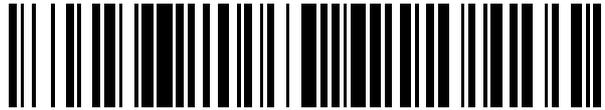


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 916**

51 Int. Cl.:

<b>A01H 5/00</b>	(2006.01)
<b>A01H 5/08</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/82</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/14</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/04</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/06</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2006 E 06806150 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 1951030**

54 Título: **Procedimientos y medios mejorados para producir hialuronano**

30 Prioridad:

**05.10.2005 EP 05090277**  
**11.10.2005 US 725530 P**  
**07.04.2006 EP 06090053**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.05.2015**

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH**  
**(100.0%)**  
**Alfred Nobel Strasse 10**  
**440789 Monheim am Rhein 0789 Monheim am**  
**Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**FROHBERG, CLAUS y**  
**ESSIGMANN, BERND**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 536 916 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos y medios mejorados para producir hialuronano

La presente invención se refiere a células vegetales y plantas que sintetizan una cantidad aumentada de hialuronano y a los procedimientos para preparar dichas plantas, y también a los procedimientos para preparar hialuronano con la ayuda de estas células vegetales o plantas. Aquí, las células vegetales o plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención tienen actividad hialuronano sintasa y adicionalmente una actividad aumentada de glutamina:fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT) y una actividad aumentada de UDP glucosa deshidrogenasa (UDP-Glc-DH), en comparación con células vegetales naturales o plantas naturales. La presente invención se refiere además al uso de plantas que tienen la síntesis de hialuronano aumentada para preparar hialuronano y alimentos o productos alimentarios que contienen hialuronano.

El hialuronano es un mucopolisacárido (glucosaminoglucano) lineal no ramificado de origen natural que se construye de moléculas alternantes de ácido glucurónico y N-acetil-glucosamina. El bloque de construcción básico de hialuronano consiste en el disacárido ácido beta-1,3-N-acetil-glucosamina glucurónico. En el hialuronano, estas unidades de repetición están unidas entre sí mediante enlaces beta-1,4. En farmacia, se hace uso frecuente del término ácido hialurónico. Debido a que el hialuronano está presente en la mayoría de los casos como un polianión y no como el ácido libre, en el presente documento a continuación, se usa con preferencia el término hialuronano, pero debe entenderse que cada término abarca ambas formas moleculares.

El hialuronano tiene propiedades fisicoquímicas inusuales, tal como, por ejemplo, propiedades de polielectrolitos, propiedades viscoelásticas, una elevada capacidad para unirse al agua, propiedades de formación de geles, que, además, se describen propiedades adicionales del hialuronano en un artículo de revisión de Lapcik y col., (1998, Chemical Reviews 98(8), 2663-2684).

El hialuronano es un componente del tejido conectivo extracelular y de los fluidos corporales de los vertebrados. En seres humanos, se sintetiza ácido hialurónico por la membrana celular de todas las células corporales, especialmente las células mesenquimatosas, y presentes de forma ubicua en el cuerpo con una concentración particularmente elevada en los tejidos conectivos, la matriz extracelular, el cordón umbilical, el fluido articular, el tejido cartilaginoso, la piel y el cuerpo vítreo del ojo (Bernhard Gebauer, 1998, Disertación inaugural, Virchow-Klinikum Medizinische Fakultät Charité der Humboldt Universität zu Berlin; Fraser y col., 1997, Journal of Internal Medicine 242, 27-33).

Recientemente, se ha encontrado también a hialuronano en organismos animales no vertebrados (moluscos) (Volpi y Maccari, 2003, Biochimie 85, 619-625).

Además, algunas bacterias patógenas gram positivas (*Streptococcus* grupo A y C) y bacterias gram negativas (*Pasteurella*) sintetizan hialuronano como exopolisacáridos que protegen estas bacterias contra el ataque del sistema inmune de su hospedador, debido a que el hialuronano es una sustancia no inmunógena.

Los virus que infectan algas verdes unicelulares del género *Chlorella*, algunas de las cuales están presentes en especies endosimbióticas de *Paramecium*, otorgan a las algas verdes unicelulares la capacidad de sintetizar hialuronano tras la infección por el virus (Graves y col., 1999, Virology 257, 15-23). Sin embargo, la capacidad de sintetizar hialuronano no es una característica que caracterice a las algas en cuestión. La capacidad de las algas de sintetizar hialuronano está mediada por una infección con un virus cuyo genoma tiene una secuencia de codificación para la hialuronano sintasa (DeAngelis, 1997, Science 278, 1800-1803). Además, el genoma del virus contiene secuencias de codificación para la UDP-glucosa deshidrogenasa (UDP-Glc-DH) y una glutamina: fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT). UDP-Glc-DH cataliza la síntesis del ácido UDP-glucurónico usado como un sustrato por la hialuronano sintasa. GFAT convierte la fructosa 6-fosfato y la glutamina en glucosamina 6-fosfato, que es un metabolito importante en la ruta metabólica para la síntesis de hialuronano en, por ejemplo, bacterias. Ambos genes de algas codifican proteínas activas que, de la misma forma que la hialuronano sintasa del virus, se transcriben simultáneamente en la fase temprana de la infección vírica (DeAngelis y col., 1997, Science 278, 1800-1803, Graves y col., 1999, Virology 257, 15-23). La actividad de una proteína que tiene glutamina: actividad fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT) no se detectaría nunca en extractos de células no infectadas por un virus ni en células infectadas con virus (Landstein y col., 1998, Virology 250, 388-396). Por consiguiente, no se conoce el papel de la expresión de UDP-Glc-DH y GFAT en células de *Chlorella* infectadas con virus para la síntesis de hialuronano, y cualquiera que se requiera para la síntesis de hialuronano.

Las plantas de origen natural por sí mismas no tienen ningún ácido nucleico, que codifica las proteínas que catalizan la síntesis de hialuronano y, aunque se ha descrito y caracterizado un gran número de hidratos de carbono vegetales, no ha sido posible hasta ahora detectar hialuronano o moléculas relacionadas con hialuronano en plantas no infectadas, de origen natural (Graves y col., 1999, Virology 257, 15-23).

La catálisis de la síntesis del hialuronano se efectúa mediante una enzima asociada a membrana o integrada a una única membrana, la hialuronano sintasa. Las hialuronano sintasas que se han estudiado hasta ahora se pueden clasificar en dos grupos: hialuronano sintasas de Clase I y hialuronano sintasas de Clase II (DeAngelis, 1999, CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences 56, 670-682).

Las hialuronano sintetasas de los vertebrados se distinguen además por la isoenzimas identificadas. Las diferentes isoenzimas se denominan a fin de su identificación utilizando números arábigos (por ejemplo, hsHAS1, hsHAS2, hsHAS3).

5 El mecanismo de la transferencia de moléculas de hialuronano sintetizadas a través de la membrana citoplasmática en el medio que rodea la célula no se ha elucidado todavía completamente. Las hipótesis iniciales han supuesto que el transporte a través de la membrana celular se ha efectuado mediante la propia hialuronano sintasa. Sin embargo, resultados más recientes indican que el transporte de moléculas de hialuronano a través de la membrana citoplasmática tiene lugar mediante transporte dependiente de energía a través de proteínas de transporte responsables de esta acción. Por tanto, se han generado cepas de *Streptococcus* mediante mutación en la que se ha inhibido la síntesis de una proteína de transporte activo. Estas cepas sintetizaron menos hialuronano que las cepas bacterianas naturales correspondientes (Ouskova y col., 2004, *Glycobiology* 14(10), 931-938). En fibroblastos humanos, ha sido posible demostrar, con la ayuda de agentes que inhiben específicamente las proteínas de transporte conocidas, que es posible reducir la cantidad de hialuronano producida y la actividad de las hialuronano sintetasas (Prehm y Schumacher, 2004, *Biochemical Pharmacology* 68, 1401-1410). En el que no se conoce que cantidad, en todo caso, de proteínas de transporte capaces de transportar hialuronano están presentes en plantas.

Las propiedades inusuales del hialuronano ofrecen una riqueza de posibilidades para la aplicación en diversos campos, tales como, por ejemplo, en farmacia, la industria cosmética, en la producción de alimentos y alimentación, en aplicaciones técnicas (por ejemplo, como lubricantes), etc. las aplicaciones más importantes en las que hialuronano se usa actualmente en el campo médico y cosmético (véase, por ejemplo, Lapcik y col., 1998, *Chemical Reviews* 98(8), 2663-2684, Goa y Benfield, 1994, *Drugs* 47(3), 536-566).

En el campo médico, los productos que contienen hialuronano se usan actualmente para el tratamiento intraarticular de la artrosis y en tratamientos oftálmicos utilizados para cirugía ocular. Se usa también el hialuronano para tratar trastornos de las articulaciones en caballos de raza. Además, el ácido hialurónico es un componente de algunos rinológicos que, por ejemplo, en la forma de gotas oculares y nasales, sirve para humedecer las membranas mucosas secas. Soluciones que contienen hialuronano para inyección se usan como analgésicos y antirreumáticos. Parches que comprenden hialuronano o hialuronano derivatizado se emplean en la cicatrización de heridas. Como dermatológicos, los implantes de gel que contienen hialuronano se utilizan para corregir deformaciones en la piel en cirugía plástica.

Para aplicaciones farmacológicas, se da preferencia al uso de hialuronano que tenga un elevado peso molecular.

30 En medicina cosmética, las preparaciones de hialuronano están entre los materiales de relleno de la piel más adecuados. Inyectando hialuronano, durante un periodo limitado de tiempo, es posible alisar arrugas o aumentar el volumen de los labios.

En productos cosméticos, en particular en cremas y lociones para la piel, el hialuronano se usa frecuentemente como humectante por su elevada capacidad de unión al agua.

35 Además, las preparaciones que contienen hialuronano se venden como los denominados nutracéuticos (suplementos alimenticios) que se pueden usar también en animales (por ejemplo, perros, caballos) para la profilaxis y el alivio de la artrosis.

El hialuronano usado para fines comerciales se aísla actualmente a partir de tejidos animales (crestas de gallos) o se preparan fermentativamente utilizando cultivos bacterianos.

40 El documento US 4.141.973 describe un procedimiento para aislar hialuronano a partir de crestas de gallo o alternativamente a partir de cordones umbilicales. Además del hialuronano, los tejidos animales (por ejemplo, crestas de gallo, cordones umbilicales) contienen también mucopolisacáridos adicionales relacionados con hialuronano, tales como sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, sulfato de queratán, sulfato de heparán y heparina. Además, los organismos animales contienen proteínas (hialadherinas) que se unen específicamente a hialuronano y que se requieren para las funciones más diferentes en el organismo, tales como, por ejemplo, la degradación de la hialuronina del hígado, la función del hialuronano como estructura conducente para la migración celular, la regulación de la endocitosis, el anclaje del hialuronano sobre la estructura celular o la formación de redes de hialuronano (Turley, 1991, *Adv Drug Delivery Rev* 7, 257 FF; Laurent y Fraser, 1992, *FASEB J.* 6, 183 FF; Stamenkovic y Aruffo, 1993, *Methods Enzymol.* 245, 195 FF; Knudson y Knudson, 1993, *FASEB J.* 7, 1233 y siguientes).

