mediante el método de ruptura de la membrana (Hoffman *et al.*, Gene 57:267 (1987)) adaptado como sigue:

Se lisaron los sedimentos de 5 ml de cultivo en 0,5 ml de solución de NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM y SDS al 0,1%. Se añadieron cuentas de vidrio de 0,5 mm estériles de volumen igual y se sometieron a vórtice manualmente durante 3 minutos. Se añadieron 200 μ l del mismo tampón, y la mezcla se sometió a vórtice durante un minuto más. Las muestras se centrifugaron al máximo durante 2 minutos, y el extracto citoplásmico se transfirió después a un tubo nuevo. Se añadió un volumen igual de fenol/CHCl₃ a la muestra, se sometió a vórtice y se centrifugó de nuevo durante 2 minutos. La capa acuosa se volvió a extraer 2 veces y se hizo precipitar con acetato de sodio 0,3 M y aproximadamente 2,5 volúmenes de etanol durante 30 minutos a -20°C. Los productos precipitados se lavaron con etanol del 70% y se volvieron a resuspender en agua. Para eliminar el ARN y cualquier contaminación con proteína, los ADN plasmídicos aislados de 40 muestras diferentes se purificaron adicionalmente utilizando QIAprep Spin Miniprep Kit de acuerdo con el protocolo del fabricante (Qiagen Inc., Valencia, CA). Las muestras de ADN plasmídico se restringieron después con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *XhoI* para liberar el fragmento de ADNc, y el producto digerido se analizó sobre gel de agarosa al 1%. Los resultados indicaron que la mayoría de los ADNc de la genoteca directa tenían una longitud variable de 0,8 Kb a 1,5 Kb.

ES 2 306 523 T3

Para escrutar la genoteca, se descongelaron las soluciones de partida en glicerol y se añadieron aproximadamente 0,5 ml a 5 ml de medio selectivo líquido carente de uracilo (Ausubel *et al.*, *supra*) y se hicieron crecer a 30°C durante 24 horas. El cultivo se transfirió después a 50 ml de medio selectivo líquido carente de uracilo con galactosa al 2% y GLA 25 μ M (sustrato para la enzima elongasa) durante 24 horas a 25°C con sacudimiento. El análisis GC-FAME del contenido de lípidos del sedimento celular de cada cultivo inducido se realizó como se ha descrito previamente (Knutzon *et al.*, *supra*). Se utilizó MAELO (pRAE-5 en pYX242 desarrollado en medio selectivo carente de leucina) como control positivo en cada ronda del lote. MAELO había sido capaz consecuentemente de convertir el 1,5% de GLA en DGLA (véase el Ejemplo III).

Ejemplo IX

Identificación de un ADNc que Codifica una Elongasa de PUFA Potencial

Después de escrutar y analizar aproximadamente 750 reservas individuales mediante análisis GC-FAME, como se describe en el Ejemplo VIII, una reserva de cinco colonias (esto es, MAD708) parecía tener una actividad enzimática significativa en la conversión de GLA en DGLA. Se encontró que esta actividad era aproximadamente 5 veces mayor que la actividad elongasa de *M. alpina* (MAELO) en términos de la proporción DGLA/GLA (Figura 19). Esta reserva se sometió a ensayo en condiciones de análisis idénticas para confirmar los descubrimientos iniciales. El experimento repetido mostró una conversión de 9,5% de GLA en DGLA y fue de nuevo en torno a 5 veces superior que la actividad elongasa de *M. alpina* (MAELO). Estos resultados indicaban fuertemente que la reserva MAD708 contenía una elongasa candidato que era específica para GLA como sustrato. Puesto que MAD708 era una reserva de cinco clones diferentes, fue necesario aislar el clon de ADNc individual que codificaba la actividad elongasa de esta reserva. Para hacer esto, la solución de partida en glicerol de MAD708 original se cultivó en placa sobre una placa de agar de medio selectivo que carecía de uracilo (Ausubel *et al.*, *supra*). Se escogieron treinta colonias individuales y se hicieron crecer en medio selectivo líquido, carente de uracilo con galactosa al 2%, como se ha descrito previamente en el Ejemplo VIII, en presencia de GLA. El sedimento celular obtenido de cada cultivo se sometió después a análisis GC-FAME graso (Knutzon *et al.*, *supra*) junto con un control positivo de 334 (pRAE-5)(MAELO en pYX242). El análisis de ácidos grasos de los 30 clones individuales de la reserva de expresión MAD708 en levadura reveló que 5 de los 30 clones mostraba actividad elongasa en la conversión de GLA en DGLA. Los perfiles de ácidos grasos de los clones MAD708-2, MAD708-10, MAD708-18, MAD708-19 y MAD708-30 activos se muestran en la Figura 20. Como se muestra en esta Figura, MAD708-2, 10, y 30 producían la mayor parte de DGLA, aproximadamente 25 veces más que MAELO (pRAE-5). Estos 3 convertían en el intervalo del 41% al 49% de GLA en DGLA. Otros clones, MAD708-18 y MAD708-19, convertían 8% y 21% de GLA en DGLA, respectivamente. Todos los clones MAD708 convertían un porcentaje mayor de GLA en DGLA con respecto a la elongasa codificada MAELO (3,4%).

Ejemplo X

Caracterización de los ADNc que Codifican Elongasa

Se extrajo el ADN plasmídico de los clones de levadura SC334 (reserva MAD708) que mostraron una actividad elongasa específica de GLA significativa mediante el método de ruptura de la membrana, como se describe en el Ejemplo VIII. Para determinar el tamaño del inserto de ADNc, se realizó la PCR utilizando cada ADN plasmídico obtenido de clones de elongasa positivos como molde. El cebador directo RO541 (5'- GAC TAC TAG CAG CTG TAA TAC -3') y el cebador inverso R0540 (5'- GTG AAT GTA AGC GTG ACA TAA -3') se encuentran en el sitio de multiclonación del vector pYES2 y se utilizaron para amplificar el inserto de ADNc en los sitios *EcoRI* y *XhoI*. Se llevó a cabo la reacción de PCR en un volumen de 50 μ l que contenía 4 μ l de ADN plasmídico, 50 pmoles de cada cebador, 5 μ l de tampón 10X, 1 μ l de Mezcla de Nucleótidos para PCR 10 μ M (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) y 0,5 μ l de polimerasa High Five Taq (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). La amplificación se llevó a cabo como sigue: 2 mins. desnaturalización a 94°C, después 94°C durante 1 min., 55°C durante 2 mins., y 72°C durante 3 mins. durante 30 ciclos, y 7 mins. de prolongación a 72°C al final de la amplificación. El análisis de los productos amplificados por PCR sobre un gel de agarosa al 1% mostró que los tamaños de los ADNc de elongasa estaban en torno a 1,0 - 1,2 Kb. Los ADN plasmídicos, que contenían los ADN de elongasa potenciales, se denominaron pRPB2, pRPB10, pRPB18, pRPB19, y pRPB30. Puesto que la genoteca de ADNc estaba elaborada en el vector pYES2 en los sitios *EcoRI* y *XhoI*, el tamaño del ADNc presente en cada plásmido fue confirmado adicionalmente mediante digestión de los plásmidos anteriores con *EcoRI* y *XhoI*.

Los ADN plasmídicos aislados de levadura fueron re-amplificados en *E. coli* para el almacenamiento a largo plazo de los clones de ADNc así como para la secuenciación del ADN. Las células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) se transformaron con los plásmidos recombinantes pRPB de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los transformantes obtenidos de cada ADN plasmídico se inocularon en LB que contenía ampicilina (50 μ g/ml) y se hicieron crecer durante la noche a 37°C con sacudimiento. Los ADN plasmídicos se aislaron de estos cultivos utilizando QIAprep Spin Miniprep (Qiagen Inc., Valencia, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los ADN plasmídicos purificados se utilizaron después para secuenciar ambos extremos 5' y 3'. La secuenciación del ADN se realizó utilizando un secuenciador de ADN automatizado 373A Stretch ABI (Perkin Elmer, Foster City, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los cebadores utilizados para la secuenciación fueron el cebador directo RO541 (5'- GAT TAC TAG CAG CTG TAA TAC -3') y el cebador inverso R0540 (5'- GTG AAT GTA AGC GTG ACA TAA

ES 2 306 523 T3

-3') contenidos en los sitios de multiclonación del vector pYES2. Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron transferidas al programa de soporte lógico Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) para su análisis. El análisis de la secuencia del ADN reveló que los cinco ADNc de elongasa contenían la secuencia de nucleótidos idéntica con un solapamiento común de 301 nucleótidos. Cada secuencia de ADN contiene un supuesto sitio de inicio al principio del extremo 5' y un codón de terminación con una cola poli A en el extremo del sitio 3'. Para confirmar adicionalmente la secuencia de ADN, se diseñaron cebadores directos internos R0728 (5'- GAG ACT TTG AGC GGT TCG -3') y R0730 (5'- TCT CTG CTG CGT TGA ACT CG -3'), junto con cebadores inversos R0729 (5'- AAA GCT CTT GAC CTC GAA C -3') y R0731 (5'- AAC TTG ATG AAC GAC ACG TG -3') en el ADNc, y se utilizaron para la secuenciación de pRPB2, puesto que este candidato poseía la actividad elongasa más elevada. Se analizó la secuencia de nucleótidos completa por medio del programa Sequencher (Figura 21), y el marco de lectura abierto más largo deducido de la secuencia de ADNc completa en pRPB2 parecía tener 957 pb de longitud (Figura 22). Después, el marco de lectura abierto deducido fue traducido a la correspondiente secuencia de aminoácidos, y la secuencia pronosticada se muestra en la Figura 23. La elongasa codificada por el ADNc (pRPB2) identificado de *M. alpina* parece ser una proteína de 318 aminoácidos de longitud que tiene un tamaño casi idéntico al de la MAELO traducida. Este nuevo ADNc de elongasa se denominó "GLELO" y su proteína codificada se ha denominado "elongasa GLA".

El ADN plasmídico pRPB2 fue depositado en la Colección de Cultivos Tipo Americana, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 el 22 de Julio de 1999 bajo los términos de Tratado de Budapest. Se acordó el Núm. de Depósito ATCC PTA-402.

Ejemplo XI

Caracterización Bioquímica de la Elongasa GLA (GLELO)

A. Confirmación de la Actividad Elongasa GLA

Para confirmar adicionalmente la actividad de la elongasa GLA codificada por el plásmido recombinante pRPB2, se repitió el escrutinio de la actividad en el clon de levadura SC334 que contenía el plásmido pRPB2. Este experimento también se llevó a cabo para asegurar una extracción de lípidos compatible y para detectar la actividad de la elongasa GLA promediando cuatro experimentos independientes. La solución de partida en glicerol de *S. cerevisiae* 334 que contenía pRPB2 se cultivó en placa sobre medio de agar mínimo carente de uracilo. Las colonias individuales se escogieron al azar y se desarrollaron en medio mínimo carente de uracilo, como se describe en el Ejemplo VIII. Se combinaron los cuatro cultivos independientes, y se utilizó una alícuota de 5 ml como inóculo para cuatro cultivos de 50 ml separados. Después los cultivos se hicieron crecer en presencia de GLA y se sometieron a análisis de ácidos grasos junto con un control negativo de *S. cerevisiae* 334 que contenía pYES2, como se describe en el Ejemplo VIII. La actividad elongasa media de cuatro cultivos independientes de 334(pRPB2) con GLA 25 μ M se muestra en la Figura 24. La actividad elongasa de GLA de cada una de las cuatro muestras independientes de 334(pRPB2) parecía coincidir con una conversión media del 62% de GLA en DGLA.

B. Determinación de la Especificidad de Sustrato GLELO para Elongasa de GLA

Para analizar la especificidad de sustrato de la elongasa de GLA, se sometió a ensayo el cultivo de 334(pRPB2) con diferentes sustratos de ácidos grasos además de GLA (p. ej., SA(18:0), OA(18:1), LA(18:2n-6), AA(20:4n-6), ADA(22:4n-6), ALA(18:3n-3), STA(18:4n-3), y EPA(20:5n-3)). En condiciones de análisis idénticas, el único sustrato diferente utilizado por la enzima elongasa fue STA, un ácido graso de la ruta n-3. La elongasa GLA era capaz de convertir un 73% de STA en 20:4n-3 (Figura 25). A partir de estos experimentos, se puede concluir que la elongasa de GLA tiene especificidad de sustrato tanto para GLA como para STA, indicando que posee una actividad elongasa a lo largo de ambas rutas n-6 y n-3.

C. Co-expresión de GLELO Fúngica y Gen de Δ 5-Desaturasa en Levadura

Una vez que se ha producido DGLA (20:3n-6) por medio de la elongasa de GLA, la Δ 5-desaturasa puede convertirla en AA (20:4n-6) en un sistema de co-expresión deseado. Este esquema, representado en la Figura 1, puede ser sometido a ensayo co-transformando *S. cerevisiae* 334 con los plásmidos pRPB2 y pRPE31 (el plásmido recombinante pYX242 que contiene un ADNc de Δ 5-desaturasa (Figura 18) clonado en el sitio *Eco*RI. Los cultivos de levadura co-transformados recibieron un suplemento de GLA 25 μ M y se analizaron en cuanto a la síntesis de AA. Si ambas enzimas elongasa y Δ 5-desaturasa son expresadas, el GLA sustrato será convertido en DGLA, que después será convertido en AA. Los resultados de la Figura 26A indican que la acción sucesiva de la elongasa de GLA y la Δ 5-desaturasa sobre el sustrato GLA da como resultado una conversión media del 27% de GLA en AA. Por lo tanto, la elongasa de GLA tiene la capacidad de funcionar con otras enzimas en la ruta sintética de PUFA n-6 para producir los ácidos grasos deseables.

Para determinar si la conversión anterior también es cierta en las rutas n-3, se llevaron a cabo experimentos de co-expresión similares en presencia de STA 25 μ M. De nuevo, si se expresan ambas enzimas, el STA sustrato se convertirá en 20:4n-3 que después se convertirá en EPA (20:5n-3) por medio de la Δ 5-desaturasa. La Figura 26B muestra los resultados en los que se observa producción de EPA (aprox. 40%). Una vez más, la elongasa de GLA demuestra su capacidad para funcionar con Δ 5-desaturasa en la ruta n-3 para producir ácidos grasos deseables.

Ejemplo XII

Comparación de Secuencias Entre GLELO y Otras Elongasas Fúngicas

5 Se utilizó el paquete de análisis de secuencias de GCG (véase el Ejemplo I) para comparar la secuencia de GLELO con secuencias de proteínas conocidas. La secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto de GLELO se tradujo primero a la secuencia de aminoácidos que se utilizó como secuencia problema para la búsqueda en la base de datos Swissprot (véase el Ejemplo I) utilizando el algoritmo FastA (véase el Ejemplo I). Basándose en la similitud de la secuencia de aminoácidos, se encontraron los mejores emparejamientos con *S. cerevisiae* YJT6 (una EST con una anotación desconocida) con una identidad de 33,9% en el solapamiento de 189 aminoácidos, *S. cerevisiae* ELO2 (GNS1) con una identidad de 25,8% en el solapamiento de 295 aminoácidos, y *S. cerevisiae* ELO3 (SUR4) con una identidad de 25,2% en el solapamiento de 313 aminoácidos. El alineamiento FastA de GLELO con MAELO mostró una identidad de 30,9% en 275 aminoácidos (Figura 27). El programa Pileup de GCG crea un alineamiento de secuencias múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineamientos progresivos, por pares (véase el Ejemplo I), y se utilizó con las elongasas descritas antes. Los resultados del Pileup indican que hay muchas regiones conservadas entre las elongasas incluyendo una supuesta caja de histidina, que está subrayada (Knutzon *et al.*, J. Biol. Chem. 273: 29360-29366, 1998) (Figura 28). De este modo, aunque GLELO tiene similitud con MAELO, la diferencia en sus elongasas codificadas puede estar debida presumiblemente a su preferencia por el sustrato. La elongasa de GLA puede convertir un porcentaje mayor de GLA en DGLA que la elongasa de *M. alpina*. Además, la expresión de MAELO en *S. cerevisiae* mostraba una prolongación de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados además de la prolongación de GLA a DGLA (véase el Ejemplo III).

Ejemplo XIII

25 *Identificación de Homólogos de MAELO de M. alpina en Mamíferos*

30 Se utilizó la secuencia traducida de MAELO para investigar la Base de Datos de Transcritos Humanos Unificados “Unified Human Transcript Database” de Abbott Laboratories, 100 Abbott Park Rd., Abbott Park, Illinois 60064. Esta base de datos se investigó utilizando la Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (Altschul *et al.*, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1997)) que es “un grupo de programas de búsqueda por similitud diseñado para explorar todas las bases de datos de secuencias disponibles con respecto a si el problema es una proteína o un ADN”. Específicamente, se utilizó el algoritmo tblastn (esto es, la búsqueda de una proteína problema con respecto a una base de datos traducida a seis marcos de lectura). La secuencias de los cóntigos (CC) en la Base de Datos de Transcritos Humanos Unificados “Unified Human Transcript Database” son secuencias consenso que representan grupos de ADNc de etiquetas de secuencia expresada (EST) de dominio público y de la base de datos Incyte LIFESEQ[®] de EST (Incyte Pharmaceuticals, Inc., 3174 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304) que están agrupadas juntas basándose en la homología de la secuencia definida, y ensambladas basándose en el solapamiento de la secuencia. Dos secuencias de esta base de datos, CC067284R1 y CC1484548T1 tenían una identidad de 28% en un solapamiento de 242 aminoácidos y una identidad de 28,6% en un solapamiento de 266 aminoácidos, respectivamente, con la secuencia de MAELO traducida. Las dos secuencias derivadas y editadas fueron denominadas hs1 y hs2, respectivamente, y se copiaron en el paquete de soporte lógico para el análisis de secuencias de GCG (véase el Ejemplo I). La secuencia de MAELO traducida fue alineada con las secuencias de ADNc HS1 (identidad de 28,5% en 242 aminoácidos) y HS2 (identidad de 28,2% en 266 aminoácidos) utilizando el algoritmo FastA, como se muestra en las Figuras 29 y 30, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de ADNc HS1 también tenía una identidad de 86,9% en 844 pb con la secuencia de nucleótidos de I05465 (véase el Ejemplo V). La secuencia de ADNc de HS2 traducida tenía una identidad de 100% con la secuencia de aminoácidos de GenBank con el número de acceso W74824 (véase la solicitud PCT publicada WO9839448).

50 Se utilizó el Centro Nacional para la Información de Biotecnología “National Center for Biotechnology Information” (NCBI en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para llevar a cabo las búsquedas en las bases de datos utilizando tblastn con la secuencia de 28 aminoácidos (DTIFILRKQKLIFLHWHYHHITVLLYSW) traducida a partir de AC004050 (una secuencia humana identificada en una búsqueda TFASTA, véase el Ejemplo V). Esta secuencia de aminoácidos contiene una caja de histidina (subrayada), que tiene indicado un motivo de desaturasas (Knutzon *et al.*, *supra*), y ambas elongasas de PUFA, MAELO y GLELO (véase la Figura 28). Una secuencia de ratón traducida mostrada previamente en el Ejemplo V (Núm. de Acceso GenBank U97107) y una secuencia de *C. elegans* traducida (Núm. de Acceso GenBank U41011) tenían los máximos emparejamientos con estos 28 aminoácidos problema. La base de datos de EST de ratón de NCBI fue investigada de nuevo con tblastn, utilizando U41011 traducido como problema. Se identificó una secuencia de ratón adicional (Núm. de Acceso GenBank AF014033.1), indicado como “supuesta implicación en elongación de ácidos grasos”. Se identificaron tres secuencias más largas (Núms. de Acceso GenBank AA591034, AA189549, y AA839346) por medio de una búsqueda tblastn de la base de datos de EST de ratón con AF014033.1 traducido y se combinaron en una secuencia denominada mm2. El alineamiento FastA (véase el Ejemplo I) de mm2 traducido y MAELO se muestra en la Figura 31. Otra secuencia de ratón relacionada, pero no idéntica (Núm. de Acceso GenBank AI225632), también fue identificada en una búsqueda tblastn de la base de datos de EST de ratón con AF014033.1. El alineamiento FastA con AI225632 traducido con respecto a MAELO se muestra en la Figura 32. El porcentaje de identidad para MM2 y AI ambos traducidos con MAELO traducida es de 30,4% en solapamientos de 191 y 115 aminoácidos, respectivamente. El nivel de identidad de aminoácidos con MAELO traducida con estas dos secuencias de ratón traducidas las identifica como supuestos homólogos de las elongasas de PUFA.

Ejemplo XIV

Identificación de Homólogos de GLELO de M. alpina en Mamíferos

5 Se utilizó el algoritmo TFASTA, que compara una secuencia de proteínas con una secuencia de ADN de la base de datos traducida en cada uno de los seis marcos de lectura, con GLELO traducida como problema. La base de datos GenEMBL de GCG se utilizó para identificar otras secuencias de elongasa potenciales basándose en su similitud de aminoácidos con GLELO traducida. Se encontró que tres secuencias humanas tenían emparejamientos con la secuencia de aminoácidos de GLELO. Estas secuencias tienen números de acceso GenBank 1) AI815960, 2) AL034374, y
 10 3) AC004050. AI815960, una secuencia EST de *Homo sapiens*, tiene una identidad del 40,3% en un solapamiento de 144 aminoácidos con GLELO traducida (véase la Figura 33). Una región traducida de la secuencia genómica humana AL034374, derivada del cromosoma VI tiene una identidad del 46,7% en un solapamiento de 60 aminoácidos con GLELO traducida. Esta región homóloga en AL034374 parecía ser una parte de la secuencia de aminoácidos de HS1 que se demostró que tenía homología con MAELO traducida (véase el Ejemplo XIII). Por lo tanto, la secuencia de HS1 tiene similitud tanto con MAELO (véase la Figura 29) como con GLELO (véase la Figura 34). Una región traducida de una secuencia genómica humana AC004050 del cromosoma IV tiene una identidad del 34,8% en un solapamiento de 89 aminoácidos con GLELO traducida (véase la Figura 35). Las identidades de aminoácidos entre GLELO y estas secuencias humanas indican que las proteínas derivadas de estas secuencias humanas podrían tener una función relacionada, tal como una actividad elongasa de PUFA.

20 Para identificar un ADNc de ratón similar a GLELO, se realizaron búsquedas TFASTA con la base de datos GenEMBL utilizando GLELO traducida como problema. A partir de las búsquedas TFASTA, se identificaron tres secuencias de ratón con los máximos emparejamientos con GLELO traducida: (números de acceso GenBank 1) AF104033, 2) AI595258, y 3) U97107). AF104033 tiene la anotación “proteína MUEL que tiene una supuesta elongasa de ácidos grasos con homología con ELO3 de levadura (SUR4)” y es parte de la secuencia de MM2. La secuencia MM2 derivaba inicialmente de la secuencia de ratón AF104033, pero la secuencias de MM2 completa se obtuvo finalmente a través de búsquedas adicionales en la base de datos de EST de ratón y también se demostró que tenían homología con MAELO traducida (véanse el Ejemplo XIII y la Figura 31). Cuando esta secuencia de aminoácidos de MM2 se alineó con la secuencia de GLELO traducida utilizando FASTA, se encontró una identidad del 34,6% en un solapamiento de
 25 211 aminoácidos (véase la Figura 36) indicando que la MM2 también tiene homología con GLELO. AI595258 es un clon de ADNc de ratón que tiene similitud 5' con la elongasa ELO3 de levadura y es parte del ADNc de EST de ratón AI225632. Se encontró que la secuencia de ratón AI225632, que es una secuencia más larga que AI595258, tiene similitud con MAELO traducida (véase la Figura 32). El AI225632 también se alineó con GLELO traducida, y el alineamiento FASTA se muestra en la Figura 37. Se ha encontrado una identidad del 35,3% en un solapamiento de 199 aminoácidos. La tercera secuencia, U97107, una secuencia de ratón, tenía la anotación “similar al gen ELO3 de levadura (SUR4)”. El alineamiento FASTA de GLELO traducida con U97107 se muestra en la Figura 38 donde se encontró una identidad del 23,7% en un solapamiento de 279 aminoácidos. Previamente, también se encontró que una región de U97107 tenía un alto grado de homología con MAELO basándose en un alineamiento FASTA (véanse el Ejemplo V y la Figura 16).

40 Las búsquedas anteriores indican claramente que se obtenían las mismas secuencias humanas y de ratón utilizando MAELO o GLELO como problema.

Ejemplo XV

*Identificación de Homólogos de GLELO y MAELO de M. alpina en Otros Organismos Productores de PUFA*A) *Caenorhabditis elegans*

50 Una supuesta secuencia de aminoácidos deducida de una secuencia cromosómica de *C. elegans* (Núm. de Acceso GenBank U41011) fue capaz de identificar una secuencia parcial contenida en la supuesta elongasa de PUFA MM2 de ratón que tiene similitud de aminoácidos con la elongasa de GLA (GLELO) y la elongasa de *M. alpina* (MAELO). Por lo tanto era concebible que los homólogos de GLELO Y MAELO de *C. elegans* pudieran estar presentes en la base de datos de nematodos. Se utilizaron supuestas secuencias de aminoácidos derivadas de las secuencias de GLELO y MAELO como problemas independientemente para la búsqueda en las bases de datos de nematodos. Se realizó una búsqueda BLAST (véase el Ejemplo XIII) sobre bases de datos de wormpep16 (blastp compara una secuencia de aminoácidos problema con una base de datos de secuencias de nucleótidos) y wormpep16cDNAs (tblastn) que son las proteínas pronosticadas y los ADNc obtenidos a partir del proyecto de secuenciación del genoma de *C. elegans* o las EST y sus correspondientes secuencias de ADNc, respectivamente. Estos datos de la secuencia fueron producidos por el grupo de Secuenciación de *C. elegans*, llevado a cabo conjuntamente por el Sanger Centre y el Genome Sequencing Center, y se pueden obtener a partir de ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/databases/wormpep/. Al menos siete supuestas secuencias traducidas de *C. elegans* fueron identificadas por su homología en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos traducida de GLELO y MAELO. El Núm. de Acceso de GenBank de aquellas secuencias genómicas que contenían los aminoácidos deducidos fueron identificadas como Z19154, U68749 (2 proteínas deducidas (F56H11.4 y F56H11.3 (Núm. de acceso de wormpep)), U41011, U61954 (2 proteínas deducidas (F41H10.7 y F41H10.8 (Núm. de acceso de wormpep))), y Z81058. Aquellas subrayadas fueron identificadas en una búsqueda previa utilizando MAELO traducida como problema (véase el Ejemplo V). Como ejemplo, los alineamientos de ami-

noácidos FastA de U68749 traducida (F56H11.4) con GLELO y MAELO traducidas se muestran en las Figuras 39 y 40. U68749 traducida (F56H11.4) tiene una identidad de 25-30% con la elongasa de *M. alpina* y con la elongasa de GLA en un solapamiento de aproximadamente 200 aminoácidos (véanse las Figuras 39 y 40). Para los siete su-
 5 puestos ADNc de *C. elegans* traducidos, los alineamientos FastA con GLELO traducida estaban entre una identidad del 25-30% en un solapamiento de 200 aminoácidos, mientras la identidad era del 26-34% en un solapamiento de al menos 188 aminoácidos para la MAELO traducida. Las similitudes de los alineamientos indican que se puede utilizar cualquiera de GLELO o MAELO traducidas para identificar genes potenciales de *C. elegans* con actividad elongasa.

B) *Drosophila melanogaster*

10 El ADNc deducido traducido a partir de la secuencia genómica U41011 (*C. elegans*) tuvo su máximo emparejamiento con una EST de *Drosophila melanogaster*, número de acceso AI134173 en una búsqueda blastn (se compara una secuencia de nucleótidos problema con una base de datos de nucleótidos) de la base de datos de "otras EST" por medio de NCBI (véase el Ejemplo XIII) y se ensambló con un fragmento de EST de ADN solapante, número de acceso
 15 AI517255. El fragmento de ADN traducido DM1, derivado de las dos secuencias solapantes se alineó con GLELO traducida así como con MAELO (véanse las Figuras 41 y 42) utilizando FastA en GCG (véase el Ejemplo I). Los alineamientos mostraron una identidad del 27,2% con la elongasa de GLA en un solapamiento de 206 aminoácidos y una identidad del 30% con elongasa de *M. alpina* en un solapamiento de 237 aminoácidos. De este modo, basándose en la similitud de aminoácidos, DM1 podía ser un homólogo potencial de GLELO o MAELO con una actividad de
 20 tipo elongasa de PUFA. Por otra parte, utilizando las secuencias de ADN de GLELO y MAELO como problemas para las búsquedas en las bases de datos, se pueden identificar homólogos con actividad elongasa de PUFA a partir de *Drosophila*.

25 Ejemplo XVI

Clonación y Expresión de un Homólogo de Elongasa de PUFA Humana

30 Se identificaron muchas secuencias de elongasa de PUFA potenciales basándose en sus similitudes de aminoácidos con GLELO y/o MAELO traducidas. Para determinar las actividades elongasa potenciales de estas secuencias, el ADNc que codifica la proteína completa se identifica, se clona, y se expresa después, como se demuestra en el presente ejemplo.

35 Se diseñaron los cebadores RO719 (5' -GGT TCT CCC ATG GAA CAT TTT GAT GCA TC-3') y RO720 (5' -GGT TTC AAA GCT TTG ACT TCA ATC CTT CCG- 3') basándose en la supuesta secuencia de HS1, y se utilizaron para amplificar el ADNc de hígado humano Marathon-Ready (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, California). Se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen de 50 μ l que contenía: 5 μ l de ADNc de hígado humano Marathon-Ready, 50 pmoles de cada cebador, 1 μ l de Mezcla de Nucleótidos para PCR 10 mM (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN), 5 μ l de 10 X tampón y 1,0 U de Advantage KlenTaq Polymerase Mix
 40 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA). Las condiciones del termociclador Perkin Elmer 9600 (Norwalk, CT) fueron las siguientes: 94°C durante 2 mins., después 30 ciclos de 94°C durante 1 min., 58°C durante 2 mins., y 72°C durante 3 mins. La PCR estuvo seguida de un ciclo de prolongación adicional a 72°C durante 7 minutos.

45 El producto amplificado mediante PCR se hizo correr sobre un gel, se purificó en gel un fragmento amplificado de aproximadamente 960 pb, los extremos del fragmento se rellenaron con ADN polimerasa de T4 (Boehringer Mannheim, Corp., Indianapolis, IN), y se clonaron en el Vector pCR-Blunt (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. El nuevo plásmido se denominó pRAE-52, y el supuesto ADNc de elongasa de PUFA de este clon se secuenció utilizando ABI 373A Stretch DNA Sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA). La supuesta secuencia de ADNc de elongasa de PUFA del plásmido pRAE-52 se muestra en la Figura 43, y la secuencia traducida
 50 se muestra en la Figura 44.

El supuesto ADNc de elongasa de PUFA del plásmido pRAE-52 fue digerido después con *NcoI/HindIII*, purificado en gel, y ligado en pYX242(*NcoI/HindIII*). El nuevo plásmido fue denominado pRAE-58-A1. (El plásmido 58-A1 fue depositado en la Colección de Cultivos Tipo Americana, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 el
 55 19 de Agosto de 1999, bajo los términos del Tratado de Budapest y se acordó el número de depósito ____).

El constructo pRAE-58-A1 fue transformado en *S. cerevisiae* 334 (Hoveland *et al.*, *supra*) y escrutado en cuanto a la actividad elongasa. La cepa de control negativo fue *S. cerevisiae* 334 que contenía el vector pYX242. Los cultivos se hicieron crecer durante 24 horas a 30°C, en medio selectivo (Ausubel *et al.*, *supra*), en presencia de 25 μ M de GLA o
 60 AA. En este estudio, el DGLA o el ácido adrenico (ADA, 22:4n-6), respectivamente, fueron el producto pronosticado de la actividad de la elongasa humana. Cuando se utilizó GLA como sustrato, las células de levadura que contenían el ADNc de elongasa humana contuvieron niveles elevados de DGLA en comparación con las células de control, 2,75% frente a 0,09% de ácidos grasos totales, respectivamente (véase la Figura 45). Cuando se utilizaba AA como sustrato, las células de levadura que contenían ADNc de elongasa humana contenían niveles elevados de ADA en
 65 comparación con las células de control, ninguno detectado frente a 1,21% de ácidos grasos totales, respectivamente. De este modo, la elongasa humana convierte los PUFA de 18 y 20 carbonos de longitud en sus respectivos ácidos grasos prolongados.

ES 2 306 523 T3

Las células de levadura que contienen el ADNc de elongasa humana tenían niveles elevados de ácidos grasos monoinsaturados incluyendo 18:1n-7, 20:1n-7, 20:1n-9, y 18:1n-5, en comparación con la cepa de control. Por lo tanto, estos resultados indican que la elongasa humana identificada es capaz de utilizar PUFA así como ácidos grasos monoinsaturados como sustratos. De este modo, esta secuencia humana HSELO1, y su proteína codificada, posee actividad elongasa independiente de la especificidad de sustrato.

Ejemplo XVII

Clonación y Expresión de una Elongasa de PUFA de *C. elegans*

Se identificaron diversas supuestas elongasas de *C. elegans* con homología de aminoácidos con GLELO y MAELO traducidas. Como con la secuencia de ADNc humana, se utilizó la clonación de un ADNc y la expresión en levadura para determinar si en efecto era una elongasa de PUFA. Los cebadores RO738 (5' -AAT CAG GAA TTC ATG GCT CAG CAT CCG CTC GTT CAA C -3') y RO739 (5' -CCG CTT GTC GAC TTA GTT GTT CTT CTT TGG CAC -3') con sitios de restricción *EcoRI* y *SalI* (subrayados), respectivamente, estuvieron basados en la supuesta secuencia de ADNc contenida en la secuencia genómica U68749 (Núm. de acceso de ADNc wormpep F56H11.4.) Se realizó una amplificación mediante PCR en un volumen de 100 μ l que contenía: 250 ng de ADNc de la genoteca de *C. elegans* escindida (OriGene Technologies Inc., Rockville, MD), 50 pmoles de cada cebador, 10 μ l de tampón de reacción 10X (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN), 1 μ l de Mezcla de Nucleótidos para PCR 10 mM (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN), y 2,5 U de polimerasa Taq (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN). Las condiciones del termociclador Perkin Elmer 9600 (Norwalk, CT) fueron las siguientes: 95°C durante 5 mins., después 25 ciclos de 94°C durante 30 segs., 55°C durante 2 mins., y 72°C durante 2 mins. La PCR estuvo seguida de un ciclo adicional de 72°C durante 7 minutos.

El producto amplificado mediante PCR se purificó en gel de agarosa, se cortó con *EcoRI* y *SalI*, se ligó a pYX242 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) (se linealizó con *EcoRI* y *SalI*) utilizando el kit de Ligación Rápido (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN), de acuerdo con el protocolo del fabricante y se transformó en células de *E. coli* Top10 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Los nuevos plásmidos, denominados pRET-21 y pRET-22 (dos clones individuales de la ligación), fueron secuenciados con el ABI 373 Stretch Sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA), y las secuencias de ADN fueron idénticas. La secuencia de nucleótidos del ADNc de 867 del plásmido pRET-22 que contiene la supuesta elongasa se muestra en la Figura 46 y la secuencia traducida de 288 aminoácidos se muestra en la Figura 47. (El plásmido pRET-22 fue depositado en la Colección de Cultivos Tipo Americana, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 el 19 de Agosto, de 1999, bajo los términos del Tratado de Budapest y se acordó el número de depósito ____).

Los plásmidos pRET-21 y -22 fueron transformados en *S. cerevisiae* 334 como se ha descrito previamente (véase el Ejemplo III) y los cultivos de levadura resultantes (334(pRET-21) y 334(pRET-22)) se hicieron crecer en 100 ml de medio selectivo sin leucina (Ausubel *et al*, *supra*) durante 48 horas a 20°C en presencia de GLA y AA 50 μ M. Los sedimentos celulares se recogieron y se sometieron a análisis de los ácidos grasos y los resultados se muestran en la Figura 48. Se encontró que DGLA, el producto pronosticado de la elongación de GLA, constituía una media de 1,79% de los lípidos totales en las dos muestras, frente a un 0,13% para el control negativo (334 que contenía el plásmido pYX242) indicando que la enzima codificada por pRET-21 y pRET-22 poseía la actividad elongasa. El porcentaje de conversión de GLA en DGLA por 334(pRET-21) y 334(pRET-22) era del 11,1% y 19,4% respectivamente con una media de 15,25%. Interesantemente, casi no se observaba elongación de AA o cualquier ácido graso endógeno (Fig. 48). Estos resultados indican que la elongasa codificada por este ADNc de *C. elegans*, recién identificado CELO1, es capaz de prolongar específicamente GLA a DGLA, sugiriendo que puede ser un homólogo de elongasa de GLA de *C. elegans*.

Ejemplo XVIII

Aislamiento de un Supuesto ADNc de Elongasa Humana Basado en la Secuencia AC004050

Para aislar el supuesto ADNc de elongasa completo basado en la secuencia AC004050, se utilizaron los cebadores RP735 (5' -CCT CCT GAA TTC CAQA CAC TAT TCA GCT TTC -3') y R073 (5' -TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3') para amplificar mediante PCR ADNc de hígado humano Marathon-Ready (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA). La PCR se llevó a cabo utilizando el Advantage[®] cDNA PCR Kit (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) con 5 μ l de ADNc de hígado humano Marathon-Ready y 50 pmoles de cada uno de los cebadores siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones del termociclador Perkin Elmer 9600 (Norwalk, CT) fueron las siguientes: 94°C durante 2 mins., después 30 ciclos de 94°C durante 1 min., 58°C durante 2 mins., y 72°C durante 3 mins. La PCR estuvo seguida de una prolongación adicional a 72°C durante 7 mins.

El producto amplificado mediante PCR se hizo correr sobre un gel, se purificó en gel un fragmento amplificado de aproximadamente 1 Kb, los extremos del fragmento se rellenaron con ADN polimerasa de T4 (Boehringer Mannheim, Corp., Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El nuevo plásmido se denominó pRAE-59, y el supuesto ADNc de elongasa de PUFA en este plásmido, denominado HS3, se secuenció utilizando el ABI 373A Stretch Sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA). La secuencia del supuesto ADNc de elongasa de PUFA HS3 se muestra en la Figura 49, y la secuencia traducida se muestra en la Figura 50.

ES 2 306 523 T3

Composiciones Nutricionales

Los PUFA descritos en la Descripción Detallada se pueden utilizar en diversos suplementos nutricionales, formulaciones para lactantes, sustitutos nutricionales y otras soluciones nutricionales.

5

I. Formulaciones para lactantes

A. *Isomil*[®] Fórmula de Soja con Hierro

10

Uso: Como bebida para lactantes, niños y adultos con alergia o sensibilidad a la leche de vaca. Un alimento para pacientes con trastornos en los cuales debe ser evitada la lactosa: deficiencia de lactasa, intolerancia de lactosa y galactosamina.

15

Características

- Producto aislado de proteína de soja para evitar síntomas de alergia o sensibilidad a las proteínas de la leche de vaca.
- Formulación libre de lactosa para evitar la diarrea asociada con la lactosa.
- Baja osmolalidad (240 mOs/kg agua) para reducir el riesgo de diarrea osmótica.
- Carbohidratos duales (jarabe de maíz y sacarosa) diseñados para potenciar la absorción de carbohidratos y reducir el riesgo de exceder la capacidad absorptiva del intestino dañado.
- 1,8 mg de Hierro (en forma de sulfato ferroso) por 100 Calorías para ayudar a evitar la deficiencia de hierro.
- Niveles recomendados de vitaminas y minerales.
- Aceites vegetales para proporcionar niveles de ácidos grasos esenciales.
- Color blanco leche, consistencia de tipo leche y aroma agradable.

30

35

Ingredientes: (Pareve) 85% de agua, 4,9% de jarabe de maíz, 2,6% de azúcar (sacarosa), 2,1% de aceite de soja, 1,9% de producto aislado de proteína de soja, 1,4% de aceite de coco, 0,15% de citrato de calcio, 0,11% de fosfato de calcio tribásico, citrato de potasio, fosfato de potasio monobásico, cloruro de potasio, mono- y diglicéridos, lecitina de soja, carragenano, 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, hidrocloreuro de cloruro de tiamina, riboflavina, hidrocloreuro de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

40

45

B. *Isomil*[®] DF Fórmula de Soja para Diarrea

Uso: Como alimento a corto plazo para el tratamiento dietético de la diarrea en lactantes y niños en edad de caminar.

50

Características

- Primera fórmula para lactantes que contiene fibra dietética añadida de fibra de soja específicamente para el tratamiento de la diarrea.
- Demostrado clínicamente que reduce la duración de las heces acuosas, sueltas durante la diarrea suave a grave en los lactantes.
- Nutricionalmente completa para satisfacer las necesidades nutricionales del lactante.
- Producto aislado de proteína de soja con L-metionina añadida satisface o supera el requerimiento de los lactantes para todos los aminoácidos esenciales.
- Formulación libre de lactosa para evitar la diarrea asociada a la lactosa.
- Baja osmolalidad (240 mOsm/kg agua) para reducir el riesgo de diarrea osmótica.
- Carbohidratos duales (jarabe de maíz y sacarosa) diseñados para potenciar la absorción de carbohidratos y reducir el riesgo de superar la capacidad absorptiva del intestino dañado.

65

ES 2 306 523 T3

- Satisface o supera los niveles de vitaminas y minerales recomendados por el Comité de Nutrición de la Academia Americana de Pediatría y requeridos por el Acta sobre las Fórmulas para Lactantes.
- 1,8 mg de hierro (en forma de sulfato ferroso) por 100 Calorías para ayudar a prevenir la deficiencia de hierro.
- Aceites vegetales para proporcionar los niveles recomendados de ácidos grasos esenciales.

Ingredientes: (Pareve) 86% de agua, 4,8% de jarabe de maíz, 2,5% de azúcar (sacarosa), 2,1% de aceite de soja, 2,0% de producto aislado de proteína de soja, 1,4% de aceite de coco, 0,77% de fibra de soja, 0,12% de citrato de calcio, 0,11% de fosfato de calcio tribásico, 0,10% de citrato de potasio, cloruro de potasio, fosfato de potasio monobásico, mono y diglicéridos, lecitina de soja, carragenano, 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, hidrocloreuro de cloruro de tiamina, riboflavina, hidrocloreuro de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

C. *Isomil*® SF Fórmula de Soja Libre de Sacarosa con Hierro

Uso: En forma de una bebida para lactantes, niños y adultos con alergia o sensibilidad de la proteína de leche de vaca o intolerancia a la sacarosa. Un alimento para pacientes con trastornos en los cuales deben ser evitadas la lactosa y la sacarosa.

Características

- Producto aislado de proteína de soja para evitar los síntomas de alergia o sensibilidad a la proteína de leche de vaca.
- Formulación libre de lactosa para evitar la diarrea asociada con la lactosa (la fuente de carbohidratos son Polímeros de Glucosa Polycose®).
- Libre de sacarosa para pacientes que pudieran no tolerar la sacarosa.
- Baja osmolalidad (180 mOsm/kg agua) para reducir el riesgo de diarrea osmótica.
- 1,8 mg de hierro (en forma de sulfato ferroso) por 100 Calorías para ayudar a prevenir la deficiencia de hierro.
- Niveles recomendados de vitaminas y minerales.
- Aceites vegetales para proporcionar los niveles recomendados de ácidos grasos esenciales.
- Del color de la leche, con la consistencia de la leche y aroma agradable.

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

D. *Isomil*® 20 Fórmula de Soja con Hierro Lista para Tomar, 20 Cal/28,4 ml

Uso: Cuando se desea un alimento de soja.

Ingredientes: (Pareve) 85% de agua, 4,9% de jarabe de maíz, 2,6% de azúcar (sacarosa), 2,1% de aceite de soja, 1,9% de producto aislado de proteína de soja, 1,4% de aceite de coco, 0,15% de citrato de calcio, 0,11% de fosfato de calcio tribásico, citrato de potasio, fosfato de potasio monobásico, cloruro de potasio, mono- y diglicéridos, lecitina de soja, carragenano, 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, hidrocloreuro de cloruro de tiamina, riboflavina, hidrocloreuro de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

ES 2 306 523 T3

E. *Similac® Fórmula para Lactantes*

Uso: Cuando se necesita una fórmula para lactantes: si la decisión se toma para interrumpir la lactancia materna antes de la edad de 1 año, si se necesita un suplemento a la lactancia materna o como una alimentación de rutina si no se adopta la lactancia materna.

Características

- Proteína de calidad y cantidad apropiada para un buen crecimiento; desnaturalizada por calor, que reduce el riesgo de pérdida de sangre entérica asociada con la leche.
- Grasa de una combinación de aceites vegetales (doblemente homogeneizada), que proporciona ácido linoleico esencial que es fácilmente absorbido.
- Carbohidrato en forma de lactosa en una proporción similar a la de la leche humana.
- Baja carga de soluto renal para minimizar el estrés sobre los órganos en desarrollo.
- Formas en Polvo, Líquido Concentrado y Listo para Tomar.

Ingredientes: (-D) Agua, leche no grasa, lactosa, aceite de soja, aceite de coco, mono- y diglicéridos, lecitina de soja, ácido ascórbico, carragenano, 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, hidrocloreto de cloruro de tiamina, riboflavina, hidrocloreto de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

F. *Similac® NeoCare Fórmula para Lactantes Prematuros con Hierro*

Uso: Para necesidades nutricionales especiales de lactantes prematuros tras la salida del hospital. desarrollada para proporcionar calorías extra, proteínas, vitaminas y minerales a los lactantes prematuros, que necesitan crecimiento compensatorio y ayuda en su desarrollo.

Características

- Reduce la necesidad de suplemento calórico y de vitaminas. Más calorías (22 Cal/28,4 ml) que las fórmulas de término normalizadas (20 Cal/28,4 ml).
- Combinación de grasa altamente absorbida, con triglicéridos de cadena media (aceite MCT) para ayudar a satisfacer las necesidades digestivas especiales de los lactantes prematuros.
- Niveles superiores de proteínas, vitaminas y minerales por 100 calorías para prolongar el apoyo nutricional iniciado en el hospital.
- Más calcio y fósforo para una mejora de la mineralización ósea.

Ingredientes: -D Sólidos de jarabe de maíz, leche no grasa, lactosa, producto concentrado de proteína de suero, aceite de soja, aceite de cártamo con un alto contenido de ácido 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, hidrocloreto de cloruro de tiamina, palmitato de vitamina A, beta caroteno, riboflavina, hidrocloreto de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

G. *Similac Natural Care Reforzante de Leche Humana con bajo Contenido de Hierro Listo para su Uso, 24 Cal/28,4 ml*

Uso: Diseñado para ser mezclado con leche humana o para alimentar alternativamente a la leche humana a lactantes con bajo peso al nacer.

Ingredientes: -D Agua, leche no grasa, almidón de maíz hidrolizado, lactosa, aceite de coco fraccionado (triglicéridos de cadena media), producto concentrado de proteína de 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, mono y diglicéridos, lecitina de soja, carragenano, 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,

ES 2 306 523 T3

palmitato de vitamina A, hidrocloreuro de cloruro de tiamina, hidrocloreuro de piridoxina, biotina, ácido fólico, sulfato de manganeso, filoquinona, vitamina D3, selenito de sodio y cianocobalamina.

5 Diversos PUFA de esta invención pueden ser sustituidos y/o añadidos a las fórmulas para lactantes descritas antes y a otras fórmulas conocidas por los expertos en la técnica.

II. Formulaciones nutricionales

10 A. ENSURE®

Uso: ENSURE es un alimento líquido con pocos residuos diseñado principalmente como suplemento nutricional oral que se va a utilizar con o entre las comidas o, en cantidades apropiadas, como sustituto de las comidas. ENSURE carece de lactosa y gluten, y es adecuado para su uso en dietas modificadas, incluyendo las dietas bajas en colesterol. 15 Aunque es principalmente un suplemento oral, puede ser introducido mediante intubación.

Condiciones del Paciente

- 20 • Para pacientes con dietas modificadas.
- Para pacientes ancianos con riesgo nutritivo.
- Para pacientes con pérdida de peso involuntaria.
- 25 • Para pacientes que se recuperan de una enfermedad o intervención quirúrgica.
- Para pacientes que necesitan una dieta con bajo contenido de residuos.

30 Ingredientes: -D Agua, Azúcar (Sacarosa), Maltodextrina (Maíz), Caseinatos de Calcio y Sodio, Aceite de Cártamo con Alto contenido en ácido Oleico, Producto Aislado de Proteína de Soja, Aceite de Soja, Aceite de Canola, Citrato de Potasio, Fosfato de Calcio Tribásico, Citrato de Sodio, Cloruro de Magnesio, Fosfato de Magnesio Dibásico, Aroma Artificial, Cloruro de Sodio, Lecitina de Soja, Cloruro de Colina, Ácido Ascórbico, Carragenano, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Goma Gelan, Niacinamida, Pantotenato de Calcio, Sulfato de Manganeso, Sulfato Cúprico, Palmitato de Vitamina A, Hidrocloreuro de Cloruro de Tiamina, Hidrocloreuro de Piridoxina, 35 Riboflavina, Ácido Fólico, Molibdato de Sodio, Cloruro de Cromo, Biotina, Yoduro de Potasio, Selenato de Sodio.

B. ENSURE® BARS

40 Uso: ENSURE BARS constituye una nutrición completa, equilibrada para su uso como suplemento entre o con las comidas. Proporciona una alternativa deliciosa a otros aperitivos, rica en nutrientes. ENSURE BARS contiene <1 g de lactosa/barra, y el aroma para “brownies” con dulce de leche y chocolate (“Chocolate Fudge Brownie”) carece de gluten. (El aroma Honey Graham Crunch contiene gluten).

45 *Condiciones del Paciente*

- Para pacientes que necesitan calorías, proteína, vitaminas y minerales extra.
- Especialmente útiles para gente que no ingiere suficientes calorías y nutrientes.
- 50 • Para gente que tiene la capacidad de masticar y tragar.
- No debe ser utilizado por nadie con alergia al cacahuete y cualquier tipo de alergia a las nueces.

55 Ingredientes: Honey Graham Crunch -- Jarabe de Maíz con Alto Contenido de Fructosa, Producto Aislado de Soja, Azúcar Moreno, Miel, Maltodextrina (Maíz), Arroz Quebradizo (Arroz Molido, Azúcar [Sacarosa], Sal [Cloruro de Sodio] y Malta), Salvado de Avena, Aceites de semilla de Algodón y Soja parcialmente Hidrogenados, Polisacárido de Soja, Glicerina, Producto concentrado de Proteína de Suero, Polidextrosa, Fructosa, Caseinato de Calcio, Polvo de Cacao, Aromas Artificiales, Aceite de Canola, Aceite de Cártamo con Alto Contenido de ácido Oleico, Leche en Polvo 60 no Grasa, Polvo de Suero, Lecitina de Soja y Aceite de Maíz. Fabricado en instalaciones de tratamiento de nueces.

Vitaminas y Minerales: Fosfato de Calcio Tribásico, Fosfato de Potasio Dibásico, Oxido de Magnesio, Sal (Cloruro de Sodio), Cloruro de Potasio, Ácido Ascórbico, Ortofosfato Férrico, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Niacinamida, Oxido de Cinc, Pantotenato de Calcio, Gluconato de Cobre, Sulfato de Manganeso, Riboflavina, Beta Caroteno, Hidrocloreuro 65 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 2 306 523 T3

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

| | | |
|----|--------------------------------------|-----|
| 5 | Producto aislado de proteína de soja | 74% |
| 10 | Proteínas de la leche | 26% |

Grasa: Honey Graham Crunch - La fuente de grasa es una combinación de aceites de semilla de algodón y soja, canola, cártamo con alto contenido de ácido oleico, aceites y lecitina de soja.

15 Aceite de semilla de algodón y de soja parcialmente hidrogenados 76%

| | | |
|----|--|----|
| 20 | Aceite de Canola | 8% |
| | Aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico | 8% |
| 25 | Aceite de Maíz | 4% |
| | Lecitina de Soja | 4% |

30 Carbohidrato: Honey Graham Crunch - La fuente de carbohidrato es una combinación de jarabe de maíz con alto contenido de fructosa, azúcar moreno, maltodextrina, miel, arroz crujiente, glicerina, polisacárido de soja, y salvado de avena.

| | | |
|----|---|-----|
| 35 | Jarabe de maíz con alto contenido de fructosa | 24% |
| 40 | Azúcar Moreno | 21% |
| | Maltodextrina | 12% |
| 45 | Miel | 11% |
| | Arroz Crujiente | 9% |
| 50 | Glicerina | 9% |
| | Polisacárido de Soja | 7% |
| 55 | Salvado de Avena | 7% |

60 C. ENSURE® HIGH PROTEIN

65 Uso: ENSURE HIGH PROTEIN es un alimento líquido con elevado contenido de proteína, concentrado para gente que requiere calorías, proteínas, vitaminas, y minerales adicionales en sus dietas. Se puede utilizar como suplemento nutricional oral con o entre comidas o, en cantidades apropiadas, como sustituto de las comidas. ENSURE HIGH PROTEIN carece de lactosa y gluten, y es adecuado para su uso por gente que se está recuperando de cirugía general o fracturas de cadera y por pacientes con riesgo de úlceras por presión.