Las cepas de *Streptococcus* utilizadas para la producción de hialuronano son exclusivamente bacterias patógenas. Durante el cultivo, también, estas bacterias producen exotoxinas (pirógenas) y hemolisinas (estreptolisina, en particular, alfa y beta hemolisina (Kilian, M., *Streptococcus* y *Enterococcus*. En: *Medical Microbiology*. Greenwood, D.; Slack, RCA; Peutherer, J.F. (Eds.). Capítulo 16. Churchill Livingstone, Edimburgo, Reino Unido: pp. 174-188, 2002, ISBN 0443070776) que se liberan en el medio de cultivo. Esto vuelve más difícil la purificación y el aislamiento del hialuronano preparado con la ayuda de las cepas *Streptococcus*. En particular para las aplicaciones farmacéuticas, es un problema la presencia de exotoxinas y hemolisinas en las preparaciones.

El documento US 4.801.539 describe la preparación de hialuronano mediante la fermentación de una cepa de bacterias mutagenizadas (*Streptococcus zooedemicus*). La cepa de bacterias mutagenizadas utilizada no sintetiza grandes cantidades de beta-hemolisina. El rendimiento conseguido fue de 3,6 g de hialuronano por litro de cultivo.

5 El documento EP 0694616 describe un procedimiento para cultivar *Streptococcus zooedemicus* o *Streptococcus equi*, en el que, en las condiciones de cultivo empleadas, no se sintetiza estreptolisina, pero se sintetizan cantidades aumentadas de hialuronano. El rendimiento conseguido fue de 3,5 g de hialuronano por litro de cultivo.

10 Durante el cultivo, las cepas de *Streptococcus* liberan la enzima hialuronidasa en el medio de cultivo, como consecuencia del cual, en este sistema de producción, también, el peso molecular se reduce durante la purificación. Se describe en el documento US 4.782.046 el uso de cepas de *Streptococcus* hialuronidasa negativas o de los procedimientos para la producción de hialuronano en los que se ha inhibido la producción de hialuronidasa durante el cultivo. El rendimiento conseguido fue de hasta 2,5 g de hialuronano por litro de cultivo, y el peso molecular promedio máximo conseguido fue de  $3,8 \times 10^6$  Da, a una distribución de pesos moleculares de entre  $2,4 \times 10^6$  a  $4,0 \times 10^6$ .

15 Los documentos US 20030175902 y WO 03 054163 describen la preparación de hialuronano con ayuda de la expresión heteróloga de una hialuronano sintasa procedente de *Streptococcus equisimilis* en *Bacillus subtilis*. Para conseguir la producción de suficientes cantidades de hialuronano, además de la expresión heteróloga de una hialuronano sintasa, se requiere también la expresión simultánea de una UDP-glucosa deshidrogenasa en las células de *Bacillus*. Los documentos US 20030175902 y WO 03 054163 no indican la cantidad absoluta de hialuronano obtenida en la producción con la ayuda de *Bacillus subtilis*. El peso molecular promedio máximo conseguido fue de aproximadamente  $4,2 \times 10^6$ . Sin embargo, este peso molecular promedio se consiguió solamente para la cepa de *Bacillus* recombinante en la que un gen que codifica el gen de la hialuronano sintasa de *Streptococcus equisimilis* y el gen que codifica la UDP-glucosa deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* se integraron en el genoma de *Bacillus subtilis* bajo el control del promotor *amyQ*, en el que se inactivó al mismo tiempo el gen *cpxY* de *Bacillus subtilis*-endógeno (que codifica un citocromo de la P450 oxidasa).

25 El documento WO 05 012529 describe la preparación de plantas de tabaco transgénicas utilizando moléculas de ácido nucleico que codifican las hialuronano sintasas de virus que infectan *Chlorella*. En el documento WO 05/012529 se ha hecho uso, por otra parte, de secuencias de ácido nucleico que codifican la hialuronano sintasa de la cepa vírica CVH11 de *Chlorella* y, por otra parte, de la cepa vírica CVKA1 de *Chlorella* para transformar plantas de tabaco. La síntesis de hialuronano solamente se pudo demostrar para una planta transformada con una secuencia de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa aislada de la cepa vírica CVKA1 de *Chlorella*. Para las plantas de tabaco transformadas con una secuencia de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa a partir de la cepa vírica CVH11 de *Chlorella*, no ha sido posible detectar la síntesis de hialuronano en las plantas transgénicas correspondientes. La cantidad de hialuronano sintetizado solo por la planta de tabaco transgénico productora de hialuronano en el documento WO 05 012529 se indica que es aproximadamente de 4,2 µg de hialuronano por ml de volumen medido que, teniendo en cuenta la descripción para realizar el experimento en cuestión, corresponde aproximadamente a una cantidad de al menos 12 µg de hialuronano producido por gramo de peso fresco de material vegetal.

40 La hialuronano sintasa cataliza la síntesis de hialuronano procedente de los materiales de partida de la UDP-N-acetil-glucosamina y el ácido UDP-glucurónico. Ambos materiales de partida mencionados están presentes en células vegetales.

45 En células vegetales, El ácido UDP-glucurónico sirve como metabolito para una pluralidad de posibles rutas para sintetizar ácido ascórbico (Lorence y col., 2004, Plant Physiol 134, 1200-1205) y como un metabolito fundamental en la síntesis de componentes de pectina y hemicelulosa de las paredes celulares que se sintetizan en el retículo endoplásmico de la célula vegetal (Reiter, 1998, Plant Physiol Biochem 36(1), 167-176). El monómero de pectina más importante y que se produce de forma más frecuente es el ácido D-galacturónico (2004, H. W. Heldt en "Plant Biochemistry", 3ª Edición, Academic Press, ISBN 0120883910) que se sintetiza utilizando ácido UDP-glucurónico. Además, es también posible, entre otras cosas, sintetizar UDP-xilosa, UDP-arabinosa, ácido UDP galacturónico y UDP-apiosa, los metabolitos para la síntesis de hemicelulosa y pectina, utilizando ácido UDP-glucurónico (Seitz y col., 2000, Plant Journal, 21(6), 537-546). En células vegetales, se puede sintetizar ácido UDP-glucurónico tanto mediante el metabolismo de la hexosa fosfato que comprende, entre otras cosas, la conversión de UDP-glucosa en ácido UDP-glucurónico mediante UDP-Glc-DH o mediante el metabolismo oxidativo del mio-inositol que comprende la conversión del glucuronato 1-fosfato uridilil transferasa. Ambas rutas metabólicas para sintetizar ácido glucurónico parecen existir de forma independiente entre sí y alternativamente en diferentes etapas de tejidos/desarrollo en plantas de *Arabidopsis* (Seitz y col., 2000, Plant Journal 21(6), 537-546). La respectiva contribución de las dos rutas metabólicas mencionadas (de la hexosa fosfato o del metabolismo oxidativo del mio-inositol) hacia la síntesis del ácido UDP-glucurónico no se ha elucidado todavía (Karkonen, 2005, Plant Biosystems 139(1), 46-49).

60 La enzima UDP-Glc-DH cataliza la conversión de la UDP-glucosa en ácido UDP-glucurónico. Samac y col. (2004, Applied Biochemistry and Biotechnology 113-116, Humana Press, Editor Ashok Mulehandani, 1167-1182) describe la expresión en exceso específica de tejido de una UDP-Glc-DH de soja en células del floema de *Alfalfa* con el objetivo de aumentar el contenido de pectina en los tallos de estas plantas. Se aumentó la actividad de UDP-Glc-DH,

en comparación con las plantas naturales correspondientes, en más de un 200%; sin embargo, la cantidad de pectina producida por las plantas correspondiente fue inferior a la cantidad de pectina producida por las plantas naturales correspondientes. Aumentó la cantidad de monómeros de xilosa y ramnosa en la pared de la fracción celular de las plantas transgénicas a la vez que se redujo la cantidad de monómeros de manosa en la fracción de la pared celular.

La expresión en exceso constitutiva de UDP-Glc-DH en plantas de *Arabidopsis* dio como resultado un crecimiento anómalo de las plantas en cuestión en comparación con las plantas naturales correspondientes y un fenotipo enano. La fracción de la pared celular de las plantas correspondientes tiene una cantidad aumentada de manosa y galactosa y una cantidad reducida de xilosa, arabinosa y ácidos urónicos en comparación con las plantas naturales correspondientes (Roman, 2004, "Studies on The Role of UDP-Glc-DH in Polysaccharide Biosynthesis", Tesis doctoral, Acta Universitatis Upsaliensis, ISBN 91-554-6088-7, ISSN 0282-7476). Por tanto, estos resultados contradicen al menos en parte los resultados de Samac y col. (2004, Applied Biochemistry and Biotechnology 113-116, Humana Press, Editor Ashok Mulehandani, 1167-1182) que detectó una cantidad reducida de manosa y una cantidad aumentada de xilosa en la fracción de pared celular de las plantas transgénicas correspondientes.

Para la síntesis de UDP-N-acetilglucosamina en células vegetales, el documento WO 98 35047 describe una ruta metabólica en la que la glucosamina se convierte en numerosas etapas de reacción catalizadas enzimáticamente de forma sucesiva con formación de los metabolitos N-acetil-glucosamina, N-acetil-glucosamina 6-fosfato, N-acetil-glucosamina 1-fosfato en UDP-N-acetilglucosamina. Una ruta metabólica alternativa comprende la reacción de la fructosa 6 fosfato y la glutamina proporcionando glucosamina 6-fosfato que se convierte posteriormente mediante numerosas etapas de reacción catalizadas enzimáticamente de forma sucesiva con formación de los metabolitos glucosamina 1-fosfato y N-acetil-glucosamina 1-fosfato en UDP-N-acetilglucosamina. La conversión de fructosa 6-fosfato y glutamina en glucosamina 6-fosfato está catalizada por una proteína que tiene actividad glutamina fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT) (Mayer y col., 1968, Plant Physiol. 43, 1097-1107).

El documento WO 00 11192 describe la expresión en exceso específica de endospermo de una molécula de ácido nucleico de maíz que codifica una proteína que tiene la actividad enzimática de una GFAT en plantas de maíz transgénico con el objetivo de sintetizar un almidón catiónico en plantas que tienen moléculas de 2-amino-anhidroglucosa. La ruta metabólica describe que, De acuerdo con la descripción del documento WO 00 11192, debe de resultar 2-amino-anhidroglucosa que se incorpora en el almidón, comprende entre otras cosas la incorporación de UDP-glucosamina por las almidón sintetas y/o glicógeno sintetas en el almidón. Se indica que se podrían detectar cantidades aumentadas de UDP-glucosamina en harina de endospermo de las plantas de maíz transgénico que expresan en exceso en cuestión una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de GFAT fusionada traduccionalmente con un péptido de señalización plástida. Cuando la proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT se expresaba sin péptido de señalización, ha sido posible detectar una cantidad aumentada de glucosamina 1-fosfato en las harinas correspondientes procedentes del tejido de endospermo de maíz. No ha sido posible detectar almidón catiónico en las plantas transgénicas.