ES 2 306 523 T3

Condiciones del Paciente

- Para pacientes que requieren calorías, proteínas, vitaminas, y minerales adicionales, tales como pacientes que se están recuperando de cirugía general o fracturas de cadera, pacientes con riesgo de úlceras por presión, y pacientes con dietas con bajo contenido de colesterol.

Características

- Bajo contenido de grasa saturada.
- Contiene 6 g de grasa total y < 5 mg de colesterol por porción.
- Gusto cremoso, rico.
- Excelente fuente de proteínas, calcio, y otras vitaminas y minerales esenciales.
- Para dietas con un bajo contenido de colesterol.
- Sin Lactosa, fácilmente digerible.

Ingredientes

Vainilla Suprema: -D Agua, Azúcar (Sacarosa), Maltodextrina (Maíz), Caseinatos de Calcio y Sodio, Aceite de Cártamo con al contenido de Ácido Oleico, Producto Aislado de Proteína de Soja, Aceite de Soja, Aceite de Canola, Citrato de Potasio, Fosfato de Calcio Tribásico, Citrato de Sodio, Cloruro de Magnesio, Fosfato de Magnesio Dibásico, Aroma Artificial, Cloruro de Sodio, Lecitina de Soja, Cloruro de Colina, Ácido Ascórbico, Carragenano, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Goma Gelan, Niacinamida, Pantotenato de Calcio, Sulfato de Manganeso, Sulfato Cúprico, Palmitato de Vitamina A, Hidrocloruro de Cloruro de Tiamina, Hidrocloruro de Piridoxina, Riboflavina, Ácido Fólico, Molibdato de Sodio, Cloruro de Cromo, Biotina, Yoduro de Potasio, Selenato de Sodio, Filoquinona, Vitamina D3 y Cianocobalamina.

Proteína

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

| | |
|--------------------------------------|-----|
| Caseinatos de Sodio y calcio | 85% |
| Producto aislado de Proteína de Soja | 15% |

Grasa

La fuente de grasa es una combinación de tres aceites: aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico, canola y soja.

| | |
|--|-----|
| Aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico | 40% |
| Aceite de Canola | 30% |
| Aceite de Soja | 30% |

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

ES 2 306 523 T3

Carbohidratos

ENSURE HIGH PROTEIN contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El suave dulzor y la variedad de sabores (vainilla suprema, chocolate royal, bayas silvestres, y banana), más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pecan, cereza, fresa, limón, y naranja, ayudan a evitar el cansancio del sabor y contribuyen a la conformidad del paciente.

Vainilla y otros sabores distintos de chocolate

10

| | |
|---------------|-----|
| Sacarosa | 60% |
| Maltodextrina | 40% |

15

Chocolate

20

| | |
|---------------|-----|
| Sacarosa | 70% |
| Maltodextrina | 30% |

25

D. ENSURE® LIGHT

30

Uso: ENSURE LIGHT es un alimento líquido con bajo contenido de grasa para su uso como suplemento nutricional oral con o entre comidas. ENSURE LIGHT carece de lactosa y gluten, y es adecuado para su uso en dietas modificadas, incluyendo dietas con bajo contenido de colesterol.

35

Condiciones del Paciente

- Para pacientes con un peso normal o con sobrepeso que necesitan una nutrición extra en un suplemento que contiene 50% menos de grasa y 20% menos calorías que ENSURE.
- Para adultos sanos que no comen bien y necesitan una nutrición extra.

40

Características

45

- Bajo contenido de grasa y grasa saturada.
- Contiene 3 g de grasa total por ración y < 5 mg de colesterol.
- Sabor cremoso, rico.
- Excelente fuente de calcio y otras vitaminas y minerales esenciales.
- Para dietas con un bajo contenido de colesterol.
- Sin lactosa, fácilmente digerido.

50

55

Ingredientes

60

Vainilla Francesa: -D Agua, Maltodextrina (Maíz), Azúcar (Sacarosa), Caseinato de Calcio, Aceite de Cártamo con Alto Contenido de ácido Oleico, Aceite de Canola, Cloruro de Magnesio, Citrato de Sodio, Citrato de Potasio, Fosfato de Potasio Dibásico, Fosfato de Magnesio Dibásico, Natural y Aroma Artificial, Fosfato de Calcio Tribásico, Gel de Celulosa, Cloruro de Colina, Lecitina de Soja, Carragenano, 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, Hidrocloruro de Cloruro de Tiamina, Palmitato de Vitamina A, Hidrocloruro de Piridoxina, Riboflavina, Cloruro de Cromo, Ácido Fólico, Molibdato de Sodio, Biotina, Yoduro de Potasio, Selenato de Sodio, Filoquinona, Vitamina D3 y Cianocobalamina.

65

ES 2 306 523 T3

Proteína

La fuente de proteína es caseinato de calcio.

5

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

10

Grasa

La fuente de grasa es una combinación de dos aceites: cártamo con alto contenido de ácido oleico y canola.

15

| | |
|--|-----|
| Aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico | 70% |
| Aceite de canola | 30% |

20

25

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

30

Carbohidratos

ENSURE LIGHT contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El sabor a chocolate contiene también jarabe de maíz. El suave dulzor y la variedad de sabores (Vainilla Francesa, chocolate supremo, veteado de fresa), más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pecán, cereza, fresa, limón, y naranja, ayudan a evitar el cansancio del sabor y contribuyen a la conformidad del paciente.

35

Vainilla y otros aromas distintos de chocolate

40

| | |
|---------------|-----|
| Sacarosa | 51% |
| Maltodextrina | 49% |

45

50

Chocolate

| | |
|----------------|-------|
| Sacarosa | 47.0% |
| Jarabe de Maíz | 26,5% |
| Maltodextrina | 26,5% |

55

60

Vitaminas y Minerales

Una porción de 2,3 dL de ENSURE LIGHT proporciona al menos un 25% de RDI (Ingesta Diaria de Referencia) para 24 vitaminas y minerales clave.

65

ES 2 306 523 T3

Cafeína

El sabor a chocolate contiene 2,1 mg de cafeína/2,3 dL.

5

E. ENSURE PLUS®

10 **Uso:** ENSURE PLUS es un alimento líquido con pocos residuos, alto contenido de calorías para su uso cuando se necesitan calorías y nutrientes extra, pero una concentración normal de proteína. Está diseñado principalmente como suplemento nutricional oral para ser utilizado con o entre comidas o, en cantidades apropiadas, como sustituto de una comida. ENSURE PLUS carece de lactosa y gluten. Aunque es principalmente un suplemento nutricional oral, puede ser introducido mediante intubación.

Condiciones del Paciente

15

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

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

20

Características

- Sabor cremoso, rico.

25

- Buena fuente de vitaminas y minerales esenciales.

Ingredientes

30 **Vainilla:** -D Agua, Jarabe de Maíz, Maltodextrina (Maíz), Aceite de Maíz, Caseinatos de Sodio y Calcio, Azúcar (Sacarosa), Producto Aislado de Proteína de Soja, Cloruro de Magnesio, Citrato de Potasio, Fosfato de Calcio Tri-básico, Lecitina de Soja, Natural y Aroma Artificial, Citrato de Sodio, Cloruro de Potasio, Cloruro de Colina, Ácido Ascórbico, Carragenano, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Niacinamida, Pantotenato de Calcio, Sulfato de Manganeso, Sulfato Cúprico, Hidrocloruro de Cloruro de Tiamina, Hidrocloruro 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.

35

Proteína

40 La fuente de proteína es una combinación de dos proteínas de elevado valor biológico: caseína y soja.

40

| | |
|--------------------------------------|-----|
| Caseinatos de Sodio y calcio | 84% |
| Producto aislado de proteína de soja | 16% |

45

Grasa

50 La fuente de grasa es aceite de maíz.

55

| | |
|----------------|------|
| Aceite de Maíz | 100% |
|----------------|------|

60

Carbohidrato

65 ENSURE PLUS contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El suave dulzor y la variedad de sabores (vainilla, chocolate, fresa, café, manteca de pecán, y ponche de huevo), más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pecán, cereza, fresa, limón, y naranja ayudan a evitar el cansancio del sabor y contribuyen a la conformidad del paciente.

ES 2 306 523 T3

Sabores de Vainilla, fresa, manteca de pecán, y café

| | | |
|----|----------------|-----|
| 5 | Jarabe de Maíz | 39% |
| | Maltodextrina | 38% |
| 10 | Sacarosa | 23% |

Sabores de chocolate y ponche de huevo

| | | |
|----|----------------|-----|
| 15 | Jarabe de Maíz | 36% |
| 20 | Maltodextrina | 34% |
| | Sacarosa | 30% |

Vitaminas y Minerales

Una porción de 2,3 dL de ENSURE PLUS proporciona al menos un 15% de la RDI para 25 vitaminas y minerales clave.

Cafeína

El sabor de chocolate contiene 3,1 mg de cafeína/2,3 dL. El sabor de café contiene una cantidad vestigial de cafeína.

F. ENSURE PLUS® HN

Uso: ENSURE PLUS HN es un alimento líquido con alto contenido de nitrógeno, muy calórico nutricionalmente completo diseñado para gente con necesidades superiores de calorías y proteínas o con una tolerancia limitada al volumen. Se puede utilizar como suplemento oral o para un soporte nutricional total mediante intubación. ENSURE PLUS HN carece de lactosa y de gluten.

Condiciones del Paciente

- Para pacientes con un incremento en las necesidades de calorías y proteínas, por ejemplo después de cirugía o lesión.
- Para pacientes con tolerancia limitada al volumen y pronta saciedad.

Características

- Para nutrición suplementaria o total.
- Para alimentación oral o mediante intubación.
- 1,5 CaVmL,.
- Elevado contenido de nitrógeno.
- Denso calorimétricamente.

Ingredientes

Vainilla: -D Agua, Maltodextrina (Maíz), Caseinatos de Sodio y Calcio, Aceite de Maíz, Azúcar (Sacarosa), Producto Aislado de Proteína de Soja, Cloruro de Magnesio, Citrato de Potasio, Fosfato de Calcio Tribásico, Lecitina de

ES 2 306 523 T3

5 Soja, Natural y Aroma Artificial, Citrato de Sodio, Cloruro de Colina, Ácido Ascórbico, Taurina, L-Carnitina, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Niacinamida, Carragenano, Pantotenato de Calcio, Sulfato de Manganeso, Sulfato Cúprico, Hidrocloruro de Cloruro de Tiamina, Hidrocloruro 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® POWDER

10 Uso: ENSURE POWDER (reconstituido con agua) es un alimento líquido con bajo contenido de residuos diseñado principalmente como suplemento nutricional oral que se va a utilizar con o entre comidas. ENSURE POWDER carece de lactosa y gluten, y es adecuado para su uso en dietas modificadas, incluyendo dietas con bajo contenido de colesterol.

15 *Condiciones del Paciente*

- Para pacientes con dietas modificadas.
- Para pacientes ancianos en riesgo por nutrición.
- Para pacientes que se recuperan de una enfermedad/intervención quirúrgica.
- Para pacientes que necesitan una dieta con bajo contenido de residuos.

25 *Características*

- Conveniente, fácil de mezclar.
- Con bajo contenido de grasas saturadas.
- Contiene 9 g de grasa total y < 5 mg de colesterol por ración.
- Elevado contenido de vitaminas y minerales.
- Para dietas con bajo contenido de colesterol.
- Sin lactosa, fácilmente digerido.

40 Ingredientes: -D Jarabe de Maíz, Maltodextrina (Maíz), Azúcar (Sacarosa), Aceite de Maíz, Caseinatos de Sodio y Calcio, Producto Aislado de Proteína de Soja, Aroma Artificial, 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, Hidrocloruro de Cloruro de Tiamina, Sulfato Cúprico, Hidrocloruro 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

50 La fuente de proteína es una combinación de dos proteínas de elevado valor biológico: caseína y soja.

| | |
|--------------------------------------|-----|
| Caseinatos de sodio y calcio | 84% |
| Producto aislado de proteína de soja | 16% |

60 *Grasa*

La fuente de grasa es aceite de maíz.

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

ES 2 306 523 T3

Carbohidrato

ENSURE POWDER contiene una combinación de jarabe de maíz, maltodextrina, y sacarosa. El suave dulzor de ENSURE POWDER, más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pecán, cereza, fresa, limón, y naranja, ayuda a evitar el cansancio del sabor y contribuye a la conformidad del paciente.

Vainilla

| | |
|----------------|-----|
| Jarabe de Maíz | 35% |
| Maltodextrina | 35% |
| Sacarosa | 30% |

H. ENSURE® PUDDING

Uso: ENSURE PUDDING es un suplemento denso en nutrientes que proporciona una nutrición equilibrada en forma no líquida que se va a utilizar con o entre comidas. Es apropiado para dietas de consistencia modificada (p. ej., blandas, en puré, o completamente líquidas) o para gente con dificultades para tragar. ENSURE PUDDING carece de gluten.

Condiciones del Paciente

- Para pacientes con dietas de consistencia modificada (p. ej., blandas, en puré, o completamente líquidas).
- Para pacientes con dificultades para tragar.

Características

- Buen sabor, rico y cremoso.
- Buena fuente de vitaminas y minerales esenciales.
- No necesita refrigeración, pero es conveniente.
- Sin gluten.

Perfil de Nutrientes por 1,43 dL: Calorías 250, Proteína 10,9%, Grasa Total 34,9%, Carbohidrato 54,2%

Ingredientes

Vainilla: -D Leche no grasa, Agua, Azúcar (Sacarosa), Aceite de Soja Parcialmente Hidrogenado, Almidón Alimentario Modificado, Sulfato de Magnesio, Sal Sódica de Lactilato de Estearoilo, Fosfato de Sodio Dibásico, Aroma Artificial, Ácido Ascórbico, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Cloruro de Colina, Niacinamida, Sulfato de Manganeso, Pantotenato de Calcio, FD&C Amarillo núm. 5, Citrato de Potasio, Sulfato Cúprico, Palmitato de Vitamina A, Hidrocloruro de Cloruro de Tiamina, Hidrocloruro de Piridoxina, Riboflavina, FD&C Amarillo núm. 6, Ácido Fólico, Biotina, Filoquinona, Vitamina D3 y Cianocobalamina.

Proteína

La fuente de proteína es leche no grasa

| | |
|----------------|------|
| Leche no grasa | 100% |
|----------------|------|

Grasa

La fuente de grasa es aceite de soja hidrogenado.

| | |
|----------------------------|------|
| Aceite de soja hidrogenado | 100% |
|----------------------------|------|

ES 2 306 523 T3

Carbohidrato

ENSURE PUDDING contiene una combinación de sacarosa y almidón alimentario modificado. El suave dulzor y la variedad de sabores (vainilla, chocolate, caramelo de mantequilla, y tapioca) ayudan a evitar el cansancio del sabor. El producto contiene 9,2 gramos de lactosa por ración.

Vainilla y otros sabores distintos de chocolate

| | | |
|----|--------------------------------|-----|
| 10 | Sacarosa | 56% |
| 15 | Lactosa | 27% |
| | Almidón alimentario modificado | 17% |

Chocolate

| | | |
|----|--------------------------------|-----|
| 25 | Sacarosa | 58% |
| | Lactosa | 26% |
| 30 | Almidón alimentario modificado | 16% |

I. ENSURE® CON FIBRA

Uso: ENSURE CON FIBRA es un alimento completamente líquido, nutricionalmente completo, que contiene fibra diseñado para gente que se puede beneficiar de un aumento de fibra dietética y nutrientes. ENSURE CON FIBRA es adecuado para gente que no requiere una dieta con bajo contenido de residuos. Se puede administrar oralmente o mediante intubación, y se puede utilizar como suplemento nutricional de una dieta regular o, en cantidades apropiadas, como sustituto de una comida. ENSURE CON FIBRA carece de lactosa y de gluten, y es adecuado en dietas modificadas, incluyendo las dietas con un bajo contenido de colesterol.

Condiciones del Paciente

- Para pacientes que se pueden beneficiar de un aumento de fibra dietética y nutrientes.

Características

- Nueva fórmula avanzada con un bajo contenido de grasa saturada, con un contenido superior de vitaminas y minerales.
- Contiene 6 g de grasa total y < 5 mg de colesterol por ración.
- Sabor cremoso, rico.
- Buena fuente de fibra.
- Excelente fuente de vitaminas y minerales esenciales.
- Para dietas con bajo contenido de colesterol.
- Sin Lactosa ni gluten.

Ingredientes

Vainilla: -D Agua; Maltodextrina (Maíz), Azúcar (Sacarosa), Caseinatos de Sodio y Calcio, Fibra de Avena, Aceite de Cártamo con Alto Contenido de ácido Oleico, Aceite de Canola, Producto Aislado de Proteína de Soja, Aceite de Maíz, Fibra de Soja, Fosfato de Calcio Tribásico, Cloruro de Magnesio, Citrato de Potasio, Gel de Celulosa,

ES 2 306 523 T3

Lecitina de Soja, Fosfato de Potasio Dibásico, Citrato de Sodio, Sabores Naturales y Artificiales, Cloruro de Colina, Fosfato de Magnesio, Ácido Ascórbico, Goma de Celulosa, Cloruro de Potasio, Carragenano, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Sulfato de Cinc, Niacinamida, Sulfato de Manganeso, Pantotenato de Calcio, Sulfato Cúprico, Palmitato de Vitamina A, Hidrocloruro de Cloruro de Tiamina, Hidrocloruro de Piridoxina, Riboflavina, Ácido Fólico, Cloruro de Cromo, Biotina, Molibdato de Sodio, Yoduro de Potasio, Selenato de Sodio, Filoquinona, Vitamina D3 y Cianocobalamina.

Proteína

La fuente de proteína es una combinación de dos proteínas de elevado valor biológico caseína y soja.

| | |
|--------------------------------------|-----|
| Caseinatos de sodio y calcio | 80% |
| Producto aislado de proteína de Soja | 20% |

Grasa

La fuente de grasa es una combinación de tres aceites: aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico, canola, y maíz.

| | |
|--|-----|
| Aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico | 40% |
| Aceite de canola | 40% |
| Aceite de maíz | 20% |

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

Carbohidrato

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

Vainilla y otros sabores distintos de chocolate

| | |
|----------------|-----|
| Maltodextrina | 66% |
| Sacarosa | 25% |
| Fibra de Avena | 7% |
| Fibra de Soja | 2% |

ES 2 306 523 T3

Chocolate

| | | |
|----|----------------|-----|
| 5 | Maltodextrina | 55% |
| | Sacarosa | 36% |
| 10 | Fibra de avena | 7% |
| | Fibra de soja | 2% |

15

Fibra

20 La combinación de fibra utilizada en ENSURE CON FIBRA consiste en fibra de avena y polisacárido de soja. Esta combinación da como resultado aproximadamente 4 gramos de fibra dietética total por lata de 2,3 dL. La razón de fibra insoluble con respecto a soluble es de 95:5.

Los diversos suplementos nutricionales descritos antes y conocidos por otros expertos en la técnica pueden ser sustituidos y/o complementados con los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención.

25

J. Producto Nutricional Oxepa®

30 Oxepa es un producto nutricional entérico, calóricamente denso, con bajo contenido de carbohidratos diseñado para el tratamiento dietético de pacientes que padecen o tienen el riesgo de padecer ARDS. Tiene una única combinación de ingredientes, incluyendo una combinación de aceites patentada que contiene ácido eicosapentaenoico (EPA de aceite de pescado), ácido γ -linolénico (GLA de aceite de borraja), y elevados niveles de antioxidante.

Distribución Calórica

35 La densidad calórica es elevada a 1,5 Cal/mL (355 Cal/2,3 dL), para minimizar el volumen requerido para satisfacer las necesidades de energía. La distribución de Calorías en Oxepa se muestra en la Tabla IV.

40

TABLA IV

Distribución Calórica de Oxepa

45

| | por 2,3 dL | por litro | % de Cal |
|---------------------|------------|-----------|----------|
| 50 Calorías | 355 | 1.500 | --- |
| Grasa (g) | 22,2 | 93,7 | 55,2 |
| 55 Carbohidrato (g) | 25 | 105,5 | 28,1 |
| Proteína (g) | 14,8 | 62,5 | 16,7 |
| 60 Agua (g) | 186 | 785 | --- |

Grasa

- 65
- Oxepa contiene 22,2 g de grasa por porción de 2,3 dL (93,7 g/L).

ES 2 306 523 T3

• La fuente de grasa es una combinación de grasa con un 31,8% de aceite de canola, un 25% de triglicéridos de cadena media (MCT), un 20% de aceite de borraja, un 20% de aceite de pescado, y un 3,2% de lecitina de soja. El perfil de ácidos grasos típico de Oxepa se muestra en la Tabla V.

5 • Oxepa proporciona una cantidad equilibrada de ácidos grasos poliinsaturados, monosaturados y saturados, como se muestra en la Tabla VI.

10 • Los triglicéridos de cadena media (MCT) -- 25% de la combinación de grasas -- contribuyen al vaciado gástrico debido a que son absorbidos por el tracto intestinal sin emulsificación por los ácidos biliares.

Los diversos ácidos grasos componentes del producto nutricional Oxepa® pueden ser sustituidos y/o complementados con los PUFA producidos de acuerdo con esta invención.

TABLA V

Perfil de Ácidos Grasos Típico

| | % Ácidos Grasos Totales | g/2,3 dL* | g/L* |
|-----------------------|-------------------------|-----------|-------|
| Caproico (6:0) | 0,2 | 0,04 | 0,18 |
| Caprílico (8:0) | 14,69 | 3,1 | 13,07 |
| Cáprico (10:0) | 11,06 | 2,33 | 9,87 |
| Palmítico (16:0) | 5,59 | 1,18 | 4,98 |
| Palmitoleico | 1,82 | 0,38 | 1,62 |
| Esteárico | 1,94 | 0,39 | 1,64 |
| Oleico | 24,44 | 5,16 | 21,75 |
| Linoleico | 16,28 | 3,44 | 14,49 |
| α-Linolénico | 3,47 | 0,73 | 3,09 |
| γ-Linolénico | 4,82 | 1,02 | 4,29 |
| Eicosapentaenoico | 5,11 | 1,08 | 4,55 |
| n-3-Docosapentaenoico | 0,55 | 0,12 | 0,49 |
| Docosahexaenoico | 2,27 | 0,48 | 2,02 |
| Otros | 7,55 | 1,52 | 6,72 |

Los ácidos grasos suman aproximadamente el 95% de la grasa total.

ES 2 306 523 T3

TABLA VI

Perfil Graso de Oxepa

| | | |
|----|-------------------------------|----------------|
| 5 | % calorías totales de grasa | 55,2 |
| 10 | Ácidos grasos poliinsaturados | 31,44 g/L |
| | Ácidos grasos monoinsaturados | 25,53 g/L |
| 15 | Ácidos grasos saturados | 32,38 g/L |
| | Razón n-6 a n-3 | 1,75:1 |
| 20 | Colesterol | 9,49 mg/2,3 dL |
| | | 40,1 mg/L |

Carbohidrato

• El contenido de carbohidrato es de 25,0 g por porción de 2,3 dL (105,5 g/L).

• Las fuentes de carbohidrato son 45% de maltodextrina (un carbohidrato complejo) y 55% de sacarosa (un azúcar simple), ambas las cuales son fácilmente digeridas y absorbidas.

• El alto contenido de grasa y el bajo contenido de carbohidratos de Oxepa están diseñados para minimizar la producción de dióxido de carbono (CO₂). Los elevados niveles de CO₂ pueden complicar la retirada en los pacientes dependientes de un ventilador. El bajo nivel de carbohidratos también puede ser útil para aquellos pacientes que han desarrollado hiperglucemia inducida por el estrés.

• Oxepa carece de lactosa.

El carbohidrato dietético, los aminoácidos de las proteínas, y el radical glicerol de las grasas se pueden convertir en glucosa en el organismo. En todo este proceso, se satisfacen los requerimientos de carbohidratos de los tejidos dependientes de glucosa (tales como el sistema nervioso central y los glóbulos rojos de la sangre). No obstante, una dieta sin carbohidratos puede conducir a cetosis, catabolismo excesivo de las proteínas de los tejidos, y pérdida de fluidos y electrolitos. Estos efectos se pueden evitar mediante la ingestión diaria de 50 a 100 g de carbohidrato digestible, si la ingesta calórica es adecuada. El nivel de carbohidratos en Oxepa también es suficiente para minimizar la gluconeogénesis, si las necesidades de energía están satisfechas.

Proteína

• Oxepa contiene 14,8 g de proteína por ración de 2,3 dL (62,5 g/L).

• La razón de calorías/nitrógeno total (150:1) satisface la necesidad de los pacientes con estrés.

• Oxepa proporciona suficiente proteína para promover el anabolismo y el mantenimiento de la masa muscular sin precipitar problemas respiratorios. Las ingestas con alto contenido de proteína están involucradas en pacientes con insuficiencia respiratoria. Aunque la proteína tiene un pequeño efecto sobre la producción de CO₂, una dieta con elevado contenido de proteína aumentará el control de la ventilación.

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

• El perfil de aminoácidos del sistema de proteínas de Oxepa satisface o supera el patrón de proteína de alta calidad establecido por la Academia Nacional de Ciencias.

* Oxepa carece de gluten.

ES 2 306 523 T3

Ajustes por defecto para los programas de análisis

Programas GCG

5 Búsqueda FastA

Parámetros por defecto:

| | | | |
|----|-----------------------|--|--|
| 10 | intervalo de interés | Comienzo=1 | FINAL = última proteína o ácido nucleico |
| 15 | ajuste de la búsqueda | todo de SwissProt (proteína) o ácido) GenEMBL(nucleico | |
| 20 | tamaño de palabra | =(2) para proteína | =(6) para ácido nucleico |

25 La puntuaciones esperadas enumeran las puntuaciones hasta que el valor E() alcance 2,0

25 Búsqueda TFASTA

Parámetros por defecto:

| | | | |
|----|-----------------------|-------------------------|-------------------------------|
| 30 | intervalo de interés | Comienzo=1 | FINAL = último ácido nucleico |
| 35 | ajuste de la búsqueda | todo de GenEMBL | |
| 40 | tamaño de palabra | tamaño de palabra = (2) | |

45 Las puntuaciones esperadas enumeran las puntuaciones hasta que el valor E() alcanza 2,0

Apilamiento

50 Parámetros por defecto:

| | | |
|----|--|--|
| 55 | Penalización por creación de espacio | peso del espacio = 5 |
| 60 | penalización por ampliación de espacio | peso de la longitud del espacio = 12 |
| 65 | figura gráfica | densidad del gráfico de una página = 2,7 |

ES 2 306 523 T3

Programa Sequencher

Parámetros por defecto:

5

10

15

20

| | |
|-----------------------|--|
| Ensamblaje Automático | Algoritmo de datos erróneos = ensamblaje de cóntigos más lento pero comparaciones más rigurosas entre las secuencias |
| | emparejamiento mínimo = 85% |
| | solapamiento mínimo = 20 |

BLAST 2 (blastp, tblastn)

25

30

35

40

| | | | |
|-------------------------|-------|-------------|-------|
| Parámetros por defecto: | V=50 | Lambda=,329 | W=3 |
| | B=50 | K=0,140 | X=22 |
| | E=10 | H=0,427 | |
| blast n | | | |
| Parámetros por defecto: | V=100 | Lambda=1,37 | W=11 |
| | B=250 | K=0,171 | X1=22 |
| | E=10 | H=1,31 | X2=25 |

45

BLAST 2 Argumentos de la Línea de Comandos

50

55

60

65

| | |
|---|---|
| -v Títulos | número de mejores puntuaciones a mostrar |
| -b Alineamientos | número de mejores alineamientos a mostrar |
| -e Valor Esperado (E) | [Real] defecto = 10,0 |
| -m Opciones de visión de alineamientos: | 0 = por pares, |

ES 2 306 523 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

| | |
|---|--|
| | 1 = identidades que muestran amo-esclavo, |
| | 2 = amo-esclavo, sin identidades |
| | 3 = amo-esclavo plano, muestran identidades |
| | 4 = amo-esclavo plano, sin identidades, |
| | 5 = amo-esclavo, sin identidades y extremos romos, |
| | 6 = amo-esclavo plano, sin identidades y extremos romos |
| | [Número entero] |
| | defecto = 0 |
| -F Secuencia problema filtro. | (DUST con blastn, SEG con otros) [T/F] defecto = T |
| -G Coste para abrir un espacio | (cero invoca comportamiento por defecto) [Número entero] defecto = 0 |
| -E Coste para extender un espacio | (cero invoca comportamiento por defecto) [Número entero] defecto = 0 |
| -X X valor en disminución para alineamiento espaciado | (en bits) (cero invoca comportamiento por defecto) [Número entero] defecto = 0 |
| -I Muestra los GI en líneas de definición estándar | [T/F] defecto = F |
| -q Penalidad para un | (blastn solamente) [Número |

ES 2 306 523 T3

| | | |
|----|--|---|
| 5 | emparejamiento erróneo de nucleótidos | entero] defecto = -3 |
| 10 | -r Recompensa por un emparejamiento de nucleótidos | (blastn solamente) [Número entero] defecto = 1 |
| 15 | -f Umbral para títulos en extensión | defecto si cero [Número entero] defecto = 0 |
| 20 | -g Realiza alineamiento con espacios | (no disponible con tblastx) [T/F] defecto = T |
| 25 | -q Código genético problema a utilizar | [Número entero] defecto = 1 |
| 30 | -D DB Código genético | (para tblast[nx] solamente) [Número entero] defecto = 1 |
| 35 | -J Creer la línea de definición estándar problema | [T/F] defecto = F |
| 40 | -M Matriz | [Cuerda] defecto = BLOSUM62 |
| 45 | -W Tamaño de palabra | defecto si cero [Número entero] defecto = 0 |
| 50 | -z Longitud eficaz de la base de datos | (usar cero para el tamaño real) [Número entero] defecto = 0 |
| 55 | -a Número de procesadores a utilizar | [Número entero] defecto = sitio configurable (SeqServer.conf) |

| |
|---|
| Valores permitidos y por defecto para los parámetros espacio abierto/coste de la extensión del espacio (-G/-E): |
|---|

ES 2 306 523 T3

| | | | | | | | | | | | | | |
|----|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | BLOSUM62 | | | | | | | | | | | | |
| 5 | -G | 9 | 8 | 7 | 12 | 11 | 10 | | | | | | |
| | -E | 2 | 2 | 2 | | 1 | 1 | 1 | | | | | |
| 10 | BLOSUM50 | | | | | | | | | | | | |
| | -G | 12 | 11 | 10 | 9 | 15 | 14 | 13 | 12 | 18 | 17 | 16 | 15 |
| 15 | -E | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | PAM250 | | | | | | | | | | | | |
| 20 | -G | 13 | 12 | 11 | 10 | 15 | 14 | 13 | 12 | 19 | 18 | 17 | 16 |
| | -E | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 25 | BLOSUM90 | | | | | | | | | | | | |
| | -G | 8 | 7 | 6 | 11 | 10 | 9 | | | | | | |
| 30 | -E | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | | | | | | |
| | PAM30 | | | | | | | | | | | | |
| 35 | -G | 5 | 4 | 3 | 7 | 6 | 5 | 10 | 9 | 8 | | | |
| | -E | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | | | |
| 40 | PAM70 | | | | | | | | | | | | |
| | -G | 6 | 5 | 4 | 8 | 7 | 6 | 11 | 10 | 9 | | | |
| | -E | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | | | |

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una secuencia de nucleótidos aislada que codifica una elongasa funcionalmente activa que tiene una identidad de al menos aproximadamente 50% con la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 6, o su complemento.
2. La secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 1 donde dicha secuencia está representada por la secuencia mostrada en la Figura 6.
- 10 3. Una proteína purificada codificada por dicha secuencia de nucleótidos de las reivindicaciones 1 o 2.
4. Un método de producción de una enzima elongasa que comprende las etapas de:
- 15 a) aislar una secuencia de nucleótidos representada por la Figura 6;
- b) construir un vector que comprende: i) dicha secuencia de nucleótidos aislada conectada operablemente a ii) un promotor;
- 20 c) introducir dicho vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de dicha enzima elongasa.
5. Un vector que comprende: a) una secuencia de nucleótidos representada en la Figura 6 conectada operablemente a b) un promotor.
- 25 6. Una célula anfitriona que comprende dicho vector de la reivindicación 5.
7. Una célula vegetal, planta o tejido vegetal que comprende dicho vector de la reivindicación 5, donde la expresión de dicha secuencia de nucleótidos de dicho vector da como resultado la producción de al menos un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en un ácido graso monoinsaturado y un ácido graso poliinsaturado por dicha célula vegetal, planta o tejido vegetal.
- 30 8. Una planta transgénica que comprende dicho vector de la reivindicación 5, donde la expresión de dicha secuencia de nucleótidos de dicho vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado en las semillas de dicha planta transgénica.
- 35 9. Un mamífero no humano transgénico cuyo genoma comprende una secuencia de ADN como se define en la reivindicación 1 conectada a un promotor.
- 40 10. El mamífero no humano transgénico de la reivindicación 9, donde dicha secuencia de ADN está representada por la Figura 6.
11. Un método para producir un ácido graso poliinsaturado que comprende las etapas de:
- 45 a) aislar dicha secuencia de nucleótidos representada por la Figura 6;
- b) construir un vector que comprende dicha secuencia de nucleótidos aislada;
- 50 c) introducir dicho vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de una enzima elongasa codificada por dicha secuencia de nucleótidos aislada; y
- d) exponer dicha enzima elongasa expresada a un ácido graso poliinsaturado sustrato con el fin de convertir dicho sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto.
- 55 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11 que comprende adicionalmente la etapa de exponer dicho ácido graso poliinsaturado producto a al menos una desaturasa con el fin de convertir dicho ácido graso poliinsaturado producto en otro ácido graso poliinsaturado.
- 60 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende adicionalmente la etapa de exponer dicho otro ácido graso poliinsaturado a una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en al menos una elongasa y al menos una desaturasa adicional con el fin de convertir dicho otro ácido graso poliinsaturado en un ácido graso poliinsaturado final.
14. Una secuencia de nucleótidos aislada que codifica una elongasa funcionalmente activa que tiene una identidad de al menos aproximadamente 35% con la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 22, o su complemento.
- 65 15. La secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 14, donde dicha secuencia está representada por la secuencia mostrada en la Figura 22.

ES 2 306 523 T3

16. Una proteína purificada codificada por dicha secuencia de nucleótidos de las reivindicaciones 14 o 15.

17. Un método de producción de una enzima elongasa que comprende las etapas de:

- 5 a) aislar una secuencia de nucleótidos representada por la Figura 22;
- b) construir un vector que comprende: i) dicha secuencia de nucleótidos aislada conectada operablemente a ii) un promotor;
- 10 c) introducir dicho vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de dicha enzima elongasa.

18. Un vector que comprende: a) una secuencia de nucleótidos representada en la Figura 22 conectada operablemente a b) un promotor.

15 19. Una célula anfitriona que comprende dicho vector de la reivindicación 18.

20. Una célula vegetal, planta o tejido vegetal que comprende dicho vector de la reivindicación 18, donde 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.

21. Una planta transgénica que comprende dicho vector de la reivindicación 18, donde la expresión de dicha secuencia de nucleótidos de dicho vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado en las semillas de dicha planta transgénica.

25 22. Un mamífero no humano transgénico cuyo genoma comprende una secuencia de ADN como se define en la reivindicación 14, de *M. alpina*, que codifica una elongasa conectada operablemente a un promotor.

30 23. El mamífero no humano transgénico de la reivindicación 22, donde dicha secuencia de ADN está representada en la Figura 22.

24. Un método para producir un ácido graso poliinsaturado que comprende las etapas de:

- 35 a) aislar dicha secuencia de nucleótidos representada por la Figura 22;
- b) construir un vector que comprende dicha secuencia de nucleótidos aislada;
- c) introducir dicho vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de una enzima elongasa codificada por dicha secuencia de nucleótidos aislada; y
- 40 d) exponer dicha enzima elongasa expresada a un ácido graso poliinsaturado sustrato con fin de convertir dicho sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto.

45 25. El método de acuerdo con la reivindicación 24 que comprende adicionalmente la etapa de exponer dicho ácido graso poliinsaturado producto a al menos una desaturasa con el fin de convertir dicho ácido graso poliinsaturado producto en otro ácido graso poliinsaturado.

50 26. El método de acuerdo con la reivindicación 25 que comprende adicionalmente la etapa de exponer dicho otro ácido graso poliinsaturado a una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en al menos una elongasa y al menos una desaturasa adicional con el fin de convertir dicho otro ácido graso poliinsaturado en un ácido graso poliinsaturado final.

55 27. Una secuencia de nucleótidos aislada que tiene una identidad o complementariedad con la secuencia mostrada en la Figura 43, donde dicha secuencia de nucleótidos aislada codifica un polipéptido que tiene actividad elongasa.

28. Una proteína purificada codificada por dicha secuencia de nucleótidos de las reivindicaciones 27.

29. Un método de producción de enzima elongasa que comprende las etapas de:

- 60 a) aislar una secuencia de nucleótidos representada por la Figura 43;
- b) construir un vector que comprende: i) dicha secuencia de nucleótidos aislada conectada operablemente a ii) un promotor;
- 65 c) introducir dicho vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de dicha enzima elongasa.

ES 2 306 523 T3

30. Un vector que comprende: a) una secuencia de nucleótidos representada en la Figura 43 conectada operablemente a b) un promotor.

31. Una célula anfitriona que comprende dicho vector de la reivindicación 30.

32. Una célula vegetal, planta o tejido vegetal que comprende dicho vector de la reivindicación 30, donde la expresión de dicha secuencia de nucleótidos de dicho vector da como resultado la producción de al menos un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en un ácido graso monoinsaturado y un ácido graso poliinsaturado por dicha célula vegetal, planta o tejido vegetal.

33. Una planta transgénica que comprende dicho vector de la reivindicación 30, donde la expresión de dicha secuencia de nucleótidos de dicho vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado en las semillas de dicha planta transgénica.

34. Un mamífero no humano transgénico cuyo genoma comprende una secuencia de ADN como se define en la reivindicación 27 que codifica una elongasa conectada operablemente a un promotor.

35. Un mamífero no humano transgénico de la reivindicación 34, donde dicha secuencia de ADN está representada por la Figura 43.

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

a) aislar dicha secuencia de nucleótidos representada por la Figura 43;

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

c) introducir dicho vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de una enzima elongasa codificada por dicha secuencia de nucleótidos aislada; y

d) exponer dicha enzima elongasa expresada a un ácido graso poliinsaturado sustrato con el fin de convertir dicho sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto.

37. El método de acuerdo con la reivindicación 36 que comprende adicionalmente la etapa de exponer dicho ácido graso poliinsaturado producto a al menos una desaturasa con el fin de convertir dicho ácido graso poliinsaturado producto en otro ácido graso poliinsaturado.

38. El método de acuerdo con la reivindicación 37 que comprende adicionalmente la etapa de exponer dicho otro ácido graso poliinsaturado a una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en al menos una elongasa y al menos una desaturasa adicional con el fin de convertir dicho otro ácido graso poliinsaturado en un ácido graso poliinsaturado final.

39. Una secuencia de nucleótidos aislada que tiene una identidad o una complementariedad con la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 46.

40. La secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 39, donde dicha secuencia está representada por la secuencia mostrada en la Figura 46.

41. Un método de producción de una enzima elongasa que comprende las etapas de:

a) aislar una secuencia de nucleótidos representada por la Figura 46;

b) construir un vector que comprende: i) dicha secuencia de nucleótidos aislada conectada operablemente a ii) un promotor;

c) introducir dicho vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de dicha enzima elongasa.

42. Un vector que comprende: a) una secuencia de nucleótidos representada en la Figura 46 conectada operablemente a b) un promotor.

43. Una célula anfitriona que comprende dicho vector de la reivindicación 42.

44. Una célula vegetal, planta o tejido vegetal que comprende dicho vector de la reivindicación 42, donde 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.

ES 2 306 523 T3

45. Una planta transgénica que comprende dicho vector de la reivindicación 42, donde la expresión de dicha secuencia de nucleótidos de dicho vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado en las semillas de dicha planta transgénica.

5 46. Un mamífero no humano transgénico cuyo genoma comprende una secuencia de ADN como se define en la reivindicación 40, de *C. elegans*, que codifica una elongasa conectada operablemente a un promotor.

47. Un método para producir un ácido graso poliinsaturado que comprende las etapas de:

10 a) aislar dicha secuencia de nucleótidos representada por la Figura 46;

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

15 c) introducir dicho vector en una célula anfitriona en un tiempo y unas condiciones suficientes para la expresión de una enzima elongasa codificada por dicha secuencia de nucleótidos aislada; y

d) exponer dicha enzima elongasa expresada a un ácido graso poliinsaturado sustrato con el fin de convertir dicho sustrato en un ácido graso poliinsaturado producto.

20 48. El método de acuerdo con la reivindicación 47 que comprende adicionalmente la etapa de exponer dicho ácido graso poliinsaturado producto a al menos una desaturasa con el fin de convertir dicho ácido graso poliinsaturado producto en otro ácido graso poliinsaturado.

25 49. El método de acuerdo con la reivindicación 48 que comprende adicionalmente la etapa de exponer dicho otro ácido graso poliinsaturado a una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en al menos una elongasa y al menos una desaturasa adicional con el fin de convertir dicho otro ácido graso poliinsaturado en un ácido graso poliinsaturado final.

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1
Rutas de Biosíntesis de Ácidos Grasos

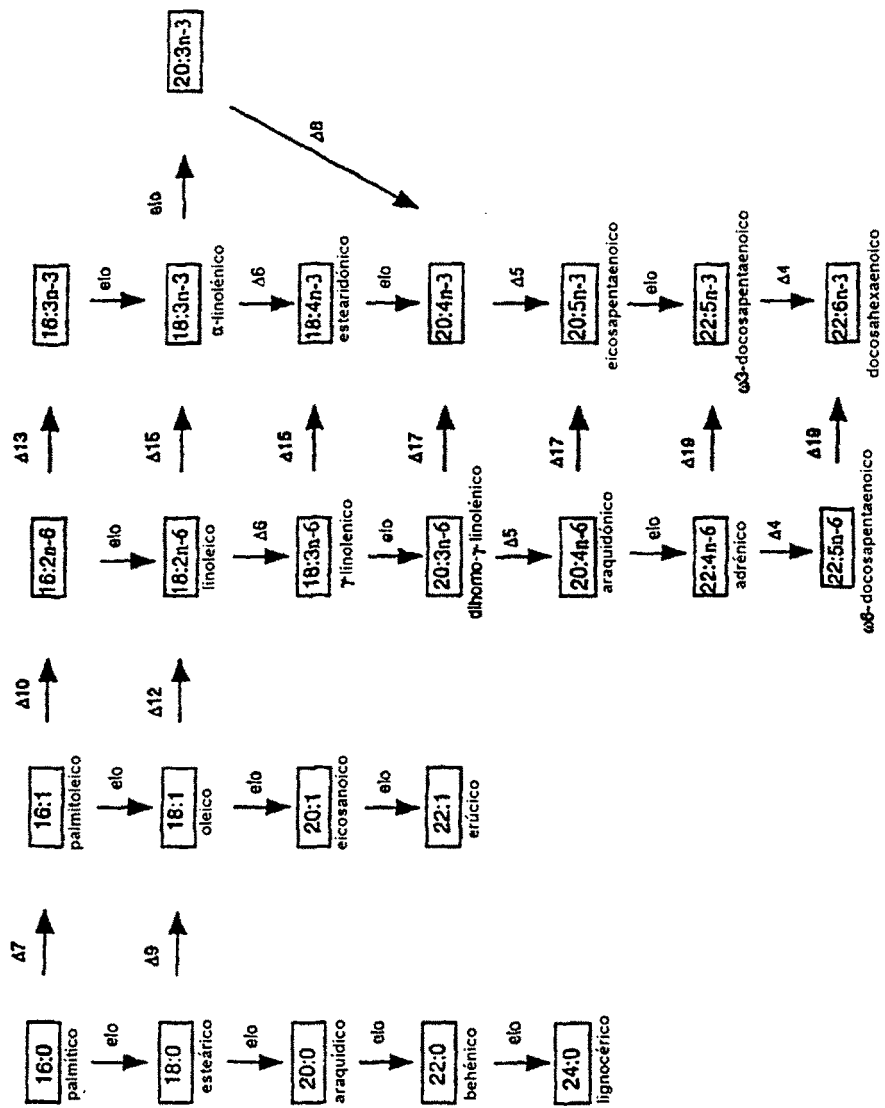


Figura 2

Peso Espacio: 6 Emparejamiento Medio: 2,912
 Longitud Espacio: 4 Emparejamiento erróneo: -2,003 Medio
 Cualidad: 50 Longitud: 84
 Razón: 0,625 Espacios: 4
 Porcentaje Similitud: 43,038 Porcentaje Identidad: 29,114

Umbral de Presentación de Emparejamientos para los alineamientos:

| = IDENTIDAD
 : = 2
 . = 1

KCS joba x ELO2 4-JUNIO, 1998 08:23 ..

```

KCS joba    24 ATLPNFKSSINLHHVKL.GYHYLISNALFLVFIPLLGLASHLSSFSAHD 72
      .||| .| ::| : | :|:| | || | ..
ELO2        66 STLPPVLYAITAYYVIFGGRFLLSKS..KPF.KLNGLFQLHNLVLTSL 112

KCS joba    73 LSLFDLLRRNLLPVVCSFLFVLLATLHFLTRP 106
      |.|| |: |.::| |: : : |.|
ELO2        113 LTLLL.LMVEQLVPIIVQHGLYFAICNIGAWTQP 145
    
```

Figura 3

ELO2 de *S. cerevisiae* (AA66-145) con preferencia codónica de *M. alpina*

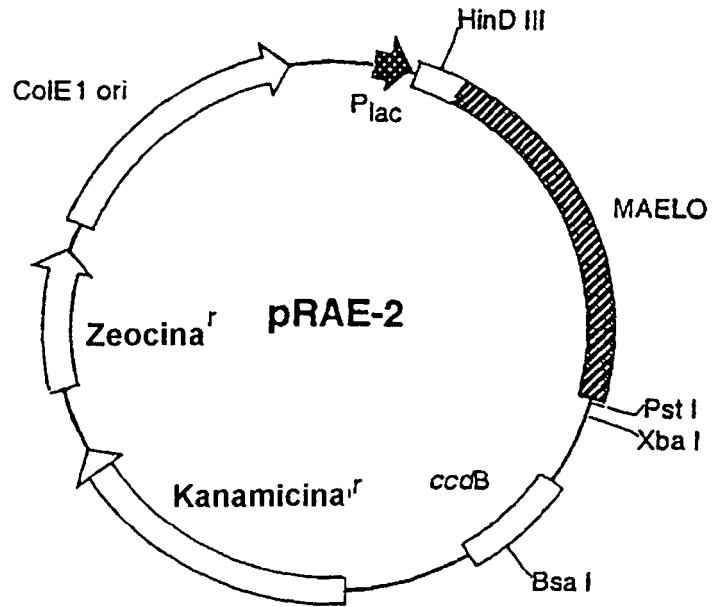
```

S T L P P V L Y A I T A Y Y V I I F G G R F L
TCC ACC CTC CCC CCC GTC CTC TAC GCC ATC ACC GCC TAC TAC GTC ATC ATC TTC GGT GGT CGC TTC CTC
66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88
L S K S K P F K L N G L F Q L H N L V L T S L
CTC TCC AAG TCC AAG CCC TTC AAG CTC AAC GGT CTC TTC CAG CTC CAC AAC CTC GTC CTC ACC TCC CTC
89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111
S L T L L L L M V E Q L V P I I V Q H G L Y F
TCC CTC ACC CTC CTC CTC ATG GTC GAG CAG CTC GTC CCC ATC ATC GTC CAG CAC GGT CTC TAC TTC
112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134
A I C N I G A W T Q P
GCC ATC TGC AAC ATC GGT GCC TGG ACC CAG CCC
135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145
<--- R0339

```


Figura 4

A



B

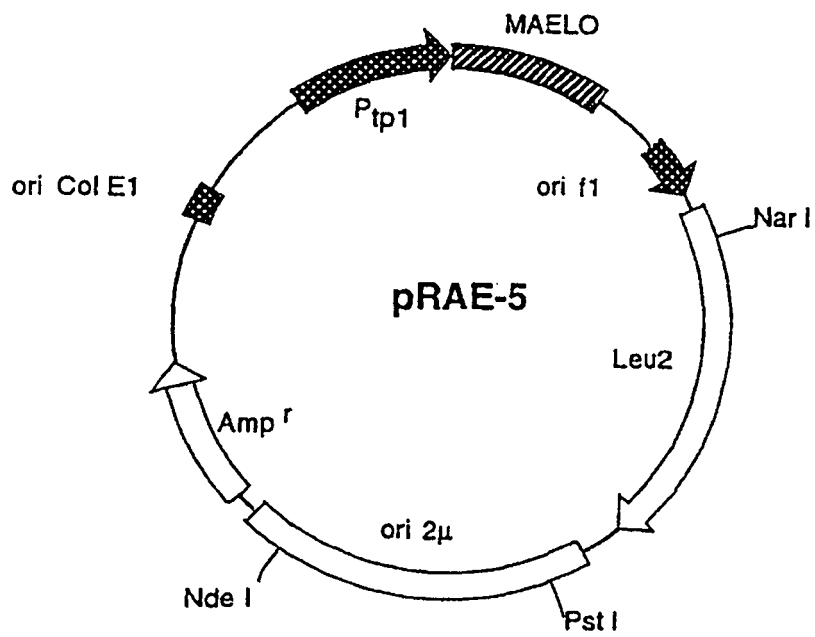


Figura 6

```

1  ATGGCCGCCG CAATCTTGGA CAAGGTCAAC TTCGGCATTG ATCAGCCCTT
51  CGGAATCAAG CTCGACACCT ACTTTGCTCA GGCCTATGAA CTCGTCACCG
101 GAAAGTCCAT CGACTCCTTC GTCTTCCAGG AGGGCGTCAC GCCTCTCTCG
151 ACCCAGAGAG AGGTGCGCCAT GTGGACTATC ACTTACTTCG TCGTCATCTT
201 TGGTGGTCGC CAGATCATGA AGAGCCAGGA CGCCTTCAAG CTCAAGCCCC
251 TCTTCATCCT CCACAACCTC CTCCTGACGA TCGCGTCCGG ATCGCTGTTG
301 CTCTGTTCFA TCGAGAACCT GGTCCCCATC CTCGCCAGAA ACGGACTTTT
351 CTACGCCATC TGCACGACG GTGCCTGGAC CCAGCGCCTC GAGCTCCTCT
401 ACTACCTCAA CTACCTGGTC AAGTACTGGG AGTTGGCCGA CACCGTCTTT
451 TTGGTCCCTA AGAAGAAGCC TCTTGAGTTC CTGCACTACT TCCACCACTC
501 GATGACCATG GTTCTCTGCT TTGTCCAGCT TGGAGGATAC ACTTCAGTGT
551 CCTGGGTCCC TATTACCCTC AACTTGACTG TCCACGTCTT CATGTACTAC
601 TACTACATGC GCTCCGCTGC CGGTGTTTCG ATCTGGTGGG AGCAGTACTT
651 GACCACTCTC CAGATCGTCC AGTTCGTTCT TGACCTCGGA TTCATCTACT
701 TCTGCGCCTA CACCTACTTC GCCTTCACCT ACTTCCCCTG GGCTCCCAAC
751 GTCGGCAAGT GCGCCGGTAC CGAGGGTGCT GCTCTCTTTG GCTGCGGACT
801 CCTCTCCAGC TATCTCTTGC TCTTTATCAA CTTCTACCGC ATTACCTACA
851 ATGCCAAGGC CAAGGCAGCC AAGGAGCGTG GAAGCAACTT TACCCCAAG
901 ACTGTCAAGT CCGGCGGATC GCCCAAGAAG CCCTCCAAGA GCAAGCACAT
951  CTAA

```

Figura 7

1 MAAAILDKVN FGIDQPFGIK LDTYFAQAYE LVTGKSIDSF VFQEGVTPLS
51 TQREVAMWTI TYFVVIFGGR QIMKSQDAFK LKPLFILHNF LLTIASGSL
101 LLFIENLVPI LARNGLFYAI CDDGAWTQRL ELLYYLNYLV KYWELADTVF
151 LVLKKKPLEF LHYPHHSMTM VLCFVQLGGY TSVSWVPITL NLTVHVFMYY
201 YYMRSAAAGR IWWKQYLTTL QIVQFVLDLG FIYFCAYTYF AFTYFPWAPN
251 VGKCAGTEGA ALFGCGLLSS YLLLFINFYR ITYNAKAKAA KERGSNFTP
301 TVKSGGSPKK PSKSKHI*