La producción de hialuronano mediante fermentación de cepas de bacterias se asocia con elevados costes, debido a que las bacterias han de fermentarse en recipientes estériles cerrados herméticamente en condiciones de cultivo controlado caro (véase, por ejemplo, documento US 4.897.349). Además, la cantidad de hialuronano que se puede producir mediante fermentación de cepas bacterianas está limitada por las instalaciones de producción presentes en cada caso. Aquí, ha de tenerse en cuenta también que los fermentadores, como consecuencia de las leyes físicas, no se pueden desarrollar para volúmenes de cultivo excesivamente grandes. Debe hacerse mención particular aquí a que solo se puede asegurar la mezcla homogénea de las sustancias alimentadas procedentes del exterior (por ejemplo, fuentes de nutrientes esenciales para las bacterias, reactivos para regular el pH, oxígeno) con el medio de cultivo requerido para una producción eficaz, que, en fermentadores grandes, solamente en todo caso, con un importante gasto técnico.

La purificación de hialuronano a partir de organismos animales se complica debido a la presencia, en tejidos animales, de otros mucopolisacáridos y proteínas que se unen específicamente a hialuronano. En pacientes, el uso de hialuronano que contiene preparaciones médicas contaminadas por proteínas animales puede dar como resultado en reacciones inmunológicas no deseadas del cuerpo (documento US 4.141.973), en particular si el paciente es alérgico a proteínas animales (por ejemplo clara de huevo de pollo). Además, las cantidades (rendimientos) de hialuronano que se pueden obtener de tejidos animales en calidad y pureza satisfactorias son bajas (cresta de gallo: 0.079% en p/p, el documento EP 0144019, documento US 4.782.046), que necesita el procesamiento de grandes cantidades de tejidos animales. Un problema adicional en el aislamiento del hialuronano de tejidos animales consiste en que el peso molecular del hialuronano durante la purificación es reducido debido a que los tejidos animales contienen también una enzima degradadora del hialuronano (hialuronidasa).

Además de las hialuronidasas y exotoxinas mencionadas, las cepas de *Streptococcus* producen también endotoxinas que, cuando están presentes en productos farmacológicos, suponen riesgos para la salud del paciente. En un estudio científico, se ha mostrado que los productos médicos que contienen hialuronano en el mercado contienen cantidades detectables de endotoxinas bacterianas (Dick y col., 2003, Eur J Pharmacol. 13(2), 176-184). Una desventaja adicional del hialuronano producido con la ayuda de cepas de *Streptococcus* es el hecho de que el hialuronano aislado tiene un peso molecular más bajo que el hialuronano aislado de crestas de gallo (Lapcik y col.

1998, Chemical Reviews 98(8), 2663-2684). El documento US 20030134393 describe el uso de una cepa de *Streptococcus* para producir hialuronano que sintetiza una cápsula de hialuronano particularmente pronunciada (supercapsulada). El hialuronano aislado tras la fermentación tenía un peso molecular de  $9,1 \times 10^6$  Da. Sin embargo, el rendimiento fue solo de 350 mg por litro.

- 5 Se pueden evitar algunas de las desventajas de producir hialuronano mediante fermentación bacteriana o mediante aislamiento de tejidos animales produciendo hialuronano utilizando plantas transgénicas; sin embargo, las cantidades de hialuronano conseguidas actualmente se pueden producir utilizando plantas transgénicas que requerirían grandes áreas de cultivo para producir cantidades relativamente grandes de hialuronano. Además, el aislamiento o la purificación de hialuronano procedente de plantas que tienen un contenido de hialuronano menor es considerablemente más complicado y costoso que el aislamiento o la purificación de plantas que tienen un contenido de hialuronano mayor.

Aunque el hialuronano tiene propiedades inusuales, es, debido a su escasez y al elevado precio, utilizado raramente, en todo caso, para aplicaciones industriales.

- 15 Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar medios y procedimientos que permitan la provisión de hialuronano en cantidades y calidad suficientes y que hacen posible proporcionar hialuronano incluso para aplicaciones industriales y aplicaciones en el campo de los alimentos y de la alimentación.

Este objeto se consigue mediante las realizaciones reseñadas en las reivindicaciones.

- 20 Por tanto, la presente invención se refiere a una célula vegetal genéticamente modificada que tiene una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa vinculada a secuencias reguladoras que aseguran la transcripción en células vegetales integradas de manera estable en su genoma, en el que dicha célula vegetal tiene adicionalmente una pluralidad de moléculas de ácido nucleico extrañas integradas de manera estable en su genoma, en el que una molécula de ácido nucleico extraño codifica una proteína que tiene la actividad de una glutamina: la fructosa 6-fosfato amidotransferasa-2 (GFAT-2) que se origina a partir de animales o una glutamina: la fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT) que se origina a partir de bacterias y una segunda molécula de un ácido nucleico extraño que codifica una proteína que tiene la actividad de una UDP-glucosa deshidrogenasa (UDP-Glc-DH) y en la que dicha célula vegetal genéticamente modificada tiene una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad de una glutamina fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT) y una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad de una UDP-glucosa deshidrogenasa (UDP-Glc-DH) en comparación con las células vegetales no modificadas genéticamente correspondientes.

- 30 La presente invención se refiere también a plantas que comprenden células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención.

- 35 Aquí, la modificación genética de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención puede ser cualquier modificación genética que da como resultado una integración estable de una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa en una célula vegetal o una planta.

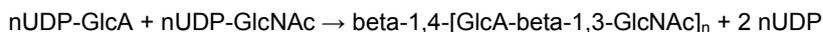
- 40 En el contexto de la presente invención, el término "célula vegetal natural", debe entenderse que significa células vegetales que han servido como material de partida para la preparación de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, es decir, su información genética, aparte de las modificaciones genéticas introducidas y que dan como resultado una integración estable de una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa y aumentando la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT, y aumentando la actividad de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH, corresponde a la de una célula vegetal genéticamente modificada de acuerdo con la invención.

- 45 En el contexto de la presente invención, el término "planta natural", debe entenderse que significa plantas que han servido como material de partida para la preparación de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, es decir, su información genética, aparte de las modificaciones genéticas introducidas y que dan como resultado una integración estable de una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa y aumentando la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT, y aumentando la actividad de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH, corresponde a la de una planta genéticamente modificada de acuerdo con la invención.

- 50 En el contexto de la presente invención, el término "correspondiente" significa que, cuando se comparan una pluralidad de objetos, los objetos en cuestión que se comparan entre sí han de mantenerse en las mismas condiciones. En el contexto de la presente invención, el término "que corresponde" en el contexto de células vegetales naturales o de plantas naturales significa que las células vegetales o las plantas en comparación entre sí se han cultivado en las mismas condiciones de cultivo y que tienen la misma edad (del cultivo).

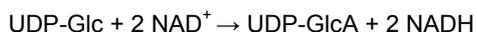
- 55 En el contexto de la presente invención, el término "hialuronano sintasa" (EC 2.4.1.212) debe entenderse que significa una proteína que sintetiza hialuronano procedente de los sustratos del ácido UDP-glucurónico (UDP-GlcA) y de la N-acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc). La síntesis de hialuronano está catalizada de acuerdo con los siguientes

esquemas de reacción:

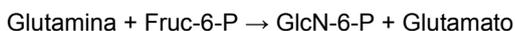


Se han descrito moléculas de ácidos nucleicos y las secuencias de proteínas correspondientes que codifican las hialuronano sintasas, entre otras cosas, para los siguientes organismos: conejo (*Oryctolagus cuniculus*) ocHas2 (EMBL AB055978.1, documento US 20030235893), ocHas3 (EMBL AB055979.1, documento US 20030235893); babuino (*Papio anubis*) paHas1 (EMBL AY463695.1); rana (*Xenopus laevis*) xlHas1 (EMBL M22249.1, documento US 20030235893), xlHas2 (DG42) (EMBL AF168465.1), xlHas3 (EMBL AY302252.1); ser humano (*Homo sapiens*) hsHAS1 (EMBL D84424.1, documento US 20030235893), hsHAS2 (EMBL U54804.1, documento US 20030235893), hsHAS3 (EMBL AF232772.1, documento US 20030235893); ratón (*Mus musculus*), mmHas1 (EMBL D82964.1, documento US 20030235893), mmHAS2 (EMBL U52524.2, documento US 20030235893), mmHas3 (EMBL U86408.2, documento US 20030235893); vaca (*Bos taurus*) btHas2 (EMBL AJ004951.1, documento US 20030235893); pollo (*Gallus gallus*) ggHas2 (EMBL AF106940.1, documento US 20030235893); rata (*Rattus norvegicus*) rnHas 1 (EMBL AB097568.1, Itano y col., 2004, J. Biol. Chem. 279 (18) 18679-18678), rnHas2 (EMBL AF008201.1); rnHas 3 (NCBI NM\_172319.1, Itano y col., 2004, J. Biol. Chem. 279 (18) 18679-18678), caballo (*Equus caballus*) echAS2 (EMBL AY056582.1, GI:23428486, cerdo (*Sus scrofa*) sscHAS2 (NCBI NM\_214053.1, GI:47522921, sscHas 3 (EMBLAB159675), pez cebra (*Danio rerio*) brHas1 (EMBL AY437407), brHas2 (EMBL AF190742.1) brHas3 (EMBL AF190743.1); *Pasteurella multocida* pmHas (EMBL AF036004.2); *Streptococcus pyogenes* spHas (EMBL, L20853.1, L21187.1, documentos US 6.455.304, documento US 20030235893); *Streptococcus equis* seHas (EMBL AF347022.1, AY173078.1), *Streptococcus uberis* suHasA (EMBL AJ242946.2, documento US 20030235893), *Streptococcus equisimilis* seqHas (EMBL AF023876.1, documento US 20030235893); *Sulfolobus solfataricus* ssHAS (US 20030235893), *Sulfolobus tokodaii* stHas (AP000988.1), *Paramecium bursaria Chlorella Virus 1*, cvHAS (EMBL U42580.3, PB42580, documento US 20030235893).