Figura 9

PUNTUACIONES Init1: 153 Initn: 199 Opt: 495
57,4% de identidad en solapamiento de 549 pb

| | | | | | | |
|--------|--|------|------|------|------|------|
| | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| MAELO | TCTCGACCCAGAGAGAGGTCGCCATGTGGACTATCACTTACTTGTGTCATCTTTGGTG | | | | | |
| | | | | | | |
| S78624 | CATTAAAGCACTTTGCCCTGTGCTATACGCCATCACTGCCTATTACGTTATTATTTTG | | | | | |
| | 5990 | 6000 | 6010 | 6020 | 6030 | 6040 |
| | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 |
| MAELO | GTCGCCAGATCATGAAGAGCCAG--GACGCC--TTCAGCTCAACCCCTTTCATCCTCC | | | | | |
| | | | | | | |
| S78624 | GTGGCAGTTTTGTTAAGTAAGTCGAAACCATTTAAATTAATGGCCTTTTCCAATTGC | | | | | |
| | 6050 | 6060 | 6070 | 6080 | 6090 | 6100 |
| | 270 | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 |
| MAELO | ACAACCTCCTCCTGACGATGGCTCC--GGATCGCTGTGCTCCTGTTTCATCGAGAACT | | | | | |
| | | | | | | |
| S78624 | ATAATTTGGTTTTAAC-TTCACCTTCATTGA-CGCTTTTATTGCTTATGGTTGAACAATT | | | | | |
| | 6110 | 6120 | 6130 | 6140 | 6150 | 6160 |
| | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 |
| MAELO | GGTCCCCATCCTCGCCAGAAACGGACTTTTCTACGCCATCTGCGACGACGGTGCCTGGAC | | | | | |
| | | | | | | |
| S78624 | AGTGCCAATTATTGTTTCAGCAGGGTATACCTCGCTATCTGTAATATGGTGCCTGGAC | | | | | |
| | 6170 | 6180 | 6190 | 6200 | 6210 | 6220 |
| | 390 | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 |
| MAELO | CCAGCGCTCGAGCTCCTCTACTACCTCACTACCTGGTCAAGTACTGGGAGTTGGCCGA | | | | | |
| | | | | | | |
| S78624 | TCAACCGCTCGTTACATTATATACATGAATTACATTGTCAAGTTTATGAATTTATAGA | | | | | |
| | 6230 | 6240 | 6250 | 6260 | 6270 | 6280 |
| | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 |
| MAELO | CACCGTCTTTTGGTCTCAAGAAGAAGCCTCTTGAGTTCCTGCACTACTTCCACCCTC | | | | | |
| | | | | | | |
| S78624 | CACCTTTTCTTGGTGTAAAACATAAAAATTGACATTTTGCATACTT--ATCA--C | | | | | |
| | 6290 | 6300 | 6310 | 6320 | 6330 | 6340 |
| | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | |
| MAELO | GATGACCATGGTCTCTGCTTGT----CCAGCTTGGAGGATA-CACCTCAGTGTCTGG | | | | | |
| | | | | | | |
| S78624 | CATGGCGCTACTGCCTTATTATGTTACACCCATTGATGGCCACCACATCTATTCTTGG | | | | | |
| | 6350 | 6360 | 6370 | 6380 | 6390 | 6400 |
| | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 | 610 |
| MAELO | GTCCTATTACCTCAACTTGACTGTCCACGCTTTCATGTACTACTACTACATGCGCTCC | | | | | |
| | | | | | | |
| S78624 | GTCCTATTTCATTGAACCTTGGTGTTCACGTGGTTATGTATTGGTACTATTT---CTTG | | | | | |
| | 6410 | 6420 | 6430 | 6440 | 6450 | |
| | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 | 670 |
| MAELO | GCTGCC---GGTGTTCGCATCTGGTGAAGCAGTACTTGACCACTCTCCAGATCGTCCAG | | | | | |
| | | | | | | |
| S78624 | GCTGCCAGGCATCAGGGTCTGGTGAAGGAATGGGTTACCAGATTTCAAATTTATCCAA | | | | | |
| | 6460 | 6470 | 6480 | 6490 | 6500 | 6510 |
| | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 | 730 |
| MAELO | TTGTTCTTGACCTGGATTCACTACTTCTGCGCTACACCTACTTCCGCTTCACTAC | | | | | |
| | | | | | | |
| S78624 | TTGTTTGGATATCGGTTTCATATATTTGCTGTCTACCAAAAAGCAGTTCACTTGTAT | | | | | |
| | 6520 | 6530 | 6540 | 6550 | 6560 | 6570 |

Figura 10A

| Anfitrión (plásmido) | 334 (PCGN7875) | 334 (pYES2) | 334 (pYX242) | 334 (pRAE-5) | 334 (pRAE-6) | 334 (pYX242) | 334 (pRAE-5) |
|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------|--------------|
| Sustrato añadido | OA 25 µM | OA 25 µM | GLA 25 µM | GLA 25 µM | GLA 25 µM | sin sustrato | sin sustrato |
| Acido Graso | Lípido µg | Lípido µg | Lípido µg | Lípido µg | Lípido µg | Lípido µg | Lípido µg |
| C16:0 | 11,948 | 23,601 | 35,123 | 92,011 | 85,160 | 16,294 | 25,34 |
| C16:1 | 30,665 | 71,217 | 32,789 | 315,464 | 115,456 | 56,183 | 113,913 |
| C18:0 | 6,185 | 9,704 | 10,515 | 22,628 | 18,879 | 5,535 | 11,092 |
| C18:1n-9 | 35,340 | 57,429 | 33,989 | 154,386 | 106,881 | 28,388 | 51,538 |
| C18:3n-6 | | | 48,856 | 58,084 | 12,434 | | |
| C20:0 | | | 0,474 | 0,710 | 0,244 | | |
| C20:1n-9 | (0,375%)* 0,352 | (0,309%)* 0,527 | | 1,405 | 0,867 | | 0,516 |
| C20:3n-6 | ND | ND | (0,092%)* 0,226 | (0,324%)* 2,504 | (0,269%)* 1,006 | ND | ND |
| C22:0 | | | | 0,460 | | | |
| C22:1n-9 | | | | 0,321 | 0,315 | | |
| C24:0 | | | | | 1,825 | | 0,999 |
| Lípidos Totales | 93,760 | 170,490 | 245,090 | 771,690 | 374,420 | 112,99 | 256,52 |
| ND = No Detectado | | | | | | | |
| *% ácido graso total | | | | | | | |

Figura 10B

| Anfitrión (plásmido) | 334 (PYX242) | 334 (PYX242) | 334 (PRAE-5) | 334 (PRAE-5) | 334 (PRAE-5) | 334 (PRAE-6) |
|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------|
| Sustrato añadido | GLA 25 µM | GLA 25 µM | GLA 25 µM | GLA 25 µM | GLA 25 µM | GLA 25 µM |
| Acido Graso | Lípido µg | Lípido µg | Lípido µg | Lípido µg | Lípido µg | Lípido µg |
| C16:0 | 60,683 | 61,487 | 100,998 | 96,193 | 66,761 | |
| C16:1 | 79,838 | 79,586 | 359,754 | 220,440 | 87,359 | |
| C18:0 | 9,784 | 10,106 | 15,317 | 15,165 | 16,744 | |
| C18:1n-9 | 38,536 | 39,936 | 108,472 | 89,637 | 71,631 | |
| C18:3n-6 | 17,974 | 17,833 | 82,866 | 56,596 | 17,766 | |
| C20:0 | | | 0,510 | 0,570 | | |
| C20:1n-9 | | | | | | |
| C20:3n-6 | (0,136%)* 0,389 | (0,130%)* 0,374 | (0,336%)* 3,035 | (0,401%)* 2,689 | (0,353%)* 1,185% | |
| C22:0 | | | 0,414 | | | |
| C22:1n-9 | | | | 0,383 | | |
| C24:0 | | | 1,513 | 1,626 | | |
| Lípidos Totales | 285,560 | 288,045 | 902,560 | 671,113 | 335,496 | |
| *% Acido graso total | | | | | | |

Figura 11

| Anfitrión (plásmido) | 334 (pRAE-5/pCGR4) | 334 (pYX42/pYES2) | Anfitrión (Plásmido) | 334 (pRAE-5/pCGR4) | 334 (pYX242/pYES2) |
|-------------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Sustrato añadido | GLA 25 µM | GLA 25 µM | | GLA 25 µM | GLA 25 µM |
| Acido Graso | Lípido µg | Lípido µg | | Lípido µg | Lípido µg |
| C16:0 | 41,050 | 37,169 | C16:0 | 96,986 | 32,221 |
| C16:1 | 99,393 | 100,552 | C16:1n-7 | 209,986 | 32,221 |
| C18:0 | 34,432 | 27,852 | C18:0 | 80,418 | 14,027 |
| C18:1 | 110,631 | 92,786 | C18:1n-9 | 207,104 | 28,701 |
| C18:3n-6 | 15,004 | 7,924 | C18:3n-6 | 25,264 | 10,543 |
| C20:0 | 0,643 | 0,574 | C20:0 | 2,038 | |
| C20:1 | 1,996 | 1,684 | C20:1n-9 | 3,591 | |
| C20:3n-6 | 0,542 | 0,607 | C20:3n-6 | 1,284 | 0,326 |
| C22:4n-6 | 0,579 | | C20:4n-6 | 1,392 | |
| C22:0 | 1,242 | 2,604 | C24:0 | 3,952 | |
| C24:0 | 4,754 | 4,563 | C24:0 | 3,952 | |
| Lípidos Totales | 334 | 300 | Lípidos Totales | 756 | 197 |

Figura 12

| Anfitrión (plásmido) | 334 (pYX242) | 334 (pRAE-5) | 334 (pRELO-1) | 334 (pRELO-2) |
|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Sustrato añadido | GLA 25 µM | GLA 25 µM | GLA 25 µM | GLA 25 µM |
| Acido Graso | Lípido µg | Lípido µg | Lípido µg | Lípido µg |
| C16:0 | 28,7 | 76,707 | 84,424 | 77,445 |
| C16:1 | 0,729 | 2,513 | 1,532 | 1,056 |
| C18:0 | 7,432 | 15,761 | 27,17 | 21,32 |
| C18:1n-9 | 28,9 | 77,323 | 109,419 | 82,844 |
| C18:3n-6 | 0,729 | 29,236 | 19,085 | 18,804 |
| C20:0 | | 0,643 | 0,522 | 0,537 |
| C20:1n-9 | | 0,77 | 0,426 | 0,299 |
| C20:3n-6 | (0,185%)* 0,374 | (0,279%)* 1,472 | (0,153%)* 0,748 | (0,200%)* 0,832 |
| C22:0 | | 0,451 | | |
| C22:1n-9 | | | 0,224 | |
| C24:0 | | 0,918 | | |
| Lípidos Totales | 202 | 527 | 490 | 416 |
| *% Acido graso total | | | | |

ES 2 306 523 T3

Figura 13

PUNTUACIONES Init1: 156 Initn: 215 Opt: 296
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN: 296; 28,8% identidad en un solapamiento de 264 aa

```

    10      20      30      40      50      60
U61954    RTFKMMDQILGNTNFTYEGAKEVARGLEGFSAKLAVGYIATIFGLKYMKDRKAFDLSTPL
           |  :: |:::| |  :  |::: | |  |:  | |
MAELO     AQAYELVTGKSIDSFVFOEGVTPLSTQREVAMWTITYFVVIFFGGRQIMKSQDAFKLK-PL
           30      40      50      60      70      80

    70      80      90      100     110     119     120
U61954    NIWNGILSTFSLGFLFTF-PTLLSVIRKDGFSHTYSHVSELYTDSTSGYWI-----F
           |  :::| |::  ::|: |  :|:::  ::|:  :|:  :|  |  :
MAELO     FILHNFLLTIASGSLLLLFIEIENLVPILARNGL-----FYAICDDGAWTORLELLYY
           90      100     110      120     130

           130     140     150     160     170
U61954    LWVISKIPELLDTVFIVLKRPILIFMHWYHALTGYYALVCYHE--DAVHMVWV-VWMNY
           |  :  |  | | | | |::|:| | | |::|:| |  ::|:  :  :  :  | |  :  |
MAELO     LNYLVKYWELADTVFLVLKPKPLEFLHYFHHSMT---MVLCFVQLGGYTSVSWVPITLNL
           140     150     160     170     180     190

    180     190     200     210     220     230
U61954    IIHAFMYGYLLKSLKVPIPPSVAQAITTSQMVOFA-----VAIFAQVHVSYKHYVEGVE
           :|:| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
MAELO     TVHVFMYYYMRSAAQVRI--WVKQYLTTLQIVQFVLDLGFIFYFCAYTYFAFTYFPWAPN
           200     210     220     230     240     250

           240     250     260     270     280
U61954    -GLAYSFRGTAI-GFFMLTTYFYLWIQFYKEHYLKNKGKYNLAKDQAKTQTKKAN
           |  :  :  :|:| |  :|::|:| | | | | | | |  :  |  :  | |:::| |  |
MAELO     VGKCAGTEGAALFGCGLLSSYLLLFINFYRITY----NAKAKAAKERGSNFTPKTVKSGG
           260     270     280     290     300

MAELO     SPKKPSKSKHIX
           310
    
```

ES 2 306 523 T3

Figura 14

PUNTUACIONES Init1: 178 Initn: 178 Opt: 318
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN: 318; 33,0% identidad en un solapamiento de 188 aa

```

                50      60      70      80      90      100
Z68749      SLLTNQDEVFPHIRARRFIQEHFGLFVQMAIAYVILVFSIKRFMRDREPFQLTALRLWN
                |:| :::|: :::|::: |:| : | |
MAELO      ELVTGKSIDSFVFQEGVTPPLSTQREVAMWTITYFVVIFGGRQIMKSQDAFKLKPLFILHN
            30      40      50      60      70      80

                110     120     130     140     150     160
Z68749      FFLSVFSIYGSWTMFPF--MVQQIRLYGLYGCGCEALSNLPSQAEYWLFLTILSKAVEFV
            |:|:: | || : : : | : | | : : : : | : | | | | : :
MAELO      FLLTIAS--GSLLLFTIENLVPILARNGLFYAICDD-GAWTORLELLELYLNYLVKYWELA
            90      100     110     120     130     140

                170     180     190     200     210     220
Z68749      DTFFLVLRKKPLIFLHWYHHMATFVVFCSNYPTPSSQSRVGVIVNLFVHAFMYPYFTRS
            || |||:| || | | : : | : | | : : | | : | | | : :
MAELO      DTVFLVLKPKPLEFLHYFHHSMTMVLCFVQLGGYTSVSWVPITLNLTVHVFMYYYMRSA
            150     160     170     180     190     200

                230     240     250     260     270
Z68749      MNIKVPAKISMAVTVLQLTQF---MCFIYGCTLMYSLATNQARYPSNTPATLQCLSYTL
            : : : | : : | : | : | | : | | | : : : :
MAELO      AGVRIWWK--QYLTLQIVQFVLDLGFYFCAYTYFAFTYFPWAPNVGKGCAGTEGAALFG
            210     220     230     240     250     260

280
Z68749      HLL

MAELO      CGLLSSYLLLFINFYRITYNAKAKAAKERGSNFTPKTVKSGGSPKPKSKSKHIX
            270     280     290     300     310
    
```

Figura 15

PUNTUACIONES Init1: 30 Initn: 30 Opt: 40
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN: 49; 22,1% identidad en un solapamiento de 86 aa

```

                10      20      30      40
AF003134      MLYSITRRCYTFVTSLHFYQLYVTECLENVIFNVLVNGQSINSRWKD
                |:|: : |:| : : : : |:| |: : : : :
MAELO        MAAAILDKVNFGIDQPFQIKLDTYFAQA---YELVTGKSIDSFVFQEGVT--PLSTQREV
                10      20      30      40      50

                50      60      70      80      90      100
AF003134      AEKTITSFPFHF-----PQTFQPHILTLHFLEFVSVTLVTVFKKPKCFPHSLA
                | ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
MAELO        AMWTITYFVVIFGGRQIMKSQDAFKLPLFILHNFLLTIASGSLLLLFIEIENLVPIIARNG
                60      70      80      90      100      110
    
```

Figura 16

Ratón

PUNTUACIONES Init1: 161 Initr: 191 Opt: 325
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN: 325; 28,8% identidad en un solapamiento de 285 aa

```

                10      20      30      39      40
U97107      MDTSMNFSRGLKMD--LMQPYDFETFDLRPFLEEXWVSSF-----LIVV
                |:|:| :|:|:| :|:|:| :|:|:| :|:|:| :|:|:|
MAELO      MAAAILDKVNFQIDQPFQIKLDTYFAQAYELVTGKSIDSEVFAQEGVTPPLSTQREVAMWTI
                10      20      30      40      50      60

                50      60      70      80      90      100
U97107      VYLLLVVGGQTYMRTRKSFSLQRPLILWSFFLAIFSIILGTLRMWKEMATVMFTVGLKQIV
                :|:|:| |:|:|:| :|:|:| :|:|:| | |:|:| :|:|:| :|:|:| :|:|:|
MAELO      TYFVVI FGGRQIMKSQDAFKLPLFLHNFLLTIAS--GSL-LLLFTENLV-PILARNGI
                70      80      90      100      110

                110     120     130     140     150
U97107      CFAIYTD DAVVREWSFLFLLSKVV---ELGDTAFIILRKRPLIFVHWYHHST--VLLFTS
                :| | |:| :|:|:| :|:|:| :|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
MAELO      FYAICDDGAWTORLELLYYLNYLVKYWELADTVFLVLKPKPLEFLHYFHHSMTMVLCFVQ
                120     130     140     150     160     170

160      170      180      190      200      210
U97107      FGYNKVPSSGGWF-MTMNEGVHSMVMTYYTMKAARKLKHENLLPMVITSLQILQMVLG---
                :| :|:| :| :|:|:| || || || :|:| :| :|:|:|:|:|:|
MAELO      LGGYTSV---SWVPITLNLTVHVMYMYMRSAAAGVR--IWWKQYLTLQIVQFVLDLGF
                180     190     200     210     220     230

                220     230     240     250     260
U97107      -----TIEGILNYIWRQKKG-CHTTTEHFFWSEMLYGTYFILEFAHFFHRAYLRPKGKVA
                | |:| :| :| | | | :|:| :|:|:|:| :|:|:| |:|:|
MAELO      IYFCAYTYFAFTYFPWAPNVGKAGTEGAALFGCGLLSSYLLLFINFYRITY-NAKAKAA
                240     250     260     270     280     290

270
U97107      SKSQX
                ::
MAELO      KERGSNFTPKTVKSGGSPKPKPSKSKHIX
                300     310
    
```

Humano

PUNTUACIONES Init1: 147 Initr: 147 Opt: 211
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN: 211; 28,7% identidad en un solapamiento de 150 aa

```

                110     120     130     140     150     160
MAELO      NLVPILARNGLFYAICDDGAWTORLELLYYLNYLVKYWELADTVFLVLKPKPLEFLHYFH
                |:|:| :|:|:| :|:|:| :|:|:| | |:|:|
AC004050      SLLVVKDLTYLLPLCLPGDTIFIILRQKLI FLHWYH
                10      20      30

                170     180     190     200     210     220
MAELO      HSMTMVLCFVQLGGYTSVSWVPITLNLTVHVMYMYMRSAAAGVRIWVK--QYLTLQIV
                | :|:| :| :|:|:| :|:|:| ||:| || || || |:| :| :|:|:|:|
AC004050      HITVLLYSWYSYKDMVAGGGWEMTMNYGVHAVMYSYALRAAGFRVSRKFAMFTLSQIT
                40      50      60      70      80      90

                230     240     250     260     270     280
MAELO      QFVLDLGFYFCAYTYFAFTYFPWAPNVGKAGTEGAALFGCGLLSSYLLLFINFYRITY
                |:|:| :|:|:| | :|:| :|:|:| :|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
AC004050      QMLMG-----CVVNYLVFC---WMQH-DQCHSHFQNI FWSSIMYLSYLVLFCHEFFFEAY
                100     110     120     130     140
    
```

Figura 17

PUNTUACIONES Init1: 87 Initn: 218 Opt: 232
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN: 272; 29,7% identidad en un solapamiento de 232 aa

| | | | | | | |
|--------|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
| MAELO | SFVFQEGVTPLPSTQREVAMWTITYFVVIFGGRQIMKSQDAFKLKLPLFILHNFLLTIASGS | | | | | |
| I05465 | PRYKSQRMVPPGQLHPYVCLFCYLLTHCMAGTKIHEEPAAVLLPSILQLYNLGLTLLS-- | | | | | |
| | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
| | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
| MAELO | LLLLFIENLVPILARNGLFYAICDDGAWTQRLELLYYL--NYLVKYWELADTVFLVLRKK | | | | | |
| I05465 | -LYMFYELVTGVWEGKYNFFCQGTRSAGESDMKIIRVLWVYFYSKLIIEFMDTFFFILRKN | | | | | |
| | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | |
| | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 |
| MAELO | --PLEFLHYFHH-SMTMVLFCFVQLGGYTSVSWVPITLNLTVHVFMYYYY-MRSAAGVR-- | | | | | |
| I05465 | NHQITVLHVYHHATMLNIWWFVMNWVPCGHSYFGATLNSFIHVLVMSYGLSSIPSMRPY | | | | | |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 |
| MAELO | IWWKQYLTTLQIVQFVLDLGFYIFCAYTYFAFTYFPWAPNVGKCACTEGAALFGCGLLSS | | | | | |
| I05465 | LWKKYITQGQLVQFVLTIIQTTG-----VFWP-----CSFPLGWLFFQIGYMIS | | | | | |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | |
| | 280 | 290 | 300 | 310 | | |
| MAELO | YLLLFINFYRITYNAKAKAAKERGSNFTPKTVKSGGSPKKPSKSKHIX | | | | | |
| I05465 | LIALFTNFYIQTYNKKGASRRKEHLKGHQNGSVAAVNGHTNSFPSPLENSVKPRKQRKDXQ | | | | | |
| | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 |

Figura 18

1 MGTDQGKTFT WEELAAHNTK DDLLLAIRGR VYDVTKFLSR HPGGVDTLLL
51 GAGRDVTPVF EMYHAFGAAD AIMKKYYVGT LVSNELPIFP EPTVFHKTIK
101 TRVEGYFTDR NIDPKNRPEI WGRYALIFGS LIASYAQLF VPFVVERTWL
151 QVVFAIIMGF ACAQVGLNPL HDASHFSVTH NPTVWKILGA THDFFNQASY
201 LVWVYQHMLG HHPYTNIAGA DPDVSTSEPD VVRIKPNQKW FVNHNQHMF
251 VPFLYGLLAF KVRIQDINIL YFVKTNDAIR VNPISTWHTV MFWGGKAFFV
301 WYRLIVPLQY LPLGKVLLEF TVADMVSSYW LALTFQANHV VEEVQWPLPD
351 ENGIIQKDW A MQVETTQDY AHDSLWTSI TGSLNYQAVH HLPNVSQHH
401 YPDILAIKN TCSEYKVPYL VKDTFWQAF SHLEHLRVLG LRPKEE*

Figura 19

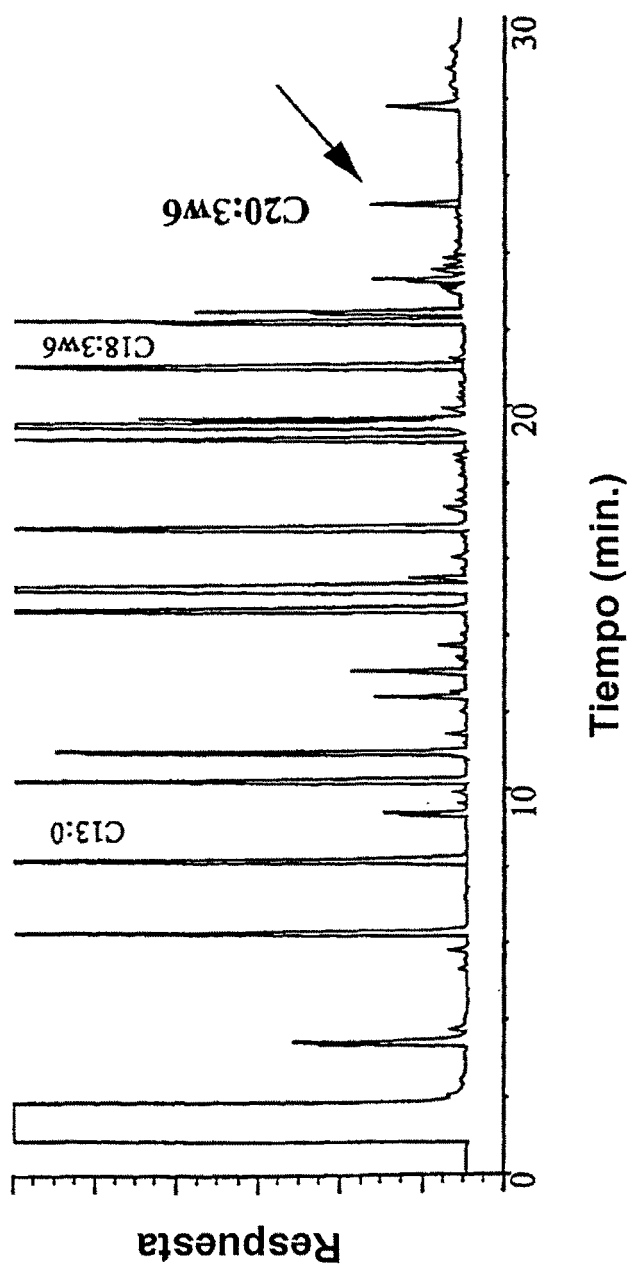


Figura 20

| Anfitrión (plásmido) | 334 (MAD708-2) | 334 (MAD708-10) | 334 (MAD708-18) | 334 (MAD708-19) | 334 (MAD708-30) | 334 (pRAE5) |
|---|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|
| Sustrato añadido | GLA 25 µM | GLA 25 µM | GLA 25 µM | GLA 25 µM | GLA 25 µM | sin sustrato |
| Acido Graso | % total de lípidos | | | | | |
| C16:0 | 14,1 | 14,68 | 14,38 | 15,45 | 14,13 | 13,59 |
| C16:1 | 42,84 | 43,42 | 42,57 | 38,03 | 43,58 | 43,98 |
| C18:0 | 3,19 | 3,28 | 3,63 | 4,08 | 3,37 | 2,04 |
| C18:1n-9 | 17,66 | 19,39 | 19,6 | 20,8 | 20,06 | 10,88 |
| C18:3n-6 | 6,65 | 5,58 | 10,24 | 9,46 | 3,56 | 11,14 |
| C20:0 | 0,26 | 0,3 | 0,32 | 0,4 | 0,46 | 0,57 |
| C20:3n-6 | (46,5%) 6,03 | (41,2%) 3,92 | (8,0%) 0,91 | (21,5%) 2,59 | (49%) 3,43 | (3,4%) 0,24 |
| Lípidos Totales (µg) | 238,47 | 307,86 | 188,51 | 167,31 | 207,47 | 466,65 |
| (% conversión) = producto/(sustrato + producto) | | | | | | |

Figura 21

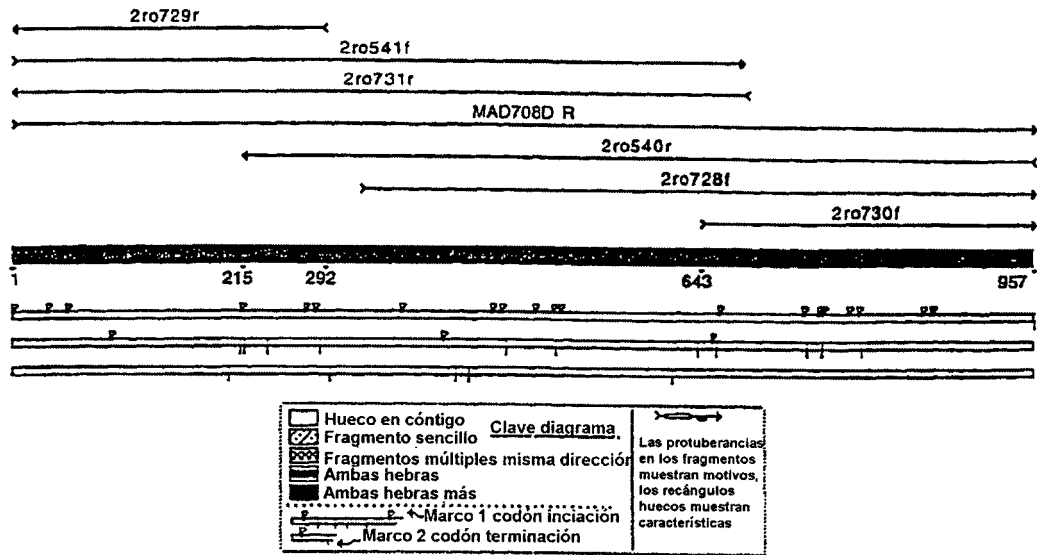


Figura 22

```

1  ATGGAGTCGA TTGCGCCATT CCTCCCATCA AAGATGCCGC AAGATCTGTT
51  TATGGACCTT GCCACCGCTA TCGGTGTCCG GGCCGCGCCC TATGTCGATC
101 CTCTCGAGGC CGCGCTGGTG GCCCAGGCCG AGAAGTACAT CCCACGATT
151 GTCCATCACA CGCGTGGGTT CCTGGTCGCG GTGGAGTCGC CTTTGGCCCG
201 TGAGCTGCCG TTGATGAACC CGTTCACGT GCTGTTGATC GTGCTCGCTT
251 ATTTGGTCAC GGTCTTTGTG GGCATGCAGA TCATGAAGAA CTTTGAGCGG
301 TTCGAGGTCA AGACGTTTTT CCTCCTGCAC AACTTTTGTG TGGTCTCGAT
351 CAGCGCCTAC ATGTGCGGTG GGATCCTGTA CGAGGCTTAT CAGGCCAACT
401 ATGGACTGTT TGAGAACGCT GCTGATCATA CCTTCAAGGG TCTTCCTATG
451 GCCAAGATGA TCTGGCTCTT CTA CTACTTCTCC AAGATCATGG AGTTTGTCTGA
501 CACCATGATC ATGGTCCTCA AGAAGAACAA CCGCCAGATC TCCTTCTTGC
551 ACGTTTACCA CCACAGCTCC ATCTTACCA TCTGGTGGTT GGTCACCTTT
601 GTTGCACCCA ACGGTGAAGC CTA CTACTTCTCT GCTGCGTTGA ACTCGTTCAT
651 CCATGTGATC ATGTACGGCT ACTACTTCTT GTCGGCCTTG GGCTTCAAGC
701 AGGTGTCGTT CATCAAGTTC TACATCACGC GCTCGCAGAT GACACAGTTC
751 TGCATGATGT CGGTCCAGTC TTCCTGGGAC ATGTACGCCA TGAAGGTCCT
801 TGGCCGCCCC GGATACCCCT TCTTCATCAC GGCTCTGCTT TGGTCTTACA
851 TGTGGACCAT GCTCGGTCTC TTCTACA ACT TTTACAGAAA GAACGCCAAG
901 TTGGCCAAGC AGGCCAAGGC CGACGCTGCC AAGGAGAAGG CAAGGAAGTT
951 GCAGTAA

```

Figura 23

1 MESIAPFLPS KMPQDLFMDL ATAIGVRAAP YVDPLEAALV AQAEKYIPTI
51 VHHTRGFLVA VESPLARELP LMNPFVLLI VLAYLVTVFV GMQIMKNFER
101 FEVKTFSLLE NFCLVSISAY MCGGILYEAY QANYGLFENA ADHTFKGLPM
151 AKMIWLFYFS KIMEFVDTMI MVLKKNRQI SFLHVVHSS IFTIWWLVTF
201 VAPNGEAYFS AALNSFIHVI MYGYFELSAL GFRQVSFIKF YITRSQMTQF
251 CMMSVQSSWD MYAMKVLGRP GYPFFITALL WFYMWTMLGL FYNFYRKNK
301 LAKQAKADAA KEKARKLQ*

Figura 24

| | | |
|--|--------------------|----------------|
| Anfitrión (plásmido) | 334 (pRPB2) | 334 (pYES2) |
| Sustrato añadido | GLA 25 μ M | GLA 25 μ M |
| | (n=4) | |
| | | |
| Acido Graso | % total de lípidos | |
| C16:0 | 15,65 | 15,23 |
| C16:1 | 35,2 | 38,59 |
| C18:0 | 5,68 | 5,55 |
| C18:1n-9 | 25,55 | 25,27 |
| C18:3n-6 | 3,1 | 6,75 |
| C20:0 | 0,36 | 0,14 |
| C20:3n-6 | (62,0%) 5,06 | (2,6%) 0,18 |
| Lípidos Totales (μ g) | 314 | 247 |
| (% conversión) = producto/(sustrato + producto) | | |

Figura 25

| A. | | 334 (pRPB2) | 334 (pRPB2) | 334 (pRPB2) | 334 (pRPB2) | 334 (pRPB2) | 334 (pRPB2) |
|----------------------|-------|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Anfitrión (plásmido) | | 334 (pRPB2) | 334 (pRPB2) | 334 (pRPB2) | 334 (pRPB2) | 334 (pRPB2) | 334 (pRPB2) |
| Sustrato añadido | | SA 25 µM | OA 25 µM | IA 25 µM | DGLA 25 µM | AA 25 µM | adrenico |
| | | C18:0 | C18:1n-9 | C18:2n-6 | C20:3n-6 | C20:4n-6 | C22:4n-6 |
| Acido Graso | | % total de lípidos | | | | | |
| C16:0 | 15,07 | 14,52 | 15,74 | 15,69 | 16,06 | 15,15 | 15,15 |
| C16:1 | 33,7 | 32,37 | 32,23 | 25,65 | 33,65 | 33,39 | 33,39 |
| C18:0 | *9,78 | 5,83 | 5,61 | 8,33 | 4,52 | 5,35 | 5,35 |
| C18:1n-9 | 31,2 | *37,25 | 26,05 | 20,15 | 24,54 | 28,54 | 28,54 |
| C18:2n-6 | | | *10,4 | | | | |
| C18:3n-6 | | | | | | | |
| C20:2n-6 | | | 0,29 | | | | |
| C20:3n-6 | | | | *16,5 | | | |
| C20:4n-6 | | | | 0,27 | *11,7 | | |
| C22:4n-6 | | | | | | *7,46 | |
| Lípidos Totales (µg) | 132 | 130 | 171 | 55 | 225 | 163 | |

Figura 25

B.

| Anfitrión (plásmido) | 334 (pRPB2) | 334 (pRPB2) | 334 (pRPB2) |
|---|--------------------|-------------|-------------|
| Sustrato añadido | ALA 25 µM | STA 25 µM | EPA 25 µM |
| | C18:3n-3 | C18:4n-3 | C20:5n-3 |
| | % total de lípidos | | |
| Acido Graso | | | |
| C16:0 | 17,32 | 16,01 | 20,67 |
| C16:1 | 27,68 | 34,31 | 50,7 |
| C18:0 | 6,75 | 5,39 | 6,14 |
| C18:1n-9 | 28,4 | 28,54 | |
| C18:3n-3 | *8,39 | | |
| C18:4n-3 | | *1,95 | |
| C20:4n-3 | | (73,2%) | |
| | | 5,33 | |
| C20:5n-3 | | | *10,33 |
| C22:5n-3 | | | 0,25 |
| Lípidos Totales (µg) | 114 | 199 | 201 |
| * indica sustrato añadido | | | |
| (% conversión) = producto/(sustrato+producto) | | | |

Figura 26

A.

| Anfitrión (plásmido) | 334 (PRPB2+PRPE31) | 334 (pYES2+pYX242) |
|----------------------------|--------------------|--------------------|
| Sustrato añadido | GLA 25 µM | GLA 25 µM |
| Acido Graso | % total de lípidos | |
| C16:0 | 15,54 | 18,26 |
| C16:1 | 30,16 | 33,51 |
| C18:0 | 8,76 | 5,58 |
| C18:1n-9 | 27 | 27,37 |
| C18:3n-6 | *2,69 | *5,6 |
| C20:0 | 0,4 | 0,32 |
| C20:3n-6 | (57,4%) | 3,55 (2,9%) |
| C20:4n-6 | (27,6%) | 1,32 ND |
| Lípidos Totales (µg) | 254 | 258 |

Figura 26

B.

| Anfitrión (plásmido) | 334 (PRPB2+PRPE31) | 334 (pYES2+pYX242) |
|---|--------------------|--------------------|
| Sustrato añadido | STA 25 µM | STA 25 µM |
| Acido Graso | % total de lípidos | |
| C16:0 | 18 | 16,4 |
| C16:1 | 28,37 | 34,78 |
| C18:0 | 7,42 | 5,71 |
| C18:1n-9 | 26,44 | 30,15 |
| C18:4n-3 | *2,93 | *4,57 |
| C20:0 | 0,25 | 0,17 |
| C20:4n-3 | 4,13 | 0,32 |
| C20:5n-3 | (39%) 1,87 | (2,1%) 0,10 |
| Lípidos Totales (µg) | 257 | 304 |
| * Indica sustrato añadido (% conversión) = producto/(sustrato+producto) | | |

Figura 27

PUNTUACIONES Init1: 114 Initn: 278 Opt: 278
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN : 308; 30.9% identidad en un solapamiento de 259 aa

```

    40      50      60      70      80      90      99
GLELO    VAQAEKYIPTIVHHTRGFLVAVESPLARELPLMPPHVLIVLAXLVTVFVGMQIMKNYF
           || : : | : ::|:|:| | |||: :
MAELO    GIKLDTYFAQAYELVTGKSIDSFVFOEGVTPLSQREVAMWTTITTFVVIFFGGRQIMKSQD
           20      30      40      50      60      70

    100     110     120     130     140     150
GLELO    RFEVKTFSLLENFCLVSI SAYMCGGILYE--AYQANYGLPENAADEHTFKGLPMKMIWLF
           |::| : :||| | : | : : : | ||| | : : : |
MAELO    AFELKPLF ILHNFLLITLASSLLELLFIENLVPILARNGLFYAICDDGAWTORLELLYTLN
           80      90      100     110     120     130

    160     170     180     190     200     210
GLELO    YPSKIMEFVDTMIMVLRKNNRQISFLEVYHSSIFTIWWLVTFVAFNGEAYFSAALNSFI
           | : | | : :| : :||| | : : ||| : || : : : | : : : : : | : | :
MAELO    YLVKYWELADTVFLVLKK--KPLEFLHYFHS--MTMVLCFVOLGGYTSVSWVPITLNLTV
           140     150     160     170     180     190

    220     230     240     250                               260
GLELO    HVIMYGYFLSALGFRQVSFIKFIYITRSQMTQF-----CMMSVQS---SWDHYAM
           ||:| | | : | | | : : | | : | | | | : : | : : : | : :
MAELO    HVFMYYYMRSAAAGVRI--WVKOYLTLQIVQFVLDLGLFIYFCAYTYFAFTYFPWAPNVG
           200     210     220     230     240     250

    270     280     290     300     310
GLELO    KVLGRPGYPFFITALLWFYMWMLGLEFYNFYRKNAKLAKAKADAAKEKARKLQ
           | | | : | :| | : | | | | | : : | | | | | : :
MAELO    KCAGTEGAALFGCGLLSSYLL----LFINFYR----ITYNAKAKAAKERGSNFTPKTVKS
           260     270     280     290     300

MAELO    GGSFKKPSKSKHIX
           310
    
```


Figura 29

PUNTUACIONES Init1: 83 Initn: 186 Opt: 271
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN : 297; 28.5% identidad en un solapamiento de 242 aa

```

    30      40      50      60      70      80
MAELO  YELVTGKSIDSFVQEGVTP LSTQREVAMWTITYFVVIFGGRQIMKSQDAFKLKLPLFILH
HS1    STYFKALLGPRDTRVKGWFLLDNYIPTFICSVIYLLIVWLGPKYMRNKQPFSCRGILVVY
    10      20      30      40      50      60

    90      100     110     120     130     140
MAELO  NFLTIIASGSLLLFIENLVPILARNGLFYAICDDGAWTORLELLYYL--NYLVKYWELA
HS1    NLGLTLLS---LYMFCELVGTGVWEGKYNFFCQGTTRTAGESDMKIIRVLWVWYFSLIEFM
    70      80      90      100     110     120

    150     160     170     180     190     200
MAELO  DTVFLVLKK--KPLEFLHYFHH-SMTMVLFCFVQLGGYTSVSWVPEITLNLTVHVFMYYYY-
HS1    DTFEFLRKNNHQITVLHVYHASMNIWVPMNWVPCGHSYFGATLNSFIHVLMSYYG
    130     140     150     160     170     180

    210     220     230     240     250     260
MAELO  MRSAGVR--IWWKQYLTTLQIVQFVLDLGFYFCAYTYFAFTYFPWAPNVGKCAGTEGA
HS1    LSSVPSMRPYLWKKYITQGQLLQFVLTIIQTSCGVI-----W-P----CTFPLGW
    190     200     210     220

    270     280     290     300     310
MAELO  ALFGCGLLSSYLLLFINFYRITYNAKAKAAKERGSNFTPKTVKSGGSPKPKSKSCHI
HS1    LYFQIGYMISLIALFTNFYIQTYNKKGASRRKDHLKDHQNGSMAAVNGHTNSFSPLENNV
    240     250     260     270     280     290

HS1    KPRKLRDX
    300
    
```

Figura 30

PUNTUACIONES Init1: 88 Initn: 208 Opt: 272
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN : 279; 28,2% identidad en un solapamiento de 266 aa

```

    30      40      50      60      70      80
MAELO  QAYELVTGKSIDSFVFEQGVTPPLSTQREVAMWTITYFVVIFGGROIIMKSQDAFKLKPLFI
HS2    VNLVQEVMKHADPRIQGYPLMGSPLLMTSILLTYVYFVLSLGER-IMANRKPFLRGFMI
        10      20      30      40      50      60

    90      100     110     120     130     140
MAELO  LHNELLTIASGSLLLLFIEIEN--LVPILAR-NGLFYAICDDGAWIQRLELLYYLNYLVKYW
HS2    VYNFSLVALSLYIVYEFILMSGWLSITYTWRCDFVDVSNSSPEALRMVRVAWLFLFS---KFI
        70      80      90      100     110     120

    150     160     170     180     190
MAELO  ELADIVFLVLKKK--PLEFLHYFHHSMT---MVLCFVQLGGYTSVSWVPITLNLTVHVF
HS2    ELMDTVIFILRKKDQGVIFLHVFHHSVLPWSWWWGVKIAPGGMGSFHAM---INSSVHVI
        130     140     150     160     170

    200     210     220     230     240
MAELO  MYYYYMRSAAAGV---RIWVKQYLTTLQIVQFVL---DLGFIYF---CAYTYFAFTYFPW
HS2    MYLYYGLSAPGPVAQPYLWVKHMTAIQLIQFVLVSLHISQYYFMSSCNYQYPVIIDLITW
        180     190     200     210     220     230

    250     260     270     280     290     300
MAELO  APNVGKCAAGTEGAALFCGLLSYLLLFINFYRITYNAKAKAAKERGSNFTPKTVKSGGS
HS2    -----MYG-----TIFFMLFSNFWYHSYTKGKRLPRALQONGAPGIKVKAN
        240     250     260     270

    310
MAELO  PKKPSKSKHI

HS2    X
        280
    
```

Figura 31

PUNTUACIONES Init1: 88 Initn: 207 Opt: 223
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN : 236; 30,4% identidad en un solapamiento de 191 aa

```

    100      110      120      130      140      150
MAELO      LLLLF IENLV P I L A R N G L F Y A I C D D G A W T Q R L E L L Y L N Y L V K Y W E L A D T V F L V L K K K P -
           | : : : | : | | | | | | : : : | : |
MM2        I V Y E F L M S G W L S T Y T W R C D P I D F S N S P E A L R M V R V A W L F M L S K V I E L M D T V I F I L R K K D G
           20      30      40      50      60      70

    160      170      180      190      200      209
MAELO      - L E F L H Y F H H S M I M V L C F - - - V Q L G G Y T S V S W V P I T L N L T V H V F M Y Y Y Y M R S A A G V - - -
           : | | | | | | : : : | : | : : | : | | | | | | | | | | | |
MM2        Q V T F L H V F H H S V L P W S W W G I K L A P G G M G S F H A M - - - I N S S V H V V M Y L Y Y G L S A L G P V A Q
           80      90      100      110      120      130

    210      220      230      240      250      260
MAELO      - R I W W K Q Y L T T L Q I V Q F V L - - - D L G F I Y F - - - C A Y T V F A F T Y F P W A P N V G K C A G T E G A A L
           : | | | : : : | : : | | | | : : | | | | : : : |
MM2        P Y L W W K K H M T A I Q L I Q F V L V S L H I S Q Y Y F M P S C N Y Q Y P V I I H L I W - - - - - - - - - - - - - - - M
           140      150      160      170

    270      280      290      300      310
MAELO      F G C G L L S S Y L L L F I N F Y R I T Y N A K A K A K E R G S N F T P K T V K S G G S P I K P S K S K H I
           : | : : : | | | : : : : : : : : : | : | | : |
MM2        Y G - - - T I F F I L F S N F W Y H S Y T K G K R L P R A V Q Q N G A P A T T K V K A N
           180      190      200      210
    
```

Figura 34

PUNTUACIONES Init1: 316 Initn: 384 Opt: 477
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN : 477; 34,2% identidad en un solapamiento de 240 aa

| | | | | | | | |
|-------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | |
| GLELO | AQAKEYIPTIVHHTRGFLVAVESPLARELPLMNPFFHVLLIVLAYLVTVFVGMQIMKNFER | | | | | | |
| HS1 | MEHFDASLSTYFKALLGPRDTRVKGWFLLDNYIPTFICSVIYLLIVWLGPKYMRNKQP | | | | | | |
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | | |
| | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 159 | |
| GLELO | FEVKTFSLLNHFCLVSI SAYMCGGILYEAYQANYGLF-ENAADHTFKGLPMAKMIWLFYF | | | | | | |
| HS1 | FSCRGILVVYNLGLTLLSLYMFCELVTVGWEGKYNFFCQGTRTAGESDMKIIRVLWVWYF | | | | | | |
| | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | |
| | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 219 |
| GLELO | SKIMEFVDTMIMVLKKNRQISFLHVVYHSSIFTIWWLVTVPAPNGEAYFSAALNSFIHV | | | | | | |
| HS1 | SKLIEFMDTFFFILRKNNHQITVLHVVYHASMLNIWVFMNWWVPCGHSYFGATLNSFIHV | | | | | | |
| | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | |
| | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | |
| GLELO | IMYGYFSLSAL-GFKQVSFIKFIYITRSQMTQFCMMSVQSSWDMYAMKVLGRPGYPPFFITA | | | | | | |
| HS1 | LMYSYYGLSSVPSMRPYLWKKYITQGQLLQFVLTIIQTS-----CGVIWPCTFFLGWLY | | | | | | |
| | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | |
| | 280 | 290 | 300 | 310 | | | |
| GLELO | LLWFYMWTMLGLFYNFYRK--NAKLAKQAKADAAKEKARKLQ | | | | | | |
| HS1 | FQIGYMISLIALFTNFYIQTYNKKGASRRKDHLDKDHQNGSMAAVNGHTNSFSPLENNVKP | | | | | | |
| | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | |

Figura 35

PUNTUACIONES Init1: 80 Initn: 114 Opt: 178
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN : 178; 28,8% identidad en un solapamiento de 146 aa

| | | | | | | |
|----------|---|-----|-----|-----|---------------------------------|-----|
| | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 |
| GLELO | FENAADHTFKGLPMAKMIWLFYFSKIMEFVDTMIMVLKKNRQISFLHVYHSSIFTIWW | | | | | |
| AC004050 | | | | | DTIFIIILRK--QKLIFLHWYHHITVLLYSW | |
| | | | | 10 | 20 | |
| | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 |
| GLELO | LVT FVAPNGEAYFSAALNSFIHVIMYGYFLSALGFKQVSFIKFIYITRSQMTQFCMMSVO | | | | | |
| AC004050 | YSYKDMVAGGGWF-MTMNYGVHAVMYSYYALRAAGFRVSRKFAMFITLSQITOMLMGCVV | | | | | |
| | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 |
| | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | 310 |
| GLELO | SSWDMYAMKVLGRPGYPFFITALLW--FYMWTMLGLFYNFYRKN--AKLAKQAKADAAKE | | | | | |
| AC004050 | NYLVFCWMQ--HDQCHSHF-QNIFWSSLMYLSYLVLFCHFFFEAYIGKMRKTTKAEK | | | | | |
| | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 |
| GLELO | KARKLQ | | | | | |

Figura 36

PUNTUACIONES Init1: 288 Initn: 288 Opt: 399
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN : 399: 34,6% identidad en un solapamiento de 211 aa

| | | | | | | |
|-------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 |
| GLELO | LLIVLAYLVTVFVGMQIMKNFERFEVKTFSLLNFLVSI S AY MCGGILYEAYQANYGLF | | | | | |
| MM2 | ::: : : : : : : | | | | | |
| | | | | 10 | 20 | 30 |
| | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 |
| GLELO | ENAAD--HTFKGLPMAKMIWLFYFSKIMEFVDTMIMVLKKNRQISFLHVYHHSSIFTIW | | | | | |
| MM2 | : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : | | | | | |
| | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
| | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 |
| GLELO | WLVTFVAPNGEAYFSAALNSFIHVIMYGYFLSALGFKQVSFI--KFYITRSQMTQFCMM | | | | | |
| MM2 | : : : : : : : : : : : : : : : : : : | | | | | |
| | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
| | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | 309 |
| GLELO | SVQSSWDMYAMKVLGRPGYPFFITALLWFYMWMLGLFYNF----YRKNAKLAKQAKADA | | | | | |
| MM2 | : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : | | | | | |
| | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | |
| | 310 | | | | | |
| GLELO | AKEKARKLQ | | | | | |
| MM2 | | | | | | |
| | | | | | | |
| MM2 | APATTKVKAN | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | 210 |

Figura 37

PUNTUACIONES Init1: 160 Initn: 227 Opt: 269
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN : 269; 35,3% identidad en un solapamiento de 119 aa

| | | | | | | |
|----------|--|-----------------|-----------|-----------|-------------|-----------|
| | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| GLELO | PTIVHHTRGFLVAVESPLARELPLMNPFFVLLIVLAVLVTVFVGMQIMKNFERFEVKTFS | | | | | |
| | | | | | :::: ::: : | : : : |
| AI225632 | NEVNAFLDNMFGPRDSRVGWFLDLSYLPFFILTITYLLSIWLGKYMKNRPALSLRGIL | | | | | |
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 |
| GLELO | LLHNFCLVSI SAYMCGGILYEAYQANYGLFENAADHTFKG-LPMK-MIWLFFYSKIMEF | | | | | |
| | : : : : | : : : : : | : - : : | : : : : | : : : | : : : |
| AI225632 | TLYNLAITLLSAYMLVELILSSWEGGYNLQCNLDSAGEGDVVRVAKVLVW-YYFSKLVEF | | | | | |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 |
| GLELO | VDTMIMVLKGNRQISFLHVYHSSIFTIWLVTFVAPNGEAYFSAALNSFIHVIMYGY | | | | | |
| | : : : : | : : : | | | | |
| AI225632 | LDTIFFVLRKANQITFLHVYHASMFINI | | | | | |
| | 130 | 140 | 150 | | | |

Figura 38

PUNTUACIONES Init1: 64 Initn: 129 Opt: 233
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN : 239; 23,7% Identidad en un solapamiento de 279 aa

```

                20      30      40      50      60      70
GLELO      FMDLATAIGVRAAPYVDPLEAALVAQAKEYIPTIVHHTRGFLVAVESPLAREL-----PL
                : | : : : | : : : | | : | :
U97107      MDTSMNFSRGLKMDLMQPYDFETFQDLRPF
                10      20      30

                80      90      100     110     120     129
GLELO      MNPFHV--LLIVLAYLVTVFVGMQIMKNFERFEVKTFSLLHNFLVSIISAYMCGGILYEA
                : : | : ||| : || : : || : | : : | : : : | : | : | : | : :
U97107      LEEYWVSSFLIVVVYLLLIIVVGQTYMRTRKSFSLQRPLILWSFFLAIFS--ILGTLRMWK
                40      50      60      70      80

    130      140      150      160      170      180
GLELO      YQAN----YGLFENAADHTFKGLPMAKMIW--LFYFSKIMEFVDTMIMVLKKNRQISFL
                : : | : || : : : : : : | | : || : : | : | : : | : | : | :
U97107      FMATVMFTVGLKQTVCFAIYTDVAVRF-WSFLFLSKVVELGDTAFIILRK--RPLIFV
                90      100     110     120     130     140

                190     200     210     220     230     240
GLELO      HVYHSSI--FTIWLVTFVAPNGEAYFSAALNSFIHVIMYGYVFLSALGPKQVSVFIKPY
                | ||| : : | | : : | | : : : | : | : | | | : : | : : : :
U97107      HWYHSTVLLFTSFGYKNKV-PSGGWFMT--MNEGVHSVMTYTYTMKAALKHPNLLPMV
                150     160     170     180     190     200

                250     260     270     280     290
GLELO      ITRSQMTQFCMMSVQSSWDMYAMKVLG--RPGYPFFITALLWFYMWYMLGLFYN--FYRK
                || | : | : : : : : : | | : : | : : : : | : : : |
U97107      ITSLOILQMVLGTIFGILNYIWRQEKGCHTTTEHFFWSFMLYGTYFILFAHFFHRAYLRP
                210     220     230     240     250     260

    300      310
GLELO      NAKLAKQAKADAAKEKARKLQ
                : : | : : : :
U97107      KGKVASKSQ
                270
    
```