En el contexto de la presente invención, el término "UDP-glucosa deshidrogenasa (UDP-Glc-DH)" (E.C. 1.1.1.22) debe entenderse que significa una proteína que sintetiza, a partir de la UDP-glucosa (UDP-Glc) y  $\text{NAD}^+$ , ácido UDP-glucurónico (UDP-GlcA) y NADH. Esta catálisis procede de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:



En el contexto de la presente invención, el término "glutamina: fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT)" (E.C. 2.6.1.16), denominado también en la bibliografía experta glucosamina sintasa, debe entenderse que significa una proteína que sintetiza, a partir de los materiales de partida glutamina y fructosa 6-fosfato (Fruc-6-P), la glucosamina 6-fosfato (GlcN-6-P). Esta catálisis procede de acuerdo con el siguiente esquema de reacción: /



En particular en organismos animales, ha sido posible demostrar dos isoformas diferentes de proteínas que tienen la actividad (enzimática) de una GFAT (denominadas GFAT-1 y GFAT-2, respectivamente, en la bibliografía). Hu y col. (2004), J. Biol. Chem. 279(29), 29988-29993 describe las diferencias de las respectivas proteínas procedentes del ratón: además de las diferencias en la expresión específica del tejido de las proteínas en cuestión que tienen la actividad (enzimática) de una glutamina: la fructosa 6-fosfato amidotransferasa 1 (GFAT-1) y una glutamina:fructosa 6-fosfato amidotransferasa 2 (GFAT-2), ha sido posible mostrar que ambas isoformas están reguladas mediante fosforilación por una proteína quinasa dependiente de AMPc. la actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT-1 está inhibida por la fosforilación de un resto de serina conservado (serina 205 en la GFAT-1 procedente del ratón, N° de acceso al GenBank: AF334736.1) de la secuencia de aminoácidos en cuestión, mientras que la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 está aumentada por la fosforilación de un resto de serina conservado (serina 202 en la GFAT-2 procedente del ratón, N° de acceso al GenBank: NM\_013529) de la secuencia de aminoácidos en cuestión. Ambas proteínas que tienen la actividad de una GFAT-1 y las proteínas que tienen la actividad de una GFAT-2 están inhibidas de una manera dependiente de la concentración por la UDP-N-acetilglucosamina; sin embargo, para una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2, la inhibición por la UDP-N-acetilglucosamina es menor (reducción máxima de la actividad por la UDP-N-acetilglucosamina es aproximadamente del 15%) en comparación con una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 (la reducción máxima de la actividad por la UDP-N-acetilglucosamina es aproximadamente del 51% o del 80%). Existen indicaciones de que la inhibición de una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 en organismos animales se basa en el hecho de que a concentraciones elevadas de UDP-N-acetilglucosamina existe una glicosilación de la O-glucosa-N-acetilglucosamina de las proteínas en cuestión. No se entiende todavía completamente si tiene también lugar una regulación de la actividad de las proteínas mediante O-glicosilación en células vegetales (Huber y Hardin, 2004, Current Opinion in Plant Biotechnology 7, 318-322).

En el contexto de la presente invención, debe entenderse que el término "glutamina: la fructosa 6-fosfato amidotransferasa-1 (GFAT 1)" significa una proteína que tiene la actividad de una GFAT y cuya actividad está inhibida por la fosforilación de una proteína quinasa dependiente de AMPc.

En el contexto de la presente invención, el término "glutamina: la fructosa 6-fosfatoamidotransferasa-2 (GFAT-2)" debe entenderse que significa una proteína que tiene la actividad de una GFAT y que se activa mediante

fosforilación por una proteína quinasa dependiente de AMPc.

En el contexto de la presente invención, el término "glutamina: la fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT)" se usa como un término comprensivo que incluye todas las proteínas que tienen la actividad de una GFAT. Por consiguiente, comprende también proteínas que se denominan en la bibliografía "glutamina: la fructosa 6-fosfatoamidotransferasa-1 (GFAT-1)" o "glutamina: la fructosa 6-fosfato amidotransferasa-2 (GFAT-2)", pero no se limita a estas.

En el contexto de la presente invención, El término "actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT" significa una expresión aumentada de los genes endógenos que codifican las proteínas que tienen la actividad de una GFAT y/o una cantidad aumentada de transcritos que codifican las proteínas que tienen la actividad de una GFAT y/o una cantidad aumentada de proteína que tiene la actividad de una GFAT en las células y/o una actividad enzimática aumentada de las proteínas que tienen la actividad de una GFAT en las células.

En el contexto de la presente invención, el término "actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH" significa una expresión aumentada de los genes endógenos que codifican las proteínas que tienen la actividad de una UDP-Glc-DH y/o una cantidad aumentada de transcritos que codifican las proteínas que tienen la actividad de una UDP-Glc-DH en las células y/o una actividad enzimática aumentada de la actividad de las proteínas que tienen la actividad de una UDP-Glc-DH en las células.

Las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo la invención o las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención cumplen en cada caso al menos una de las condiciones mencionadas anteriormente, lo que significa una actividad enzimática aumentada de una proteína para las proteínas que tienen la actividad (enzimática) de una GFAT y para las proteínas que tienen la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH.

Se puede determinar una expresión aumentada, por ejemplo, midiendo la cantidad de transcritos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT o que codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH, por ejemplo, mediante el análisis de la transferencia Northern o mediante la RT-PCR. Aquí, un aumento significa preferiblemente un aumento en la cantidad de transcritos en comparación con las células vegetales naturales no modificadas genéticamente correspondientes o las plantas naturales no modificadas genéticamente en al menos un 50%, en particular en al menos un 70%, preferiblemente en al menos un 85% y de forma particularmente preferible en al menos un 100%. Un aumento de la cantidad de transcritos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT o que codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH significa también que las plantas o células vegetales que no tienen cantidades detectables de transcritos codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT y/o codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH que tiene, tras modificación genética de acuerdo con la invención, cantidades detectables de transcritos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT o que codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH.

Se puede determinar el aumento en la cantidad de proteína que tiene la actividad de una GFAT o de proteínas que tienen la actividad de una UDP-Glc-DH da como resultado una actividad aumentada de estas proteínas en las células vegetales en cuestión, por ejemplo, mediante procedimientos inmunológicos, tales como el análisis de la transferencia Western, ELISA (Enzimoinmunoanálisis de adsorción) o RIA (Ensayo radioinmune). Las personas expertas en la materia conocen procedimientos para preparar anticuerpos que reaccionan específicamente con una proteína concreta, es decir, se unen específicamente a dicha proteína (véase, por ejemplo, Lottspeich y Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik [Bioanalysis], Spektrum akad. Verlag, Heidelberg, Berlín, ISBN 3-8274-0041-4). Algunas compañías (por ejemplo, Eurogentec, Bélgica) ofrecen la preparación de dichos anticuerpos como un servicio a la carta. Aquí, un aumento en la cantidad de proteína significa preferiblemente un aumento en la cantidad de proteína que tiene la actividad de una GFAT y/o de proteínas que tienen la actividad de una UDP-Glc-DH en comparación con las células vegetales no modificadas genéticamente correspondientes en al menos un 50%, en particular en al menos un 70%, preferiblemente en al menos un 85% y de forma particularmente preferible en al menos un 100%. Un aumento de la cantidad de proteína que tiene la actividad de una GFAT y/o de proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH significa también que las plantas o células vegetales que no tienen cantidades detectables de una proteína que tiene la actividad de una GFAT y/o que no tiene actividad detectable de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH que tiene, tras modificación genética de acuerdo con la invención, una cantidad detectable de una proteína que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT y/o una cantidad detectable de una proteína que tiene la actividad de una proteína UDP-Glc-DH.

Se puede determinar la actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad de una GFAT en extractos vegetales mediante procedimientos conocidos por la persona experta en la materia que se describen, por ejemplo, en Samac y col. (2004, Applied Biochemistry and Biotechnology 113-116, Humana Press, Editor Ashok Mulehandani, 1167-1182, ISSN 0273-2289). Se proporciona un procedimiento preferido para determinar la cantidad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT en General Methods, artículo 6.

La actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH en extractos vegetales puede describirse usando los procedimientos conocidos de las personas expertas en la materia, tal como se describen, por ejemplo, En el documento WO 00/11192 se proporciona procedimiento preferido para determinar la cantidad de la actividad de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH en General Methods, artículo 7.

Una cantidad aumentada de actividad (enzimática) de proteínas que tienen la actividad de una o de proteínas que tienen la actividad de una UDP-Glc-DH significa preferiblemente un aumento de la actividad de dichas proteínas en al menos un 50%, preferiblemente en al menos un 70%, de forma especialmente preferible en al menos un 85% y de manera especialmente preferible en al menos un 100% en comparación con las células vegetales naturales no modificadas genéticamente correspondientes o las plantas naturales no modificadas genéticamente. Un aumento de la cantidad de actividad (enzimática) de proteínas que tiene la actividad de una GFAT y/o de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH significa también que las plantas o células vegetales que no tienen cantidades detectables de una proteína que tiene la actividad de una GFAT y/o que no tiene actividad detectable de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH que tiene, tras modificación genética de acuerdo con la invención, una cantidad detectable de una proteína que tiene la actividad de una GFAT y/o una cantidad detectable de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH.

En el contexto de la presente invención, debe entenderse que el término "genoma" significa el material genético completo presente en una célula vegetal. Una persona experta en la materia sabe que, además del núcleo, otros compartimentos (por ejemplo, plástidos, mitocondrias) contienen también material genético.

En el contexto de la presente invención, el término "molécula de ácido nucleico integrada de manera estable" debe entenderse que significa la integración de una molécula de ácido nucleico en el genoma de la planta. Una molécula de ácido nucleico integrada de manera estable se caracteriza porque, durante la replicación del sitio de integración correspondiente, se multiplica junto con las secuencias del ácido nucleico del hospedador que bordean el sitio de integración, de tal manera que el sitio de integración en la hebra de ADN replicada está rodeado por las mismas secuencias de ácidos nucleicos que en la hebra leída que sirve como matriz para la replicación.

Están disponibles un gran número de técnicas para integrar de forma estable moléculas de ácido nucleico en una célula vegetal hospedadora. Estas técnicas incluyen la transformación de células vegetales con ADN-T utilizando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como medio de transformación, fusión de protoplastos, inyección, electroporación del ADN, introducción del ADN mediante la solución biolística y también opciones adicionales (revisión en "Transgenic Plants", Leandro ed., Humana Press 2004, ISBN 1-59259-827-7).

El uso de la transformación mediada por agrobacterium de las células vegetales ha sido sujeto a estudios en profundidad y se ha descrito exhaustivamente en el documento EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V. Alblasserdam (1985), Capítulo V; Fraley y col., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 y en An y col. EMBO J. 4, (1985), 277-287. Para la transformación de patatas véase, por ejemplo, Rocha-Sosa y col., EMBO J. 8, (1989), 29-33, para la transformación de plantas de tomate véase, por ejemplo, documento US 5.565.347.

Se ha descrito también la transformación de plantas monocotiledóneas utilizando vectores basados en *Agrobacterium*, (Chan y col., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei y col., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng y col, Science in China 33, (1990), 28-34; Wilmink y col., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May y col., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner y Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie y col, Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Un sistema alternativo para transformar plantas monocotiledóneas es la transformación utilizando la solución biolística (Wan y Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48; Vasil y col., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala y col., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325; Spencer y col., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), la transformación de protoplastos, la electroporación de células parcialmente permeabilizadas, la introducción de ADN utilizando fibras de vidrio. En particular, se ha descrito la transformación del maíz algunas veces en la bibliografía (véase, por ejemplo, documento WO95/06128, documentos EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm y col., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm y col., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel y col., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc y col., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726). se ha descrito también la transformación de otras hierbas, tales como, por ejemplo, pasto varilla (*Panicum virgatum*) (Richards y col., 2001, Plant Cell Reporters 20, 48-54).

Se ha descrito también la transformación satisfactoria de otras especies de cereales, por ejemplo, para la cebada (Wan y Lemaux, véase anteriormente; Ritala y col., véase anteriormente; Krens y col., Nature 296, (1982), 72-74) y para el trigo (Nehra y col., Plant J: 5, (1994), 285-297; Becker y col., 1994, Plant Journal 5, 299-307). Todos los procedimientos anteriores son adecuados en el contexto de la presente invención.

En comparación con la técnica anterior, las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención ofrecen la ventaja de que producen mayores cantidades de hialuronano que las plantas que tienen solo la actividad de la hialuronano sintasa. Esto permite que producir hialuronano barato debido al aislamiento del hialuronano a partir de plantas que tienen un contenido mayor de hialuronano sea menos complicado y más económico. Además, en comparación con las plantas descritas en la materia anterior, se requieren áreas de cultivo más pequeñas para producir hialuronano utilizando las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención. Esto conduce a la posibilidad de proporcionar hialuronano en cantidades suficientes incluso para aplicaciones industriales en las que no se utiliza actualmente debido a su escasez y a su elevado precio. Los organismos vegetales infectados con virus del género *Chlorella* son inadecuados para producir grandes cantidades de hialuronano. En la producción de hialuronano, las algas infectadas con virus tienen la desventaja de que los genes requeridos por la hialuronano sintasa no se integran de

forma estable en su genoma (Van Etten y Meints, 1999, Annu. Rev. Microbiol. 53, 447-494), de esta manera, para producir hialuronano, ha de repetirse la infección vírica. Por consiguiente, no es posible aislar células de *Chlorella* individuales que sintetizan continuamente la cualidad y cantidad de hialuronano deseada. Además, en algas *Chlorella* infectadas con virus, hialuronano se produce solo durante un periodo limitado de tiempo, y como resultado de la lisis producida por el virus, las algas mueren solo aproximadamente 8 horas después de la infección (Van Etten y col., 2002, Arch Virol 147, 1479-1516). Por el contrario, la presente invención ofrece la ventaja de que las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención y las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención se pueden propagar de una manera ilimitada vegetativa o sexualmente y que producen hialuronano continuamente.

Las plantas transgénicas descritas en el documento WO 05/012529, que tienen una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa, sintetizan una cantidad relativamente pequeñas de hialuronano. Por el contrario, La presente invención ofrece la ventaja de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención y plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención sintetizan cantidades considerablemente mayores de hialuronano.

Por consiguiente, La presente invención proporciona también células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención que sintetizan hialuronano. las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención sintetizan preferiblemente al menos 100, con preferencia al menos 600, de forma particularmente preferible al menos 1000 y de manera especialmente preferible al menos 1500 µg de hialuronano por g de peso fresco (PF) de material vegetal.

Preferiblemente, las células vegetales de acuerdo con la invención o las plantas de acuerdo con la invención sintetizan casi 25000 µg de hialuronano por gramo de peso fresco, con preferencia casi 20000 µg de hialuronano por gramo de peso fresco, de forma particularmente preferible casi 15000 µg de hialuronano por gramo de peso fresco, de forma especialmente preferible casi 10000 µg de hialuronano por gramo de peso fresco y mayormente preferible casi 6500 µg de hialuronano por gramo de peso fresco.

Para determinar el contenido de hialuronano con respecto al peso fresco en células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, se da preferencia a utilizar el procedimiento de trabajo del material vegetal descrito en los Procedimientos Generales, artículo 2 y el procedimiento para determinar la cantidad de hialuronano descrita en los Procedimientos Generales, artículo 4.

La presente invención proporciona también células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención sintetizan preferiblemente al menos 1000, preferiblemente al menos 2000, de forma particularmente preferible al menos 4000, de manera especialmente preferible al menos 5000 µg de hialuronano por g de peso seco (PS) de material vegetal. Para determinar el contenido de hialuronano con respecto al peso seco en las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, se da preferencia a utilizar el procedimiento de trabajo del material vegetal descrito en el Ejemplo 13 k) y el procedimiento para determinar la cantidad de hialuronano descrito en los Procedimientos Generales, artículo 4.

Se ha observado que, en el tiempo de desarrollo, se acumula hialuronano en el tejido vegetal; de acuerdo con ello, la cantidad de hialuronano con respecto al peso fresco o con respecto al peso seco en las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o en las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención se va a determinar con preferencia particular durante la cosecha o unos pocos (uno o dos) días antes de la cosecha de las células vegetales en cuestión o de las plantas en cuestión. Aquí, se hace uso en particular de material vegetal (por ejemplo, tubérculos, semillas, hojas) con respecto a la cantidad de hialuronano que se va a usar para procesar adicionalmente.

Las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención que sintetizan hialuronano se pueden identificar aislando el hialuronano que se sintetiza en ellas y sondeando su estructura.

Debido a que el tejido vegetal tiene la ventaja de que no contiene hialuronidasas, se puede usar un procedimiento de aislamiento sencillo y rápido para confirmar la presencia de hialuronano en células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención. Con este fin, se añade agua al tejido vegetal que se va a examinar y a continuación, el tejido vegetal se tritura mecánicamente (con la ayuda de, por ejemplo, un molino de perlas, un molino de ruedas trituradoras, una mezcladora Warring, un extractor de zumo, etc.). Si es necesario, a continuación se puede añadir más agua a la suspensión, y a continuación se eliminan los desechos celulares y los componentes insolubles en agua mediante centrifugación o tamizado. A continuación se puede demostrar la presencia de hialuronano en el sobrenadante obtenido utilizando, por ejemplo, una proteína que se une específicamente al hialuronano. Se describe un procedimiento para detectar hialuronano con la ayuda de una proteína que se une específicamente así hialuronano, por ejemplo, en el documento US 5.019.498. Los kits de ensayo para realizar el procedimiento descrito en el

documento US 5.019.498 están comercialmente disponibles (por ejemplo, el kit de ensayo del ácido hialurónico (AH) de Corgenix, Inc., Colorado, EE.UU., Prod. N° 029-001; véase también Procedimientos Generales artículo 4). En paralelo, es posible digerir inicialmente una alícuota del sobrenadante de la centrifugación obtenido con una hialuronidasa y a continuación confirmar la presencia de hialuronano con la ayuda de la proteína que se une específicamente al hialuronano, tal como se describe anteriormente. Mediante la acción de la hialuronidasa en el lote paralelo, se degrada el hialuronano presente en el anterior, de tal manera que tras la digestión completa no es posible detectar durante más tiempo cantidades significativas de hialuronano.

La presencia de hialuronano en el sobrenadante de la centrifugación puede además confirmarse también utilizando otros procedimientos de análisis tales como, por ejemplo, IR, RMN o espectrometría de masas.

Como ya se ha discutido anteriormente, no está claro que la ruta metabólica (ruta de las hexosas fosfato o ruta metabólica oxidativa del *mio*-inositol) se usa principalmente en células vegetales para sintetizar ácido UDP-glucurónico, y cualquiera de ambas rutas metabólicas puede realizar diferentes contribuciones cuantitativas a la síntesis del ácido UDP-glucurónico, dependiendo del tejido y/o de la etapa de desarrollo de la planta. Además, la expresión en exceso de una UDP-Glc-DH en plantas transgénicas no conduce a resultados consistentes, y no ha sido posible conseguir el objetivo de aumentar el contenido de pectina de la pared celular adoptando dicha solución. De manera adicional, la regulación de la actividad de las proteínas que tienen la actividad de una UDP-Glc-DH se inhibió por la UDP-xilosa. Esto se ha demostrado para proteínas relevantes originadas de procariotas (Campbell y col., 1997, J. Biol. Chem. 272(6), 3416-3422; Schiller y col., 1973, Biochim. Biophys Acta 293(1), 1-10), procedentes de organismos animales (Balduini y col., 1970, Biochem. J. 120 (4), 719-724) y procedentes de plantas (Hinterberg, 2002, Plant Physiol. Biochem. 40, 1011-1017). Además, los productos de reacción del ácido glucurónico y el NADH originados de la reacción catalizada por una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH son inhibidores que regulan la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT (Campbell y col., 1997, J. Biol. Chem. 272(6), 3416-3422, Ordman y Kirkwood, 1977, Biochim Biophys Acta 482(1) 25-32; Turner y Botha, 2002, Archives of Biochem. Biophys. 407, 209-216).

La expresión en exceso, en maíz, de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT fusionada traduccionalmente con un péptido de señalización plásmida dio como resultado un contenido de UDP-glucosamina aumentado, y la expresión en exceso citosólica, en maíz, de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT dio como resultado un contenido de glucosamina 1-fosfato aumentado en tejido del endospermo subterráneo. Sin embargo, UDP-glucosamina y glucosamina 1-fosfato no son materiales de partida para la síntesis de hialuronano por la hialuronano sintasa. Además, se sabe que la glucosamina tiene efecto citotóxico sobre células vegetales (Roberts y col., 1971, Plant Physiol. 48, 36-42) y que, si están presentes concentraciones relativamente elevadas en las células vegetales, se convierte en glucosamina 6-fosfato. Glucosamina 6-fosfato es probablemente tóxica para células vegetales (documento WO 98 35047, documento US 6.444.878). Además, se sabe que las proteínas que tienen la actividad de una GFAT pueden estar reguladas de una manera inhibidora por metabolitos que se forman en la ruta metabólica adicional para la síntesis de UDP-N-acetil-glucosamina. Las proteínas que tienen la actividad de una GFAT, se inhiben aisladas de eucariotas (con organismos animales y vegetales), por ejemplo, mediante la UDP-N-acetil-glucosamina, que es uno de los dos sustratos para la hialuronano sintasa (Konrfeld, 1967, J. Biol. Chem. 242(13), 3135-3141; Graack y col., 2001, Biochem. J. 360, 401-412; Mayer y col., 1968, Plant Physiol. 43, 1097-1107). Las proteínas bacterianas que tienen la actividad de una GFAT se inhiben por la glucosamina 6-fosfato, un producto de reacción directa de la reacción catalizada con GFAT (Deng y col., 2005, Metabolic Engineering 7, 201-214). No existen indicaciones en la bibliografía que puedan limitar la cantidad de hialuronano sintetizado en células vegetales.

Por consiguiente, Se ha encontrado de forma sorprendente que las células vegetales genéticamente modificadas o las plantas genéticamente modificadas que tienen una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa y que tiene adicionalmente una actividad GFAT aumentada y una actividad UDP-Glc-DH aumentada en comparación con las células vegetales genéticamente modificadas o las plantas genéticamente modificadas que tienen (solo) actividad hialuronano sintasa producen cantidades significativamente mayores de hialuronano.