Figura 39

PUNTUACIONES Init1: 100 Initn: 205 Opt: 271
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN : 271; 30,7% identidad en un solapamiento de 218 aa

| | | | | | | |
|------------|---|------------------------|----------------------------------|-------------|-----|-----|
| | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 |
| GLELO | TRGFLVAVESPLARELPLMNP | FHVLLIVLAYLVTVFVGMQIMK | KNFERFEVKTFSLLHNFC | | | |
| | | | | : : | : : | : : |
| U68749 | ATHGPKNFPDAEGRKFFADHF | DVTIQASILYMVVVF | GTKWFMRNRQPFQ | LTIPLNIWNFI | | |
| (F56H11.4) | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 |
| | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | |
| GLELO | LVSISAYMCGGILYEAYQ-- | ANYGL--- | FENAADHTFKGLPMAKMIWLFYFSKIMEFVDT | | | |
| | ::: | : : | : | : : | : : | : : |
| U68749 | LAAFSIAGAVKMTPEFFGTIANKGIVASYCKVDFDT-KG-ENGYWVWLFMASKLP | FELVDT | | | | |
| (F56H11.4) | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 |
| | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 |
| GLELO | MIMVLKKNRQISFLHVYHSSIFTIWWLVTFVAPNGEAYFSAALNSFIHVIMYGYF | LS | | | | |
| | ::: : | : | : | : : | : : | : : |
| U68749 | IFLVLRK--RPLMFLHWYHHILTMIYAWYSHPLTP-GFNRYGIYLNFFVHAFMYSY | FLR | | | | |
| (F56H11.4) | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | |
| | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 |
| GLELO | ALGFKQVSFIKFIYITRSQMTQFCMMSVQSSWDMYAMKVLGRP-GYPFFITALLWFY | MWTM | | | | |
| | ::: : | : | : | : : | : : | : : |
| U68749 | SMKIRVPGFIAQAITSLQIVQFIISCAVLAHLGYLMHFTNANCDFEP | SVFKLAVFMDTTY | | | | |
| (F56H11.4) | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 |
| | 290 | 300 | 310 | | | |
| GLELO | LGLFYNFYRKNAKLAKQAKADA | AKEKARKLQ | | | | |
| | : | : | | | | |
| U68749 | LALFVNFFLQSYVLRGGKDKYKAVPKKKNN | | | | | |
| (F56H11.4) | 260 | 270 | 280 | | | |

Figura 41

PUNTUACIONES Init1: 77 Initn: 155 Opt: 264
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN : 264; 27,2% identidad en un solapamiento de 206 aa

| | | | | | | |
|-------|---|---------|-----|----------|-------------|-----|
| | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
| GLELO | AALVAQAKEYIPTIVVHHTRGFLVAVESPLARELPLMNPFHVLLIVLAYLVTVFVGMQIMK | | | | | |
| | | | | : : | ::: ::: : | |
| DM1 | PTKMINMDISVTPNYSYIFDFENDFIHQRTKRWLENWTWVFFYYCGIYMLVIFGGQHFMQ | | | | | |
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| | | | | | | |
| | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
| GLELO | NPERFEVKTFSLHNFCLVSI SAYMCGGILYEAYQA--NYGLFENAADHTF--KGLPMAK | | | | | |
| | ::: : | : : | : : | : : | : ::: : | : : |
| DM1 | NRPRFQLRGPLIIWNTLLAMFSINGAARTAPELIHVLRRHYGLFHSVCVPSYIEQDRVCGF | | | | | |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| | | | | | | |
| | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 |
| GLELO | MIWLFYFSKIMEFVDTMIMVLKKNRQISFLHVYHSSIFTIWWLVTFVAPNGEAYFSAA | | | | | |
| | : : : | ::: : : | : : | ::: : | : : | : : |
| DM1 | WTWLFVLSKLPGLDTIFIVLRK--QPLIFLHWYHHITVLIYSWF--SYTEYTSSARWFIV | | | | | |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| | | | | | | |
| | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 |
| GLELO | LNSFIHVIMYGYFLSALGFKQVFSIKFYITRSQMTQFCMMSVQSSWDMYAMKVLGRPGY | | | | | |
| | : : : : : | : : | :: | : : : : | : : | |
| DM1 | MNYCVHSMYSYALKAAEFNPPRFISMIIITSLQLAQMIIGCAINWANGFLKTHGTXS | | | | | |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| | | | | | | |
| | 280 | 290 | 300 | 310 | | |
| GLELO | PFFITALLWFYMTMLGLFYNFYRKNKAKLAKQAKADAAKEKARKLQ | | | | | |
| DM1 | HISQRNINLSIAMYSYFVLFARFFYKAYLAPGGHKSRMA | | | | | |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | | |

ES 2 306 523 T3

Figura 42

PUNTUACIONES Init1: 181 Initn: 279 Opt: 328
 PUNTUACIÓN SMITH-WATERMAN : 328; 30,0% identidad en un solapamiento de 237 aa

| | | | | | | |
|-------|---|---------|-------|-------|-------|-------|
| | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
| MAELO | VTGKSIDSFVFQEGVTPPLSTQREVAMWTITYFVVIFGGRQIMKSQDAFKLKPLFILHNFL | | | | | |
| | | | | :: | :: :: | :: |
| DM1 | IFDFENDFIHQTRKWMLNWTWVFFYCGIYMLVIFGGQHFMRPRFQLRGPLIHWNTL | | | | | |
| | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 |
| | | | | | | |
| | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 149 |
| MAELO | LTIASGSLLLLFIENLVPILARNGLFYAICDDGAWTQ-RLELLY-YLNVLVKYWELADTV | | | | | |
| | :: | : : : | : : : | : : : | : : : | : : : |
| DM1 | LAMFSIMGAARTAPELIHVLRHYGLFHSVCVPSYIEQDRVCGFWTWLFLVLSKLPGLGDTI | | | | | |
| | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 |
| | | | | | | |
| | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| MAELO | FLVLKKKPLEFLHYFHHSMTMVLCFVQLGGYTS-VSWVPITLNLTVHVFMYYYYMRSAAAG | | | | | |
| | : : : : | : : : : | : : : | : : : | : : : | : : : |
| DM1 | FIVLRKQPLIFLHWYHHITVLIYSWFSYTEYTSARWF-IVMNYCVHSVMYSYALKAAAR | | | | | |
| | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| | | | | | | |
| | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 |
| MAELO | VRI--WWKQYLTTLQIVQFVLDLGFYFCAYTYFAFTYFPWAPNVGKCAGTEGAALFGCG | | | | | |
| | : : : | : : : | : : : | : : : | : : : | : : : |
| DM1 | FNPPRFISMIITSLQLAQMIIIG-----CAINVWANGFLK-THGTXSCHISQRNINLSIA | | | | | |
| | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | |
| | | | | | | |
| | 270 | 280 | 290 | 300 | 310 | |
| MAELO | LLSSYLLLFINFYRITYNAKAKAAKERSNFTPKTVKSGGSPKKPSKSKHI | | | | | |
| | : : : : | : : : | : : : | : : : | : : : | |
| DM1 | MYSSYFVLFARFFYKAYLAPGGHKSRRMA | | | | | |
| | 260 | 270 | 280 | | | |

Figura 43

```

1  ATGGAACATT TTGATGCATC ACTTAGTACC TATTTCAAGG CATTGCTAGG
51  CCCTCGAGAT ACTAGAGTAA AAGGATGGTT TCTTCTGGAC AATTATATAC
101 CCACATTTAT CTGCTCTGTC ATATATTTAC TAATTGTATG GCTGGGACCA
151 AAATACATGA GGAATAACA GCCATTCTCT TGCCGGGGGA TTTTAGTGGT
201 GTATAACCTT GGACTCACAC TGCTGTCTCT GTATATGTTT TGTGAGTTAG
251 TAACAGGAGT ATGGGAAGGC AAATACAAC TCTTCTGTCA GGGCACACGC
301 ACCGCAGGAG AATCAGATAT GAAGATTATC CGTGTCTCTT GGTGGTACTA
351 CTCTCCEAAA CTCATAGAAT TTATGGACAC TTTCTTCTTC ATCCTGCGCA
401 AGAACAAACCA CCAGATCACG GTCCTGCACG TCTACCACCA TGCCTCGATG
451 CTGAACATCT GGTGGTTTGT GATGAACTGG GTCCCCTGCG GCCACTCTTA
501 TTTTGGTGCC AACTTAATA GCTTCATCCA CGTCCTCATG TACTCTTACT
551 ATGGTTTGTC GTCAGTCCCCT TCCATGCGTC CATACTCTG GTGGAAGAAG
601 TACATCACTC AGGGGCAGCT GCTTCAGTTT GTGCTGACAA TCATCCAGAC
651 CAGCTGCGGG GTCATCTGGC CGTGCACATT CCCTCTTGGT TGGTTGTATT
701 TCCAGATTGG ATACATGATT TCCCTGATTG CTCTCTTAC AAACCTTCTAC
751 ATTCAGACCT ACAACAAGAA AGGGGCCTCC CGAAGGAAAG ACCACCTGAA
801 GGACCACCAG AATGGGTCCA TGGCTGCTGT GAATGGACAC ACCAACAGCT
851 TTTCACCCCT GGAAAACAAT GTGAAGCCAA GGAAGCTGCG GAAGGATTGA
901 AGTCAAAGAA TTGA

```

Figura 44

1 MEHFDASLST YFKALLGPRD TRVKGWFLD NYIPTFICSV IYLLIVWLGP
51 KYMRNKQPFS CRGILVVYNL GLTLLSLYMF CELVTGVWEG KYNFFCQGR
101 TAGESDMKII RVLWWYFSK LIEFMDTFFF ILRKNNHQIT VLHVYHASM
151 LNIWVFMNW VPCGHSYFGA TLNSFIHVLN YSYYGLSSVP SMRPYLWKK
201 YITQGQLLQF VLTIIQTSCG VIWPCTFPLG WLYFQIGYMI SLIALFTNFY
251 IQTYNKKGAS RRDHLKDHQ NGSMAAVNGH TNSFSPLENN VKPRKLRKD*

Figura 45

| Anfitrion (plásmido) | 334 (pYX242) | 334 (pRAE-58-A1) | 334 (pYX242) | 334 (pRAE-58-A1) |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Sustrato añadido | GLA 25 µM | GLA 25 µM | AA 25 µM | AA 25 µM |
| Acido Graso | % total ácido graso | % total ácido graso | % total ácido graso | % total ácido graso |
| C18:3n-6 | 4,40 | 2,71 | 0,03 | 0,04 |
| C20:3n-6 | 0,09 | (50,34%) 2,75 | 0,02 | 0,02 |
| C20:4n-6 | | | 7,84 | 3,97 |
| C22:4n-6 | | | ND | (23,37%) * 1,21 |
| C16:1n-7 | 41,11 | 34,72 | 41,49 | 35,07 |
| C18:1n-7 | 1,85 | 11,33 | 2,01 | 11,57 |
| C20:1n-7 | 0,04 | 1,48 | 0,04 | 1,62 |
| C18:1n-9 | 15,60 | 15,66 | 15,16 | 14,57 |
| C20:1n-9 | 0,06 | 0,22 | 0,06 | 0,23 |
| C18:1n-5 | 0,11 | 0,62 | 0,12 | 0,58 |
| Lípidos Totales | 370 | 969 | 359 | 514 |
| *% conversión = producto/(sustrato+ producto) | | | | |

Figura 46

```

1  ATGGCTCAGC ATCCGCTCGT TCAACGGCTT CTCGATGTCA AATTCGACAC
51  GAAACGATTT GTGGCTATTG CTAATCATGG GCCAAAGAAT TTCCCTGACG
101 CAGAAGGTCG CAAGTTCTTT GCTGATCACT TTGATGTTAC TATTCAGGCT
151 TCAATCCTGT ACATGGTCGT TGTGTTGCGA ACAAATGGT TCATGCGTAA
201 TCGTCAACCA TTCCAATTGA CTATTCCACT CAACATCTGG AATTTTCATCC
251 TCGCCGCATT TTCCATCGCA GGAGCTGTCA AAATGACCCC AGAGTTCTTT
301 GGAACCATTT CCAACAAAGG AATTGTCGCA TCCTACTGCA AAGTGTTTGA
351 TTTCACGAAA GGAGAGAATG GATACTGGGT GTGGCTCTTC ATGGCTTCCA
401 AACTTTTCGA ACTTGTGAC ACCATCTTCT TGGTCTCCG TAAACGTCCA
451 CTCATGTTCC TTCACTGGTA TCACCATATT CTCACCATGA TCTACGCCTG
501 GTACTCTCAT CCATTGACCC CAGGATTCAA CAGATACGGA ATTTATCTTA
551 ACTTTGTCGT CCACGCCTTC ATGTACTCTT ACTACTTCCT TCGCTCGATG
601 AAGATTCGCG TGCCAGGATT CATCGCCCAA GCTATCACAT CTCTTCAAAT
651 CGTTCAATTC ATCATCTCTT GCGCCGTTCT TGCTCATCTT GGTTATCTCA
701 TGCATTCAC CAATGCCAAC TGTGATTTG AGCCATCAGT ATTCAGCTC
751 GCAGTTTCA TGGACACAAC ATACTTGGCT CTMTTCGTCA ACTTCTTCCT
801 CCAATCATAT GTTCTCCGCG GAGGAAAAGA CAAGTACAAG GCAGTGCCAA
851 AGAAGAAGAA CAACTAA

```

Figura 47

1 MAQHPLVQRL LDVKFDTKRF VAIATHGPKN FPDAEGRKFF ADHFDVTIQA
51 SILYMVVVFG TKWFMRNRQP FQTIPLNIW NFILAAFSIA GAVKMTPEFF
101 GTIANKGIVA SYCKVFDFTK GENGYWWLF MASKLFELVD TIFLVLKRP
151 LMFLHWYHHI LTMIYAWYSH PLTPGFNRYG IYLNFFVHAF MYSYYFLRSM
201 KIRVPGFIAQ AITSLQIVQF IISCAVLAHL GYLMHFTNAN CDFEPSVFKL
251 AVFMDTTYLA LFNFFLQSY VLRGGKDKYK AVPKKKNN

Figura 48

| Anfitrión (plásmido) | 334 (pYX242) | 334 (pRET-21) | 334 (pRET-22) |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Sustrato añadido | GLA 50 μ M + AA 50 μ M | GLA 50 μ M + AA 50 μ M | GLA 50 μ M + AA 50 μ M |
| Acido Graso | % total ácido graso | % total ácido graso | % total ácido graso |
| C16:0 | 9,22 | 12,46 | 9,9 |
| C16:1 | 0,09 | 0,18 | 0,13 |
| C18:0 | 1,46 | 2,41 | 1,49 |
| C18:1n-9 | 4,03 | 4,92 | 3,91 |
| C16:3n-6 | 10,02 | 11,89 | 8,69 |
| C20:3n-6 | (1,28%)* 0,13 | (11,1%)* 1,48 | (19,4%)* 2,09 |
| C20:4n-6 | 46,98 | 28,87 | 32,25 |
| C22:4n-6 | 0 | 0 | 0 |
| Lípidos Totales (mg) | 212 | 174 | 187 |
| *% conversión = producto/(sustrato+ producto) | | | |

Figura 49

```

 1 ATGAACATGT CAGTGTTGAC TTTACAAGAA TATGAATTCG AAAAGCAGTT
51 CAACGAGAAT GAAGCCATCC AATGGATGCA GGAAAAC TGG AAGAAATCTT
101 TCCTGTTTTTC TGCTCTGTAT GCTGCCTTTA TATTCGGTGG TCGGCACCTA
151 ATGAATAAAC GAGCAAAGTT TGAAC TGAGG AAGCCATTAG TGCTCTGGTC
201 TCTGACCCTT GCAGTCTTCA GTATATTCGG TGCTCTTCGA ACTGGTGCCTT
251 ATATGGTGTA CATTTTGATG ACCAAAGGCC TGAAGCAGTC AGTTTGTGAC
301 CAGGGTTTTT ACAATGGACC TGTGAGCAA TTCTGGGCTT ATGCATTTGT
351 GCTAAGCAA GCACCCGAAC TAGGAGATAC AATATTCATT ATTCTGAGGA
401 AGCAGAAGCT GATCTTCCTG CACTGGTATC ACCACATCAC TGTGCTCCTG
451 TACTCTGGT ACTCCTACAA AGACATGGT GCCGGGGGAG GTTGGTTCAT
501 GACTATGAAC TATGGCGTGC ACGCCGTGAT GTACTCTTAC TATGCCTTGC
551 GGGCGGCAGG TTTCCGAGTC TCCCGGAAGT TTGCCATGTT CATCACCTTG
601 TCCCAGATCA CTCAGATGCT GATGGGCTGT GTGGTAACT ACCTGGTCTT
651 CTGCTGGATG CAGCATGACC AGTGTCACT TCACTTTCAG AACATCTTCT
701 GGTCTCACT CATGTACCTC AGCTACCTTG TGCTCTTCTG CCATTTCTTC
751 TTTGAGGCCT ACATCGGCAA AATGAGGAAA ACAACGAAAG CTGAATAG

```

Figura 50

1 MNMSVLTQLQ EYEFKQFNEN EAIQWMQENW KKSFLFSALY AAFIFGGRHL
51 MNKRAKFEFR KPLVLWSTL AVFSIFGALR TGAYMVYILM TKGLKQSVCD
101 QGFYNGPVSK FWAYAFVLSK APELGDTIFI ILRKQKLIFL HWYHHITVLL
151 YSWYSYKDMV AGGGWFMTMN YGVHAVMYSY YALRAAGFRV SRKFAMFITL
201 SQITQMLMGC VVNYLVFCWM QHDQCHSHFQ NIFWSSLMYL SYLVLFCHFF
251 FEAYIGKMRK TTKAE*

ES 2 306 523 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> MUKERJI, Pradip
DAS, Tapas
5 HUANG, Yung-Sheng
PARKER-BARNES, Jennifer M.
LEONARD, Amanda Eun-Yeong
THURMOND, Jennifer

10 <120> GENES DE ELONGASA Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 6407.US.P1

15 <140> US 09/145,828

<141> 1998-09-02

<160> 78

20

<170> FastSEQ for Windows Versión 3.0

<210> 1

25 <211> 954

<212> ADN

<213> *Mortierella alpina*

30 <400> 1

```
35      atggccgccc caatcttggg caaggtcaac ttcggcattg atcagccctt cggaatcaag      60
      ctgcgacacct actttgctca ggcctatgaa ctcgtcaccg gaaagtccat cgactccttc      120
      gtcttccagg agggcgteac gcctctctcg acccagagag aggtcgccat gtggactatc      180
      acttacttcg tcgtcatctt tgggtggtcg cagatcatga agagccagga cgccttcaag      240
      ctcaagcccc tcttcatect ccacaacttc ctctgaacga tcgcgtccgg atcgctgttg      300
      ctctgttca tcgagaacct ggtecccatc ctgccagaa acggactttt ctacgccatc      360
40      tgcgacgacg gtgcctggac ccagcgcctc gagctcctct actacctcaa ctacctggtc      420
      aagtaactgg agttggccga caccgtcttt ttggctctca agaagaagcc tcttgagttc      480
      ctgcactact tccaccactc gatgaccatg gttctctgct ttgtccagct tggaggatc      540
      acttcagtgt cctgggtccc tattaccctc aacttgactg tccacgtctt catgtactac      600
      tactacatgc gctccgctgc cgggtgtcgc atctggtgga agcagtactt gaccactctc      660
      cagatcgtcc agttcgttct tgacctcgga ttcactact tctgcgccta cacctacttc      720
45      gccttcacct acttcccctg ggctcccacc gtcggcaagt gcgcgggtac cgagggtgct      780
      gctctctttg gctgcggaact cctctccagc tatctcttgc tctttatcaa cttctaccgc      840
      attacctaca atgccaaggc caaggcagcc aaggagcgtg gaagcaactt tacccecaag      900
      actgtcaagt ccggcggatc gcccaagaag cctccaaga gcaagcacat ctaa      954
```

50

<210> 2

<211> 955

55 <212> ADN

<213> *Mortierella alpina*

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 2

```

5      atggagtcga ttgccccatt cctcccatca aagatgccgc aagatctgtt tatggacctt      60
      gccaccgcta tcgggtgtccg ggccgcgccc tatgtcgatc ctctcgaggc cgcgctgggtg      120
      gccacggccg agaagtacat ccccacgatt gtccatcaca cgcgtgggtt cctggtcgcg      180
      gtggagtcgc ctttgcccg tgagctgccg ttgatgaacc cgttccacgt gctgttgatc      240
      gtgctcgctt atttggtcac ggtctttgtg ggcattgcaga tcatgaagaa ctttgagcgg      300
10     ttcgaggtca agacgttttc gctcctgcac aacttttgtc tggctctgat cagcgcctac      360
      atgtgcggtg ggatcctgta aggcttatca ggccaactat ggactgtttg agaacgctgc      420
      tgatcatacc ttcaagggtc ttccatgggc caagatgatc tggctcttct acttctccaa      480
      gatcatggag ttgtgtcgaca ccatgatcat ggctctcaag aagaacaacc gccagatctc      540
      cttcttgcac gtttaccacc acagctccat cttcaccatc tgggtggttg tcacctttgt      600

15     tgcaccaaac ggtgaagcct acttctctgc tgcgttgaac tegttcatcc atgtgatcat      660
      gtacggctac tacttcttgt cggccttggg cttcaagcag gtgctgttca tcaagttcta      720
      catcacgcgc tcgcagatga cacagtctcg catgatgtcg gtccagtctt cctgggacat      780
      gtacgccatg aaggctcctg gccgcccgg atacccttc ttcacacgg ctctgctttg      840
      gttctacatg tggaccatgc tcggtctctt ctacaacttt tacagaaaga acgccaagtt      900
20     ggccaagcag gccaaaggccg acgctgccaa ggagaaggca aggaagttgc agtaa      955

```

<210> 3

25 <211> 914

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 3

```

35     atggaacatt ttgatgcac acttagtacc tatttcaagg cattgctagg ccctcgagat      60
      actagagtaa aaggatgggt tcttctggac aattatatac ccacatttat ctgctctgtc      120
      atatatttac taattgtatg gctgggacca aaatacatga ggaataaaca gccattctct      180
      tgccggggga ttttagtggt gtataacctt ggactcacac tgctgtctct gtatatgttc      240
      tgtgagttag taacaggagt atgggaaggc aaatacaact tcttctgtca gggcacacgc      300
      accgcaggag aatcagatat gaagattatc cgtgtcctct ggtggtaacta cttctccaaa      360
40     ctcatagaat ttatggacac tttcttcttc atcctgcgca agaacaacca ccagatcacg      420
      gtccctgcacg tctaccacca tgcctcgatg ctgaacatct ggtggtttgt gatgaactgg      480
      gtcccctgcg gccactctta ttttgggtgc acacttaata gcttcatcca cgtcctcatg      540
      tactcttact atggtttgtc gtcagtccct tccatgcgtc catacctctg gtggaagaag      600
      tacatcactc aggggcagct gcttcagttt gtgctgacaa tcatccagac cagctcgggg      660
      gtcactctggc cgtgcacatt ccctcttggg tggttgtatt tccagattgg atacatgatt      720
45     tcctctgatt ctctcttcac aaactctac attcagacct acaacaagaa aggggcctcc      780
      cgaaggaaag accacctgaa ggaccaccag aatgggtcca tggctgctgt gaatggacac      840
      accaacagct tttcaccctt ggaaaacaat gtgaagccaa ggaagctgcg gaaggattga      900
      agtcaaagaa ttga      914

```

50

<210> 4

<211> 867

55 <212> ADN

<213> *Caenorhabditis elegans*

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 4

| | | |
|----|--|-----|
| 5 | atggctcagc atccgctcgt tcaacggcct ctcgatgtca aattcgacac gaaacgattt | 60 |
| | gtggctattg ctactcatgg gccaaagaat ttccctgacg cagaaggctg caagttcttt | 120 |
| | gctgatcact ttgatgttac tattcaggct tcaatcctgt acatggctcg tgtgttcgga | 180 |
| | acaaaatggg tcatgcgtaa tcgtcaacca ttccaattga ctattccact caacatctgg | 240 |
| | aatttcatcc tcgccgcatt ttccatcgca ggagctgtca aaatgacccc agagttcttt | 300 |
| 10 | ggaaccattg ccaacaaag aattgtcgca tectactgca aagtgttga ttccacgaaa | 360 |
| | ggagagaatg gatactgggt gtggctcttc atggcttcca aacttttcga acttgttgac | 420 |
| | accatctctt tggttctcct taaacgtcca ctcatgttcc ttcactggta tcaccatatt | 480 |
| | ctcaccatga tctacgcctg gtactctcat ccattgacct caggattcaa cagatacggg | 540 |
| | atztatctta actttgtcgt ccaecgcttc atgtactctt actacttctt tcgctcgatg | 600 |
| | aagattcgcg tgccaggatt catcgcccaa gctatcaca ctcttcaaat cgttcaattc | 660 |
| 15 | atcatctctt gcgcccgttct tgetcatctt ggttatctca tgcacttcac caatgccaac | 720 |
| | tgtgatttcg agccatcagt attcaagctc gcagttttca tggacacaaac atacttggct | 780 |
| | cttttcgtca acttcttctt ccaatcatat gtctctccgcg gaggaaaaga caagtacaag | 840 |
| | gcagtgcmaa agaagaagaa caactaa | 867 |

20

<210> 5

<211> 33

<212> ADN

25

<213> *Mortierella alpina*

<400> 5

30

gaattcagc atggccgccc caatcttga caa

33

<210> 6

<211> 49

<212> ADN

<213> *Mortierella alpina*

40

<400> 6

gaattcagc atctcatgga tccgccatgg ccgcccgaat cttggacaa

49

45

<210> 7

<211> 317

<212> PRT

<213> *Mortierella alpina*

50

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 7

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

45 <210> 8

<211> 347

<212> PRT

50 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 8

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

50 <210> 9
<211> 345
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 9

5 Met Asn Thr Thr Thr Ser Thr Val Ile Ala Ala Val Ala Asp Gln Phe
 1 5 10 15
 Gln Ser Leu Asn Ser Ser Ser Ser Cys Phe Leu Lys Val His Val Pro
 20 25 30
 Ser Ile Glu Asn Pro Phe Gly Ile Glu Leu Trp Pro Ile Phe Ser Lys
 35 40 45
 10 Val Phe Glu Tyr Phe Ser Gly Tyr Pro Ala Glu Gln Phe Glu Phe Ile
 50 55 60
 His Asn Lys Thr Phe Leu Ala Asn Gly Tyr His Ala Val Ser Ile Ile
 65 70 75 80
 15 Ile Val Tyr Tyr Ile Ile Ile Phe Gly Gly Gln Ala Ile Leu Arg Ala