En una realización preferida, La presente invención se refiere a células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, en la que producen una cantidad aumentada de hialuronano en comparación con las células vegetales genéticamente modificadas que tienen (solo) la actividad de una hialuronano sintasa o comparadas con las células vegetales genéticamente modificadas que tienen la actividad de una hialuronano sintasa y una actividad no aumentada de una proteína que tiene la actividad de una GFAT y una actividad no aumentada de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH. Preferiblemente, la cantidad de hialuronano producida con respecto al peso fresco del material vegetal en las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o en las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención es al menos de 1,5 veces, preferiblemente al menos 5 veces, de forma particularmente preferible al menos 7,5 veces y de manera especialmente preferible al menos 10 veces más, en comparación con las células vegetales genéticamente modificadas o en comparación con las plantas genéticamente modificadas que tienen (solo) la actividad de la hialuronano sintasa. Para determinar el aumento del contenido de hialuronano con respecto al peso fresco del material vegetal en las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, se prefiere comparar células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de

5 acuerdo con la invención con las células vegetales o las plantas correspondientes que tienen (solo) la actividad de la hialuronano sintasa, en la que debe compararse el material equivalente (por ejemplo, hoja, tubérculo) de células vegetales o plantas, deben compararse las células vegetales o plantas a partir de las cuales se tiene que haber cultivado este material en las mismas condiciones y en las que el contenido de hialuronano del material vegetal que

10 tiene una edad comparable (etapa de desarrollo). No se debe, por ejemplo, comparar hojas jóvenes de una planta con hojas viejas de otra planta o plantas. En el contexto de la presente invención, debe entenderse que el término "célula vegetal o planta que tiene (solo) la actividad de una hialuronanosintasa" significa una célula vegetal genéticamente modificada o una planta genéticamente modificada en la que la modificación genética consiste en que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa, en comparación con las células vegetales naturales no genéticamente modificadas correspondientes o con las plantas naturales no genéticamente modificadas.

15 En particular, "las células vegetales o plantas que tienen (solo) la actividad de una hialuronano sintasa" se caracterizan porque sintetizan hialuronano y en que no tienen modificaciones genéticas adicionales diferentes de las de la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa en células vegetales naturales no genéticamente modificadas o en plantas naturales no genéticamente modificadas. Preferiblemente, dichas plantas no tienen una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad de una GFAT y una actividad no aumentada de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH.

20 Se puede determinar la cantidad de hialuronano producida por células vegetales o plantas con la ayuda de los procedimientos que se han descrito ya anteriormente, usando, por ejemplo, un kit de ensayo comercial (por ejemplo, el kit de ensayo del ácido hialurónico (AH) de Corgenix, Inc., Colorado, EE.UU, Prod. N° 029-001). Se describe un procedimiento que se prefiere en el contexto de la presente invención para determinar el contenido de hialuronano en células vegetales o plantas en los Procedimientos Generales, artículo 4.

25 En una realización adicional de la presente invención, las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención son células vegetales de una planta verde terrestre o de plantas verdes terrestres, respectivamente, que sintetizan hialuronano.

En el contexto de la presente invención, el término "planta terrestre verde (Embriofita) debe entenderse como el definido en Strasburger, "Lehrbuch der Botanik" [Textbook of Botany], 34° ed., Spektrum Akad. Verl., 1999, ISBN 3-8274-0779-6).

30 Una realización preferida de la presente invención se refiere a células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas multicelulares o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención que son organismos multicelulares. Por consiguiente, esta realización se refiere a células vegetales o plantas que no originan plantas unicelulares (protistas) o que no son protistas.

35 Las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención pueden, en principio, células vegetales y plantas, respectivamente, o cualquier especie de planta, es decir, plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Existen preferiblemente plantas de cultivo, es decir, plantas cultivadas por el hombre con el fin de alimentar al hombre y a animales o para producir biomasa y/o para preparar sustancias para fines técnicos, fines industriales (por ejemplo, maíz, arroz, trigo, alfalfa, centeno, avena, cebada, mandioca, patata, tomate, pasto varilla (*Panicum virgatum*), sagú, frijol mungo, guisantes, sorgo, zanahorias, berenjenas, rábano, colza oleosa, soja, cacahuetes, pepinos, calabazas, melones, puerros, ajo, col, espinacas, batatas, espárragos, calabacines, lechuga, alcachofas, maíz dulce, chirivías, salsifí negro, patacas, banana, remolacha azucarera, caña de azúcar, remolacha, brócoli, col, cebolla, remolacha amarilla, diente de león, fresa, manzana, albaricoque, ciruela, melocotón, parras, coliflor, apio, pimientos, nabo sueco, ruibarbo). Particularmente preferidas son las plantas de tomate o patata.

40 En una realización preferida, la presente invención se refiere a células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención en las que la molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa se caracteriza porque codifica una hialuronano sintasa vírica. La molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa codifica preferiblemente una hialuronano sintasa de un virus que infecta algas.

45 Con respecto a un virus que infecta algas, la molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa codifica preferiblemente una hialuronano sintasa de un virus que infecta *Chlorella*, de forma particularmente preferible, una hialuronano sintasa de un *Paramecium bursaria Chlorella* virus 1 y de forma especialmente preferible una hialuronano sintasa de una cepa H1 de un *Paramecium bursaria Chlorella* virus.

50 En una realización preferida adicional, la presente invención se refiere a células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención en las que las moléculas de ácidos nucleicos que codifican la hialuronano sintasa se caracterizan porque los codones de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican una hialuronano sintasa están modificadas en comparación con los codones de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican la hialuronano sintasa del organismo que la hialuronano sintasa originada a partir de. Con particular preferencia, los codones de la hialuronano sintasa se han modificado de

tal manera que se adaptan a la frecuencia del uso de los codones de la célula vegetal o de la planta en cuyo genoma se integran o se van a integrar.

Debido a la degeneración del código genético, los aminoácidos se pueden codificar por uno o más codones. En diferentes organismos, los codones que codifican un aminoácido se usan a diferentes frecuencias. Adaptando los codones de una secuencia de codificación del ácido nucleico a la frecuencia de su uso en la célula vegetal o en la planta en cuyo genoma se expresa la secuencia que se va a integrar puede contribuir a una cantidad aumentada de proteína traducida y/o a la estabilidad del ARNm en cuestión en las células vegetales o plantas concretas. La persona experta en la materia puede determinar la frecuencia de uso de codones en las células vegetales o plantas en cuestión examinando cómo son posibles muchas secuencias de codificación de ácidos nucleicos para la frecuencia con la que se utilizan determinados codones para codificar un determinado aminoácido. La persona experta en la materia conoce la frecuencia de uso de codones de determinados organismos y se puede determinar de una manera sencilla y rápida utilizando programas informáticos. Los programas informáticos adecuados están públicamente accesibles y se proporcionan entre otras cosas de forma gratuita en Internet (por ejemplo <http://gcua.schoedl.de/>; <http://www.kazusa.or.jp/codon/>; <http://www.entelechon.com/eng/cutanalysis.html>). Adaptar los codones de una secuencia de codificación del ácido nucleico a la frecuencia de uso en la célula vegetal o en la planta en cuyo genoma se integra la secuencia que se va a expresar se puede realizar mediante mutagénesis *in vitro* o, preferiblemente, mediante síntesis de *nov*o de la secuencia génica. Las personas expertas en la materia conocen los procedimientos para la síntesis de *nov*o de secuencias de ácido nucleico. Se puede realizar una síntesis de *nov*o, por ejemplo, sintetizando inicialmente oligonucleótidos individuales de ácido nucleico, hibridando estos con oligonucleótidos complementarios de los anteriores, de tal manera que formen un ADN bicatenario, y a continuación uniendo los oligonucleótidos individuales bicatenarios de tal manera que se obtiene la secuencia de ácido nucleico deseada. Se puede externalizar la síntesis de *nov*o de secuencias de ácido nucleico incluyendo la adaptación de la frecuencia con la que se utilizan los codones de un determinado organismo diana a compañías que ofrecen este servicio (por ejemplo, Entelechon GmbH, Regensburg, Alemania).

La molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa se caracteriza preferiblemente porque codifica una hialuronano sintasa cuya secuencia de aminoácidos es al menos de 70%, preferiblemente al menos 80%, con preferencia al menos 90%, de forma especialmente preferible al menos 95% y los más preferible al menos 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 2. De manera más preferida, La molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa se caracteriza porque codifica una hialuronano sintasa que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 2.

La molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa puede ser al menos un 70%, preferiblemente al menos 80%, con preferencia al menos 90%, de forma especialmente preferible al menos 95% y lo más preferible al menos 98% idéntica a la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEC ID N° 1 o en la SEC ID N° 3. La molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa se caracteriza porque codifica una hialuronano sintasa que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 3.

El 25 del 8 de 2004, el plásmido IC 341-222, que comprende una molécula de ácido nucleico sintético que codifica que codifica la hialuronano sintasa de *Paramecium bursaria Chlorella virus* se depositó en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Brunswick, Alemania, con el número DSM16664, de acuerdo con el tratado de Budapest. Se puede derivar la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 2 de la región de codificación de la secuencia de ácidos nucleico integrada en el plásmido 341-222 para la hialuronano sintasa de *Paramecium bursaria Chlorella virus*.

Por consiguiente, la presente descripción se refiere también a células vegetales genéticamente modificadas o plantas genéticamente modificadas en las que las moléculas de ácidos nucleicos que codifican la hialuronano sintasa se caracterizan en que codifican una proteína cuya secuencia de aminoácidos se puede derivar de la región de codificación de la secuencia de ácidos nucleicos insertada en el plásmido DSM16664 o que esta codifica una proteína cuya secuencia de aminoácidos es al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, con preferencia al menos 90%, de forma especialmente preferible al menos 95% y lo más preferible al menos 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se deriva de la región de codificación de la secuencia de ácido nucleico insertada en el plásmido DSM 16664.

La presente descripción se refiere también a células vegetales genéticamente modificadas o plantas genéticamente modificadas en las que la molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa se caracteriza porque es la secuencia de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa integrada en el plásmido DSM16664 o que es al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, con preferencia al menos 90%, de forma especialmente preferible al menos 95% y lo más preferible al menos 98% idéntica a la secuencia de ácido nucleico integrada en el plásmido DSM16664.

La presente invención describe además células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención que se caracterizan porque tienen una molécula de ácido nucleico extraña integrada de manera estable en su genoma o una pluralidad de moléculas de ácido nucleico extrañas integradas de forma estable en su genoma, dicha molécula de ácido nucleico extraña o dichas moléculas de ácidos nucleicos extrañas aumentan la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT y aumentan

la actividad de una UDP-Glc-DH en comparación con las células vegetales no modificadas genéticamente o correspondientes a plantas naturales no modificadas genéticamente.