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

<210> 10

<211> 35

55 <212> ADN

<213> *Mortierella alpina*

60 <400> 10

catctcatgg atccgccaat gccgccgcaa tcttg

35

<210> 11

65 <211> 587

ES 2 306 523 T3

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

5 <400> 11

| | | | | | | | |
|----|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| | tctcgaccca | gagagaggtc | gccatgtgga | ctatcactta | cttcgctcgc | atctttgggtg | 60 |
| 10 | gtcgccagat | catgaagagc | caggacgcct | tcaagctcaa | gccctcttc | atcctccaca | 120 |
| | acttcctcct | gacgatcgcg | tccggatcgc | tgttgctcct | gttcatecag | aacctgggtcc | 180 |
| | ccatcctcgc | cagaaacgga | cttttctacg | ccatctgcca | cgacggtgcc | tggacccagc | 240 |
| | gcctcgagct | cctctactac | ctcaactacc | tggtcaagta | ctgggagttg | gccgacaccg | 300 |
| | tctttttggg | cctcaagaag | aagcctcttg | agttectgca | ctacttccac | cactcgatga | 360 |
| | ccatggttct | ctgctttgtc | cagcttggag | gatacacttc | agtgtcctgg | gtccctatta | 420 |
| 15 | ccctcaactt | gactgtccac | gtcttcatgt | actactacta | catgcctccc | gctgccgggtg | 480 |
| | ttcgcactcg | gtggaagcag | tacttgacca | ctctccagat | cgtccagttc | gttcttgacc | 540 |
| | tgggattcat | ctacttctgc | gcctacacct | acttcgcctt | cacctac | | 587 |

20

<210> 12

<211> 590

<212> ADN

25 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 12

30

| | | | | | | | |
|----|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| | cattaagcac | tttgccect | gtgctatacg | ccatcactgc | ctattacggt | attatTTTTg | 60 |
| | gtggcagggt | ttgttaagt | aagtcgaaac | catttaaatt | aaatggcctt | ttccaattgc | 120 |
| | ataatttggg | tttaacttca | ctttcattga | cgtttttatt | gcttatgggt | gaacaattag | 180 |
| | tgccaattat | tgctcagcac | gggttatact | tcgctatctg | taatattggg | gcttggactc | 240 |
| 35 | aaccgctcgt | tacattatat | tacatgaatt | acattgtcaa | gtttattgaa | tttatagaca | 300 |
| | cctttttctt | gggtctaaaa | cataaaaaat | tgacattttt | gcatacttat | caccatggcg | 360 |
| | ctactgcctt | attatgttac | acccaattga | tgggcaccac | atctatttct | tgggtcccta | 420 |
| | tttcattgaa | ccttgggtgt | cacgtggtta | tgtattggta | ctatttcttg | gctgccagag | 480 |
| | gcacaggggt | ctgggtggaag | gaatgggtta | ccagatttca | aattatccaa | tttgttttgg | 540 |
| 40 | atacgggtt | catatatttt | gctgtctacc | aaaagcagt | tcacttgat | | 590 |

45 <210> 13

<211> 278

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

50

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 13

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

40

<210> 14

<211> 293

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> La Posición 293 es artificial o desconocida

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 14

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

<210> 15

45 <211> 238

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

50 <400> 15

55 Ser Leu Leu Thr Asn Gln Asp Glu Val Phe Pro His Ile Arg Ala Arg
 1 5 10 15
 Arg Phe Ile Gln Glu His Phe Gly Leu Phe Val Gln Met Ala Ile Ala
 20 25 30
 Tyr Val Ile Leu Val Phe Ser Ile Lys Arg Phe Met Arg Asp Arg Glu
 35 40 45
 60 Pro Phe Gln Leu Thr Thr Ala Leu Arg Leu Trp Asn Phe Phe Leu Ser
 50 55 60
 Val Phe Ser Ile Tyr Gly Ser Trp Thr Met Phe Pro Phe Met Val Gln
 65 70 75 80

65

ES 2 306 523 T3

5 Gln Ile Arg Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Cys Gly Cys Glu Ala Leu Ser
 85 90 95
 Asn Leu Pro Ser Gln Ala Glu Tyr Trp Leu Phe Leu Thr Ile Leu Ser
 100 105 110
 Lys Ala Val Glu Phe Val Asp Thr Phe Phe Leu Val Leu Arg Lys Lys
 115 120 125
 Pro Leu Ile Phe Leu His Trp Tyr His His Met Ala Thr Phe Val Phe
 130 135 140
 Phe Cys Ser Asn Tyr Pro Thr Pro Ser Ser Gln Ser Arg Val Gly Val
 10 145 150 155 160
 Ile Val Asn Leu Phe Val His Ala Phe Met Tyr Pro Tyr Tyr Phe Thr
 165 170 175
 Arg Ser Met Asn Ile Lys Val Pro Ala Lys Ile Ser Met Ala Val Thr
 180 185 190
 Val Leu Gln Leu Thr Gln Phe Met Cys Phe Ile Tyr Gly Cys Thr Leu
 15 195 200 205
 Met Tyr Tyr Ser Leu Ala Thr Asn Gln Ala Arg Tyr Pro Ser Asn Thr
 210 215 220
 Pro Ala Thr Leu Gln Cys Leu Ser Tyr Thr Leu His Leu Leu
 20 225 230 235

20 <210> 16

<211> 293

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La Posición 293 es Artificial o desconocida

30

<400> 16

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

ES 2 306 523 T3

<210> 17

<211> 101

<212> PRT

5 <213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 17

10

```

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

```

25

<210> 18

<211> 115

30 <212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 18

35

```

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

```

55

<210> 19

<211> 272

<212> PRT

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La Posición número 272 es artificial o desconocida

65

ES 2 306 523 T3

<400> 19

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

40 <210> 20

<211> 318

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La Posición Número 318 es artificial o desconocida

50

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 20

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

<210> 21

<211> 178

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 21

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

30 <210> 22
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 22

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

60 <210> 23
 <211> 280
 65 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 306 523 T3

<220>

<223> La Posición 280 es artificial o desconocida

5 <400> 23

```

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

```

<210> 24

50 <211> 283

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> La Posición 282 es artificial o desconocida

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 24

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

40

<210> 25

<211> 446

45 <212> PRT

<213> *Mortierella alpina*

<400> 25

50

Met Gly Thr Asp Gln Gly Lys Thr Phe Thr Trp Glu Glu Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 His Asn Thr Lys Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ile Arg Gly Arg Val Tyr

55

60

65

ES 2 306 523 T3

```

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

```

55 <210> 26
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> *Mortierella alpina*

65

ES 2 306 523 T3

<400> 26

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

45 <210> 27
 <211> 279
 <212> PRT
 50 <213> *Mortierella alpina*

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 27

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

20

25 Thr Met Ile Met Val Leu Lys Lys Asn Asn Arg Gln Ile Ser Phe Leu
 115 120 125
 130 135 140
 His Val Tyr His His Ser Ser Ile Phe Thr Ile Trp Trp Leu Val Thr
 145 150 155 160
 Phe Val Ala Pro Asn Gly Glu Ala Tyr Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser
 165 170 175
 30 Phe Ile His Val Ile Met Tyr Gly Tyr Tyr Phe Leu Ser Ala Leu Gly
 180 185 190
 Phe Lys Gln Val Ser Phe Ile Lys Phe Tyr Ile Thr Arg Ser Gln Met
 195 200 205
 Thr Gln Phe Cys Met Met Ser Val Gln Ser Ser Trp Asp Met Tyr Ala
 210 215 220
 35 Met Lys Val Leu Gly Arg Pro Gly Tyr Pro Phe Phe Ile Thr Ala Leu
 225 230 235 240
 Leu Trp Phe Tyr Met Trp Thr Met Leu Gly Leu Phe Tyr Asn Phe Tyr
 245 250 255
 40 Arg Lys Asn Ala Lys Leu Ala Lys Gln Ala Lys Ala Asp Ala Ala Lys
 260 265 270
 Glu Lys Ala Arg Lys Leu Gln
 275

<210> 28

<211> 301

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La Posición número 301 es artificial o desconocida

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 28

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

35

Glu Gly Ala Ala Leu Phe Gly Cys Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Leu Leu
245 250 255
Leu Phe Ile Asn Phe Tyr Arg Ile Thr Tyr Asn Ala Lys Ala Lys Ala
260 265 270
40 Ala Lys Glu Arg Gly Ser Asn Phe Thr Pro Lys Thr Val Lys Ser Gly
275 280 285
Gly Ser Pro Lys Lys Pro Ser Lys Ser Lys His Ile Xaa
290 295 300

45

<210> 29

<211> 289

50 <212> PRT

<213> *Mortierella alpina*

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 29

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

40

<210> 30

<211> 292

45

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> La Posición 292 es artificial o desconocida

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 30

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

<210> 31

45 <211> 291

<212> PRT

<213> *Mortierella alpina*

50 <400> 31

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

ES 2 306 523 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Leu | Val | Lys | Tyr | Trp | Glu | Leu | Ala | Asp | Thr | Val | Phe | Leu | Val | Leu | Lys |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| 5 | Lys | Lys | Pro | Leu | Glu | Phe | Leu | His | Tyr | Phe | His | His | Ser | Met | Thr | Met |
| | 130 | | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| | Val | Leu | Cys | Phe | Val | Gln | Leu | Gly | Gly | Tyr | Thr | Ser | Val | Ser | Trp | Val |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | | 155 | | | | 160 |
| | Pro | Ile | Thr | Leu | Asn | Leu | Thr | Val | His | Val | Phe | Met | Tyr | Tyr | Tyr | Tyr |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| 10 | Met | Arg | Ser | Ala | Ala | Gly | Val | Arg | Ile | Trp | Trp | Lys | Gln | Tyr | Leu | Thr |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | 190 | | | |
| | Thr | Leu | Gln | Ile | Val | Gln | Phe | Val | Leu | Asp | Leu | Gly | Phe | Ile | Tyr | Phe |
| | | | 195 | | | | 200 | | | | | | 205 | | | |
| | Cys | Ala | Tyr | Thr | Tyr | Phe | Ala | Phe | Thr | Tyr | Phe | Pro | Trp | Ala | Pro | Asn |
| 15 | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| | Val | Gly | Lys | Cys | Ala | Gly | Thr | Glu | Gly | Ala | Ala | Leu | Phe | Gly | Cys | Gly |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | | 235 | | | | 240 |
| | Leu | Leu | Ser | Ser | Tyr | Leu | Leu | Leu | Phe | Ile | Asn | Phe | Tyr | Arg | Ile | Thr |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| 20 | Tyr | Asn | Ala | Lys | Ala | Lys | Ala | Ala | Lys | Glu | Arg | Gly | Ser | Asn | Phe | Thr |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| | Pro | Lys | Thr | Val | Lys | Ser | Gly | Gly | Ser | Pro | Lys | Lys | Pro | Ser | Lys | Ser |
| | | 275 | | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| 25 | Lys | His | Ile | | | | | | | | | | | | | |
| | | 290 | | | | | | | | | | | | | | |

<210> 32

<211> 276

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> La Posición 276 es artificial o desconocida

40

45

50

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 32

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

210 215 220
 Tyr Pro Val Ile Ile His Leu Ile Trp Met Tyr Gly Thr Ile Phe Phe
 225 230 235 240
 Met Leu Phe Ser Asn Phe Trp Tyr His Ser Tyr Thr Lys Gly Lys Arg
 245 250 255
 Leu Pro Arg Ala Leu Gln Gln Asn Gly Ala Pro Gly Ile Ala Lys Val
 260 265 270
 40 Lys Ala Asn Xaa
 275

45 <210> 33
 <211> 219
 <212> PRT
 50 <213> *Mortierella alpina*

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 33

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

<210> 34

<211> 202

35 <212> PRT

<213> *Mortierella alpina*

<400> 34

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

ES 2 306 523 T3

<210> 35

<211> 174

<212> PRT

5 <213> *Mortierella alpina*

<400> 35

10

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

35 <210> 36

<211> 145

<212> PRT

40 <213> *Mortierella alpina*

<400> 36

45

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

55

65 70 75 80
 Glu Gly Gly Tyr Asn Leu Gln Cys Gln Asn Leu Asp Ser Ala Gly Glu
 85 90 95
 60 Gly Asp Val Arg Val Ala Lys Val Leu Val Trp Tyr Tyr Phe Ser Lys
 100 105 110
 Leu Val Glu Phe Leu Asp Thr Ile Phe Phe Val Leu Arg Lys Lys Ala
 115 120 125
 Asn Gln Ile Thr Phe Leu His Val Tyr His His Ala Ser Met Phe Asn
 130 135 140
 65 Ile
 145

ES 2 306 523 T3

<210> 37

<211> 278

<212> PRT

5 <213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 37

10

```

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

```

45

<210> 38

50 <211> 293

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 38

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

45 <210> 39

<211> 174

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

50

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 39

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

20

Pro Leu Glu Phe Leu His Tyr Phe His His Ser Met Thr Met Val Leu
 130 135 140
 25 Cys Phe Val Gln Leu Gly Gly Tyr Thr Ser Val Ser Trp Val Pro Ile
 145 150 155 160
 Thr Leu Asn Leu Thr Val His Val Phe Met Tyr Tyr Tyr Tyr
 165 170

30

<210> 40

<211> 141

<212> PRT

35

<213> Secuencia Artificial

<220>

40

<223> La Posición número 141 es artificial o desconocida

<400> 40

45

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

65

<210> 41

<211> 238

ES 2 306 523 T3

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

5 <400> 41

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

 Lys Phe Tyr Ile Thr Arg Ser Gln Met Thr Gln Phe Cys Met Met Ser
 165 170 175
 Val Gln Ser Ser Trp Asp Met Tyr Ala Met Lys Val Leu Gly Arg Pro
 180 185 190
 Gly Tyr Pro Phe Phe Ile Thr Ala Leu Leu Trp Phe Tyr Met Trp Thr
 195 200 205
 Met Leu Gly Leu Phe Tyr Asn Phe Tyr Arg Lys Asn Ala Lys Leu Ala
 210 215 220
 Lys Gln Ala Lys Ala Asp Ala Ala Lys Glu Lys Ala Arg Lys
 225 230 235

40 <210> 42

<211> 144

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

45

<400> 42

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

ES 2 306 523 T3

<210> 43

<211> 241

<212> PRT

5 <213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 43

10

```

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

```

30

```

145           150           155           160
Ile Lys Phe Tyr Ile Thr Arg Ser Gln Met Thr Gln Phe Cys Met Met
           165          170          175
35 Ser Val Gln Ser Ser Trp Asp Met Tyr Ala Met Lys Val Leu Gly Arg
           180          185          190
Pro Gly Tyr Pro Phe Phe Ile Thr Ala Leu Leu Trp Phe Tyr Met Trp
           195          200          205
Thr Met Leu Gly Leu Phe Tyr Asn Phe Tyr Arg Lys Asn Ala Lys Leu
40 210          215          220
Ala Lys Gln Ala Lys Ala Asp Ala Ala Lys Glu Lys Ala Arg Lys Leu
225          230          235          240
Gln

```

45

<210> 44

<211> 217

<212> PRT

50 <213> *Caenorhabditis elegans*

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 44

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

30 <210> 45

<211> 178

<212> PRT

35 <213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 45

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

<210> 46

<211> 148

65 <212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

ES 2 306 523 T3

<400> 46

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

<210> 47

<211> 302

25 <212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 47

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

ES 2 306 523 T3

<210> 48

<211> 271

<212> PRT

5 <213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 48

10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45

```

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

<210> 49

<211> 265

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 49

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

40 <210> 50

<211> 265

<212> PRT

45 <213> *Caenorhabditis elegans*

50

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 50

5 Ala Thr His Gly Pro Lys Asn Phe Pro Asp Ala Glu Gly Arg Lys Phe
 1 5 10 15
 Phe Ala Asp His Phe Asp Val Thr Ile Gln Ala Ser Ile Leu Tyr Met
 20 25 30

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

40 <210> 51
 <211> 317

45 <212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

50

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 51

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

30 Thr Val His Val Phe Met Tyr Tyr Tyr Tyr Met Arg Ser Ala Ala Gly
 195 200 205
 Val Arg Ile Trp Trp Lys Gln Tyr Leu Thr Thr Leu Gln Ile Val Gln
 210 215 220
 35 Phe Val Leu Asp Leu Gly Phe Ile Tyr Phe Cys Ala Tyr Thr Tyr Phe
 225 230 235 240
 Ala Phe Thr Tyr Phe Pro Trp Ala Pro Asn Val Gly Lys Cys Ala Gly
 245 250 255
 Thr Glu Gly Ala Ala Leu Phe Gly Cys Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Leu
 260 265 270
 40 Leu Leu Phe Ile Asn Phe Tyr Arg Ile Thr Tyr Asn Ala Lys Ala Lys
 275 280 285
 Ala Ala Lys Glu Arg Gly Ser Asn Phe Thr Pro Lys Thr Val Lys Ser
 290 295 300
 45 Gly Gly Ser Pro Lys Lys Pro Ser Lys Ser Lys His Ile
 305 310 315

<210> 52

50 <211> 288

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 52

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

40

<210> 53

<211> 282

45 <212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

50

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 53

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

40

<210> 54

<211> 278

<212> PRT

45

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 54

50

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

65

ES 2 306 523 T3

100 105 110
 Glu Gln Asp Arg Val Cys Gly Phe Trp Thr Trp Leu Phe Val Leu Ser
 115 120 125
 5 Lys Leu Pro Glu Leu Gly Asp Thr Ile Phe Ile Val Leu Arg Lys Gln
 130 135 140
 Pro Leu Ile Phe Leu His Trp Tyr His His Ile Thr Val Leu Ile Tyr
 145 150 155 160
 Ser Trp Phe Ser Tyr Thr Glu Tyr Thr Ser Ser Ala Arg Trp Phe Ile
 165 170 175
 10 Val Met Asn Tyr Cys Val His Ser Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Ala Leu
 180 185 190
 Lys Ala Ala Arg Phe Asn Pro Pro Arg Phe Ile Ser Met Ile Ile Thr
 195 200 205
 Ser Leu Gln Leu Ala Gln Met Ile Ile Gly Cys Ala Ile Asn Val Trp
 15 210 215 220
 Ala Asn Gly Phe Leu Lys Thr His Gly Thr Xaa Ser Cys His Ile Ser
 225 230 235 240
 Gln Arg Asn Ile Asn Leu Ser Ile Ala Met Tyr Ser Ser Tyr Phe Val
 245 250 255
 20 Leu Phe Ala Arg Phe Phe Tyr Lys Ala Tyr Leu Ala Pro Gly Gly His
 260 265 270
 Lys Ser Arg Arg Met Ala
 275

25 <210> 55

<211> 286

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

30 <400> 55

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

ES 2 306 523 T3

<210> 56

<211> 261

<212> PRT

5 <213> *Drosophila melanogaster*

<400> 56

10

```

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

```

45

<210> 57

<211> 299

<212> PRT

50 <213> *Elongasa humana*

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 57

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

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

45 <210> 58

<211> 288

<212> PRT

50 <213> *Caenorhabditis elegans*

55

60

65

ES 2 306 523 T3

<400> 58

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

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

<210> 59

<211> 798

<212> ADN

<213> *Elongasa humana*

45

<400> 59

atgaacatgt cagtgttgac ttacaagaa tatgaattcg aaaagcagtt caacgagaat 60
 gaagccatcc aatggatgca ggaaaactgg aagaaatcct tctctgtttc tgctctgtat 120
 50 gctgccttta tattcgggtgg tcggcaccta atgaataaac gagcaaagt tgaactgagg 180
 aagccattag tgctctggtc totgaccctt gcagctctca gtatattcgg tgctcttoga 240
 actggtgctt atatggtgta cttttgatg accaaaggcc tgaagcagtc agtttgtgac 300
 cagggttttt acaatggacc tgtcagcaaa ttctgggctt atgcatttgt gctaagcaaa 360
 gcaccogaac taggagatac aatattcatt attctgagga agcagaagct gatcttctctg 420
 55 cactgggtatc accacatcac tgtgctcctg tactcttggg actcctacaa agacatgggt 480
 gccgggggag gttggttcat gactatgaac tatggcgtgc acgccgtgat gtactcttac 540
 tatgccttgc gggcggcagg tttccgagtc tcccgaagt ttgccatgtt catcaccttg 600
 tcccagatca ctccagatgct gatgggctgt gtggttaact acctggtctt ctgctggatg 660
 cagcatgacc agtgtcactc tcactttcag aacatcttct ggtctcact catgtacctc 720
 60 agctaccttg tgctcttctg ccatttcttc tttgaggect acatcggcaa aatgaggaaa 780
 acaacgaaag ctgaatag 798

<210> 60

<211> 265

65

<212> PRT

<213> *Elongasa humana*

ES 2 306 523 T3

<400> 60

1 Met Asn Met Ser Val Leu Thr Leu Gln Glu Tyr Glu Phe Glu Lys Gln
 5 Phe Asn Glu Asn Glu Ala Ile Gln Trp Met Gln Glu Asn Trp Lys Lys
 Ser Phe Leu Phe Ser Ala Leu Tyr Ala Ala Phe Ile Phe Gly Gly Arg
 His Leu Met Asn Lys Arg Ala Lys Phe Glu Leu Arg Lys Pro Leu Val
 10 Leu Trp Ser Leu Thr Leu Ala Val Phe Ser Ile Phe Gly Ala Leu Arg
 Thr Gly Ala Tyr Met Val Tyr Ile Leu Met Thr Lys Gly Leu Lys Gln
 Ser Val Cys Asp Gln Gly Phe Tyr Asn Gly Pro Val Ser Lys Phe Trp
 15 Ala Tyr Ala Phe Val Leu Ser Lys Ala Pro Glu Leu Gly Asp Thr Ile
 Phe Ile Ile Leu Arg Lys Gln Lys Leu Ile Phe Leu His Trp Tyr His
 20 His Ile Thr Val Leu Leu Tyr Ser Trp Tyr Ser Tyr Lys Asp Met Val
 Ala Gly Gly Gly Trp Phe Met Thr Met Asn Tyr Gly Val His Ala Val
 25 Met Tyr Ser Tyr Tyr Ala Leu Arg Ala Ala Gly Phe Arg Val Ser Arg
 Lys Phe Ala Met Phe Ile Thr Leu Ser Gln Ile Thr Gln Met Leu Met
 Gly Cys Val Val Asn Tyr Leu Val Phe Cys Trp Met Gln His Asp Gln
 30 Cys His Ser His Phe Gln Asn Ile Phe Trp Ser Ser Leu Met Tyr Leu
 Ser Tyr Leu Val Leu Phe Cys His Phe Phe Phe Glu Ala Tyr Ile Gly
 35 Lys Met Arg Lys Thr Thr Lys Ala Glu
 165 170 175
 180 185 190
 195 200 205
 210 215 220
 225 230 235
 245 250 255
 260 265

<210> 61

<211> 82

<212> PRT

<213> Desconocida

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia desconocida: KCS de jojoba; Núm. de Acceso GenBank U37088

<400> 61

50 Ala Thr Leu Pro Asn Phe Lys Ser Ser Ile Asn Leu His His Val Lys
 1 5 10 15
 Leu Gly Tyr His Tyr Leu Ile Ser Asn Ala Leu Phe Leu Val Phe Ile
 20 25 30
 55 Pro Leu Leu Gly Leu Ala Ser Ala His Leu Ser Ser Phe Ser Ala His
 35 40 45
 Asp Ser Leu Leu Phe Asp Leu Leu Arg Arg Asn Leu Leu Pro Val Val
 50 55 60
 Val Cys Ser Phe Leu Phe Val Leu Leu Ala Thr Leu His Phe Leu Thr
 65 70 75 80
 Arg Pro

<210> 62

<211> 80

65 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

ES 2 306 523 T3

<400> 62

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | Ser | Thr | Leu | Pro | Pro | Val | Leu | Tyr | Ala | Ile | Thr | Ala | Tyr | Tyr | Val | Ile |
| | | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | 15 | | |
| 5 | | Ile | Phe | Gly | Gly | Arg | Phe | Leu | Leu | Ser | Lys | Ser | Lys | Pro | Phe | Lys | Leu |
| | | | | 20 | | | | | | 25 | | | | 30 | | | |
| | | Asn | Gly | Leu | Phe | Gln | Leu | His | Asn | Leu | Val | Leu | Thr | Ser | Leu | Ser | Leu |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| | | Thr | Leu | Leu | Leu | Met | Val | Glu | Gln | Leu | Val | Pro | Ile | Ile | Val | Gln | |
| | | 50 | | | | 55 | | | | | | 60 | | | | | |
| 10 | | His | Gly | Leu | Tyr | Phe | Ala | Ile | Cys | Asn | Ile | Gly | Ala | Trp | Thr | Gln | Pro |
| | | 65 | | | | 70 | | | | | | 75 | | | | 80 | |

<210> 63

15 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: cebador R0352

<400> 63

25

acgcgtacgt aaagcttg

18

<210> 64

30 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: cebador RO514

<400> 64

40

ggctatggat ccatgaattc actcgttact caatat

36

<210> 65

45 <211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador RO 515

<400> 65

55

cctgccaagc tttaccittt ttctctgtg ttg

33

<210> 66

60 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: cebador RO 541

ES 2 306 523 T3

| | | |
|----|--|----|
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 5 | <220> | |
| | <223> Descripción de la Secuencia artificial: cebador RO 738 | |
| | <400> 71 | |
| 10 | aatcaggaat tcatggctca gcatccgctc gttcaa | 36 |
| | <210> 72 | |
| 15 | <211> 36 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 20 | <220> | |
| | <223> Descripción de la Secuencia artificial: cebador RO 739 | |
| | <400> 72 | |
| 25 | ccgcttgctg acttagttgt tcttctctt tggcac | 36 |
| | <210> 73 | |
| 30 | <211> 30 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 35 | <220> | |
| | <223> Descripción de la Secuencia artificial: cebador RP 735 | |
| | <400> 73 | |
| 40 | cctcctgaat tccaacacta ttcagcttc | 30 |
| | <210> 74 | |
| 45 | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 50 | <220> | |
| | <223> Descripción de la Secuencia artificial: cebador RO 73 | |
| | <400> 74 | |
| 55 | taatagact cactataggg | 20 |
| | <210> 75 | |
| 60 | <211> 18 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 65 | <220> | |
| | <223> Descripción de la Secuencia artificial: cebador RO 728 | |

ES 2 306 523 T3

| | | |
|----|--|----|
| | <400> 75 | |
| | gagacttga gcggttcg | 18 |
| 5 | <210> 76 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 10 | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la Secuencia artificial: cebador RO 730 | |
| 15 | <400> 76 | |
| | tctctgctgc gttgaactcg | 20 |
| 20 | <210> 77 | |
| | <211> 19 | |
| | <212> ADN | |
| 25 | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la Secuencia artificial: cebador RO 729 | |
| 30 | <400> 77 | |
| | aaagctcttg acctegaac | 19 |
| 35 | <210> 78 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 40 | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la Secuencia artificial: cebador RO 731 | |
| 45 | <400> 78 | |
| | aacttgatga acgacacgtg | 20 |
| 50 | | |
| 55 | | |
| 60 | | |
| 65 | | |