Puede ser una molécula de ácido nucleico extraña individual que, mediante la integración en el genoma de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, aumenta la actividad de la proteína que tiene la actividad de una GFAT y aumenta simultáneamente la actividad de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH en comparación con las células vegetales naturales correspondientes o con las plantas naturales correspondientes. Sin embargo, puede ser también una pluralidad de moléculas de ácido nucleico extrañas, una molécula de ácido nucleico extraña que aumenta la actividad de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH y otra molécula de ácido nucleico extraña que aumenta la actividad de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH en comparación con las células vegetales correspondientes o con las plantas naturales correspondientes. Si se integran una pluralidad de moléculas de ácidos nucleicos extrañas en el genoma de una célula vegetal genéticamente modificada de acuerdo con la invención o de una planta genéticamente modificada de acuerdo con la invención, ambas moléculas de ácidos nucleicos extrañas juntas pueden estar en un sitio en el genoma de la célula vegetal o de la planta, o se pueden localizar en diferentes sitios en el genoma de la célula vegetal o de la planta (por ejemplo, en diferentes cromosomas o en diferentes secciones de cromosomas). Por consiguiente, las moléculas de ácidos nucleicos extrañas pueden ser heredadas tanto como un locus de unión o como loci acoplados de acuerdo con las leyes de Mendel, o se pueden heredar como loci separados independientemente entre sí de acuerdo con las leyes de Mendel.

En el contexto de la presente invención, debe entenderse que el término "molécula de ácido nucleico extraña" significa una molécula que no se produce naturalmente en las células vegetales naturales correspondientes o que no se produce naturalmente en la disposición espacial concreta en las células vegetales naturales o que se localiza en un sitio en el genoma de la célula vegetal natural en el que no se produce naturalmente. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico extraña es una molécula recombinante que comprende diversos elementos cuya combinación o disposición espacial específica no se produce naturalmente en células vegetales.

En el contexto de la presente invención, debe entenderse que el término "molécula de ácido nucleico recombinante" significa una molécula de ácido nucleico que tiene diversas moléculas de ácidos nucleicos que no están presentes naturalmente en una combinación similar a la presente en una molécula de ácido nucleico recombinante. Por tanto, las moléculas de ácidos nucleicos recombinantes pueden, además de moléculas de ácidos nucleicos que codifican un hialuronano sintasa y/o una proteína que tiene la actividad de una GFAT o una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH, adicionalmente tienen secuencias de ácidos nucleicos que no están presentes naturalmente en combinación con las moléculas de ácidos nucleicos mencionadas. Las secuencias de ácidos nucleicos mencionadas que están presentes en una molécula de ácido nucleico recombinante en combinación con una molécula de ácido nucleico que codifica un hialuronano sintasa o una proteína que tiene la actividad de una GFAT y/o una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH pueden ser cualesquiera secuencias. Por ejemplo, pueden ser secuencias genómicas de ácidos nucleicos de plantas. Las secuencias de ácidos nucleicos adicionales mencionadas son preferiblemente secuencias reguladoras (promotores, y señales de finalización, potenciadores), las secuencias reguladoras particularmente preferibles que son activas en tejidos de plantas, de forma especialmente preferible las secuencias reguladoras específicas de tejidos que son activas en un tejido vegetal. La persona experta en la materia conoce los procedimientos para generar moléculas de ácidos nucleicos recombinantes y comprende los procedimientos de ingeniería genética, tales como, por ejemplo, la unión de moléculas de ácidos nucleicos mediante ligadura, recombinación genética o la síntesis *de novo* de moléculas de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª edición (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel y col., *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons; 5ª edición (2002), ISBN: 0471250929).

Las células vegetales genéticamente modificadas y las plantas genéticamente modificadas que tienen una molécula de ácido nucleico extraña integrada en su genoma o una pluralidad de moléculas de ácidos nucleicos extrañas integradas de forma estable en su genoma que codifican la hialuronano sintasa y que aumentan la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT y aumentan la actividad de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH en comparación con las células vegetales naturales no genéticamente modificadas o las plantas naturales no genéticamente modificadas se pueden distinguir de dichas células vegetales naturales y de dichas células vegetales, respectivamente, entre otras cosas por el hecho de que comprenden una molécula de ácido nucleico extraña que no se produce naturalmente en las células vegetales naturales y en las plantas naturales, respectivamente, o que dicha molécula está integrada en un sitio en el genoma de la célula vegetal genéticamente modificada de acuerdo con la invención o en el genoma de la planta genéticamente modificada de acuerdo con la invención en el que no se produce en células vegetales naturales y en plantas naturales, respectivamente, es decir, en un entorno genómico diferente. Además, dichas células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención y plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención pueden distinguirse de células vegetales naturales genéticamente modificadas y de plantas naturales no genéticamente modificadas, respectivamente, en que comprende al menos una copia de la molécula de ácido nucleico extraña integrada de forma estable en su genoma, si es adecuado además de copias de dicha molécula naturalmente presente en las células vegetales naturales o las plantas naturales. Si la(s) molécula(s) introducidas en las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención son copias adicionales de moléculas ya naturalmente presentes en las células vegetales naturales o las

plantas naturales, las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención y las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención pueden distinguirse de las células vegetales naturales y de las plantas naturales, respectivamente, en particular por el hecho de que esta copia adicional/estas copias adicionales se localiza/n en sitios en el genoma en el que está/están/no están presentes en células vegetales naturales y plantas naturales, respectivamente.

La integración estable de una molécula de ácido nucleico en el genoma de una célula vegetal o una planta puede demostrarse mediante procedimientos genéticos y/o procedimientos de biología molecular. Una integración estable de una molécula de ácido nucleico en el genoma de una célula vegetal o el genoma de una planta se caracteriza porque la progenie que ha heredado dicha molécula de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico integrada de forma estable está presente en el mismo entorno genómico que en la generación progenitora. La presencia de una integración estable de una secuencia de ácido nucleico en el genoma de una célula vegetal o en el genoma de una planta puede demostrarse utilizando procedimientos conocidos por la persona experta en la materia, entre otras cosas con la ayuda del análisis de la transferencia Southern del análisis RFLP (Polimorfismo de Longitud del Fragmento de Restricción) (Nam y col., 1989, *The Plant Cell* 1, 699-705; Leister y Dean, 1993, *The Plant Journal* 4 (4), 745-750), con procedimientos basados en la PCR, tales como, por ejemplo, el análisis de las diferencias de longitud en el fragmento amplificado (Polimorfismo de Longitud del Fragmento Amplificado, AFLP) (Castiglioni y col., 1998, *Genetics* 149, 2039-2056; Meksem y col., 2001, *Molecular Genetics and Genomics* 265, 207-214; Meyer y col., 1998, *Molecular and General Genetics* 259, 150-160) o utilizando fragmentos amplificados escindidos con la ayuda de las endonucleasas de restricción (Secuencias Polimórficas Amplificadas Escindidas, CAPS) (Koniczny y Ausubel, 1993, *The Plant Journal* 4, 403-410; Jarvis y col., 1994, *Plant Molecular Biology* 24, 685-687; Bachem y col., 1996, *The Plant Journal* 9 (5), 745-753).

La presente invención describe células vegetales genéticamente modificadas o plantas genéticamente modificadas que se caracterizan porque al menos una molécula de ácido nucleico extraña codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT o la al menos una molécula de ácido nucleico extraña codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH.

La presente invención describe células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención que se caracterizan porque una primera molécula de ácido nucleico extraña codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT y una segunda molécula de ácido nucleico extraña codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH.

La molécula de ácido nucleico extraña que codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT puede originarse a partir de bacterias, o, animales, de forma particularmente preferible a partir de mamíferos o bacterias y de manera especialmente preferible a partir de ratón o de *Escherichia coli*.

Con respecto a una molécula de ácido nucleico extraña que codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT que se origina a partir de organismos animales, se va a hacer uso preferiblemente de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT-2; con particular preferencia, la proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT-2 se origina a partir del ratón.

En vez de una molécula de ácido nucleico que se produce naturalmente que codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT, es posible también introducir una molécula de ácido nucleico generada mediante mutagénesis en las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, en la que dicha molécula de ácido nucleico extraña mutagenizada se caracteriza porque codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT con una reducida inhibición por los metabolitos (por ejemplo, del metabolismo de la glucosamina). La preparación de dichas moléculas de ácidos nucleicos mutagenizadas se describe de una manera ilustrativa para una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT de *Escherichia coli* en Deng y col. (2005, *Metabolic Engineering* 7, 201-214; documento WO 04/003175). Se describen mutantes de una proteína que tiene la actividad de una GFAT del ratón, por ejemplo, en Hu y col. (2004, *J. Biol. Chem.* 279 (29), 29988-29993).

De acuerdo con la invención, la molécula de ácido nucleico extraña que codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH puede originarse a partir de cualquier organismo; preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico se origina a partir de bacterias, hongos, animales, plantas o virus, de forma particularmente preferible a partir de bacterias, plantas o virus, de manera especialmente preferible a partir de virus.

Con respecto a los virus, la molécula de ácido nucleico extraña que codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH puede originarse preferiblemente a partir de un virus que infecta algas, con preferencia a partir de un virus que infecta algas del género *Chlorella*, de forma particularmente preferible a partir de un *Paramecium bursaria Chlorella* virus y de manera especialmente preferible a partir de un *Paramecium bursaria Chlorella* virus de una cepa H1.

En vez de una molécula de ácido nucleico que se produce naturalmente que codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH, es posible también introducir una molécula de ácido nucleico generada mediante mutagénesis en las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o las

plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, en la que dicha molécula de ácido nucleico extraña mutagenizada se caracteriza porque codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH con una reducida inhibición por los metabolitos (por ejemplo, del metabolismo del ácido glucurónico).

5 Los expertos en la materia conocen las moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT y se describen en la bibliografía. Por tanto, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT se describen a partir de virus, por ejemplo, para el *Chlorella virus* k2 (Nº de acceso de EMBL AB107976.1), a partir de bacterias, por ejemplo de *Escherichia coli* (Dutka-Malen, 1988, Biochemie 70 (2), 287-290; Nº de acceso de EMBL: L10328.1), a partir de hongos, por ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae* (Nº de acceso de EMBL AF334737.1, Watzel y col., 1989, J. Biol. Chem. 264, 8753-8758), *Aspergillus niger* (Nº de acceso de EMBL AY594332.1), *Candida albicans* (Nº de acceso EMBL X94753.1), a partir de insectos, por ejemplo de *Aedes aegypti* (Kato y col., 2002, insectos. Biol. 11 (3), 207, 216; Nº de acceso del EMBL AF399922.1), *Drosophila melanogaster* (GFAT-1: Nº de acceso del EMBL Y18627.1, GFAT-2: Nº de acceso del NCBI NM\_143360.2), a partir de algas de *Volvariella volvacea* (Nº de acceso de EMBL AY661466.1), a partir de vertebrados, por ejemplo de *Homo sapiens* (GFAT-1: Nº de acceso del EMBL AF334737.1; GFAT-2: Nº de acceso del NCBI BC000012.2, Oki y col., 1999, Genomics 57 (2), 227-34), *Mus musculus* (GFAT-1: Nº de acceso del EMBL AF334736.1; GFAT-2: Nº de acceso del EMBL ABO16780.1), o a partir de plantas, por ejemplo de *Arabidopsis thaliana* (Nº de acceso del EMBL AP001297.1; Nº de acceso del CDS NCBI BAB03027.1).

20 La presente descripción se refiere a células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención y plantas genéticamente modificadas en las que la molécula de ácido nucleico extraña que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT se selecciona entre el grupo que consiste en

- a) moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID Nº 10 o una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en la SEC ID Nº 12;
- b) las moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína cuya secuencia es al menos 60%, de forma preferible al menos 80%, con preferencia al menos 90%, de forma especialmente preferible al menos 95% y lo más preferible al menos 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 10 o de la SEC ID Nº 12;
- c) las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden las secuencias de nucleótidos que se muestran en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID Nº 9 o una secuencia complementaria a la anterior, la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº 11 o una secuencia complementaria de la anterior o la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID Nº 13 o una secuencia complementaria a la anterior;
- d) moléculas de ácidos nucleicos que son al menos 70%, de forma preferible al menos 80%, con preferencia al menos 90%, de forma especialmente preferible al menos 95% y lo más preferible al menos 98% idénticas a la secuencia de ácido nucleico descritas en a) o c);
- e) moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones restrictivas con al menos una hebra de las secuencias de ácidos nucleicos descritas en a) o c);
- f) moléculas de ácidos nucleicos cuyas secuencias de nucleótidos difieren de la secuencia de moléculas de ácidos nucleicos mencionadas en a) o c) debido a la degeneración del código genético; y
- g) moléculas de ácidos nucleicos que son fragmentos, variantes y/o derivados alélicos de las moléculas de ácidos nucleicos mencionadas en a), b), c), d), e) o f).

40 Se describen en la bibliografía moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH y las personas expertas en la materia las conocen. Por tanto, se describen moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH a partir de virus, por ejemplo para el *Chlorella virus* 1 (Nº de acceso del NCBI NC\_000852.3), a partir de bacterias, por ejemplo de *Escherichia coli* (Nº de acceso del EMBL: AF176356.1), a partir de hongos, por ejemplo de *Aspergillus niger* (Nº de acceso del EMBL AY594332.1), *Cryptococcus neoformans* (Nº de acceso del EMBL AF405548.1), a partir de insectos, por ejemplo de *Drosophila melanogaster* (Nº de acceso del EMBL AF001310.1), a partir de vertebrados, por ejemplo de *Homo sapiens* (Nº de acceso del EMBL AF061016.1), *Mus musculus* (Nº de acceso del EMBL AF061017.1), *Bos taurus* (Nº de acceso del EMBL AF095792.1), *Xenopus laevis* (Nº de acceso del EMBL AY762616.1) o a partir de plantas, por ejemplo álamos (Nº de acceso del EMBL AF053973.1), *Colocasia esculenta* (Nº de acceso del EMBL AY222335.1), *Dunaliella salina* (Nº de acceso del EMBL AY795899.1), *Glycine max* (Nº de acceso del EMBL U53418.1).

50 La presente descripción se refiere a células vegetales genéticamente modificadas de y plantas genéticamente modificadas en las que la molécula de ácido nucleico extraña que codifica una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH se selecciona entre el grupo que consiste en

- a) moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en la SEC ID Nº 5;
- b) las moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína cuya secuencia es al menos 60% "preferiblemente al menos 80%, con preferencia al menos 90%, de forma especialmente preferible al menos 95% y lo más preferible al menos 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos proporcionada en la SEC ID Nº 5;
- c) las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº 4 o una secuencia complementaria de la anterior o la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID Nº 6 o una secuencia complementaria de la anterior;
- d) las moléculas de ácidos nucleicos que son al menos 70%, de forma preferible al menos 80%, con preferencia

al menos 90%, de forma especialmente preferible al menos 95% y lo más preferible al menos 98% idénticas a las secuencias de ácidos nucleicos descritas en a) o c);

e) moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones restrictivas con al menos una hebra de las secuencias de ácidos nucleicos descritas en a) o c);

5 f) moléculas de ácidos nucleicos cuyas secuencias de nucleótidos difieren de la secuencia de moléculas de ácidos nucleicos mencionadas en a) o c) debido a la degeneración del código genético; y

g) moléculas de ácidos nucleicos que son fragmentos, variantes y/o derivados alélicos de las moléculas de ácidos nucleicos mencionadas en a), b), c), d), e) o f).

10 En el contexto de la presente invención, el término "hibridación" significa una hibridación en condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente en condiciones restrictivas, tal como se describen, por ejemplo, en Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Con particular preferencia, "hibridación" significa una hibridación en las condiciones siguientes:

Tampón de hibridación:

15 2xSSC; 10 x solución de Denhardt (Fikoll 400+PEG+BSA; relación 1:1:1); SDS al 0,1%; EDTA 5 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM; 250 µg/ml de ADN de esperma de arenque; 50 mg/ml de ARNt; o tampón fosfato de sodio 25 mM, pH 7,2; EDTA 1 mM;

SDS al 7%

Temperatura de hibridación:

20 T=65 a 68 °C

Tampón de lavado: 0,1xSSC; SDS al 0,1%

Temperatura de lavado: T=65 a 68 °C.

25 Las moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan con moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH pueden originarse a partir de cualquier organismo; de acuerdo con ello, pueden originarse a partir de bacterias, hongos, animales, plantas o virus.

30 Las moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan con moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH se originan preferiblemente a partir de un virus que infecta algas, con preferencia un virus que infecta algas del género *Chlorella*, de forma particularmente preferible a partir de un *Paramecium bursaria Chlorella* virus y de manera especialmente preferible a partir de un *Paramecium bursaria Chlorella* virus de una cepa H1.

Las moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan con moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT pueden originarse a partir de mamíferos, o bacterias y de forma especialmente preferible a partir de ratón o de *Escherichia coli*.

35 Las moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan con moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT -2 pueden originarse a partir de un organismo animal, preferiblemente a partir de ratón.

40 Se pueden aislar moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan con las moléculas mencionadas, por ejemplo, de bibliotecas genómicas o de ADNc. Dichas moléculas de ácidos nucleicos se pueden identificar y aislar utilizando las moléculas de ácidos nucleicos mencionadas o partes de estas moléculas o los complementos inversos de estas moléculas, por ejemplo, mediante hibridación de acuerdo con los procedimientos normalizados (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) o mediante amplificación usando la PCR.

45 Como muestra de hibridación para aislar una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH, es posible utilizar, por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos que tienen exacta o esencialmente las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la SEC ID N° 4 o en la SEC ID N° 6, o partes de estas secuencias.

50 Como muestra de hibridación para aislar una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT, es posible utilizar, por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos que tienen exacta o esencialmente las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la SEC ID N° 9 o en la SEC ID N° 11 o en la SEC ID N° 13, o partes de estas secuencias.

Los fragmentos usados como muestras de hibridación pueden ser también fragmentos sintéticos u oligonucleótidos preparados utilizando las técnicas de síntesis personalizadas, cuya secuencia es esencialmente idéntica a la molécula de ácido nucleico descrita en el contexto de la presente invención. Una vez que los genes que hibridan con las secuencias de ácidos nucleicos descritas en el contexto de la presente invención se identifican y aíslan, deben

determinarse la secuencia y deben analizarse las propiedades de las proteínas codificadas por esta secuencia para determinar si son proteínas que tienen la actividad de una GFAT, una GFAT-1 o una GFAT-2 o la actividad de una UDP-Glc-DH. Los procedimientos de cómo determinar si una proteína tiene la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT (por ejemplo Mayer y col., 1968, *Plant Physiol.* 43, 1097-1107; Deng y col., 2005, *Metabolic Engineering* 7, 201-214), una GFAT-1 o una GFAT-2 (por ejemplo Hu y col., 2004, *J. Biol. Chem.* 279 (29), 29988-29993) o una UDP-Glc-DH (por ejemplo De Luca y col., 1976, *Connective Tissue Research* 4, 247-254; Bar-Peled y col., 2004, *Biochem. J.* 381, 131-136; Turner y Botha, 2002, *Archives Biochem. Biophys.* 407, 209-216) son conocidos por las personas expertas en la materia y se describen, entre otras cosas, en la bibliografía descrita.

Las moléculas que hibridan con las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el contexto de la presente invención comprenden en particular derivados de fragmentos, y variantes alélicas de las moléculas de ácidos nucleicos mencionadas. En el contexto de la presente invención, el término "derivado" significa que las secuencias de estas moléculas difieren en una o más posiciones de las secuencias de las moléculas de ácidos nucleicos descritas anteriormente y son muy idénticas a estas secuencias. Las diferencias con las moléculas de ácidos nucleicos descritas anteriormente pueden, por ejemplo, ser debidas a delección, adiciones, sustitución, inserción o recombinación.

En el contexto de la presente invención, el término "identidad" significa una identidad de secuencia sobre la longitud completa de la región de codificación de una molécula de ácido nucleico o la longitud completa de una secuencia de aminoácidos que codifica una proteína de al menos 60%, en particular una identidad de al menos 70%, preferiblemente de al menos 80%, de forma particularmente preferible de al menos 90% y de forma especialmente preferible de al menos 95%. En el contexto de la presente invención, debe entenderse que el término "identidad" significa el número de aminoácidos/nucleótidos idénticos (identidad) con otras proteínas/ácidos nucleicos, expresada en porcentaje. Preferiblemente, la identidad con respecto a una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH se determina por comparación con la secuencia de aminoácidos proporcionada en la SEC ID N° 5, la identidad con respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH se determina por comparación con la secuencia de ácido nucleico proporcionada en la SEC ID N° 4 o en la SEC ID N° 6, la identidad con respecto a una proteína que tiene la actividad de una GFAT se determina por comparación con la secuencia de aminoácidos proporcionada en la SEC ID N° 10 o en la SEC ID N° 12, y la identidad con respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT se determina por comparación con la secuencia de ácido nucleico proporcionada en la SEC ID N° 9 o la SEC ID N° 11 o la SEC ID N° 13 con otras proteínas/ácidos nucleicos con la ayuda de programas informáticos. Si las secuencias que se van a comparar entre sí son de diferentes longitudes, la identidad se va a determinar determinando la identidad en porcentaje del número de aminoácidos que la secuencia más corta comparte con la secuencia más larga. Preferiblemente, la identidad se determina usando el programa ClustalW conocido y públicamente disponible (Thompson y col., *Nucleic Acids Research* 22(1994), 4673-4680). ClustalW se encuentra públicamente disponible de Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) y Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Alemania. ClustalW se puede descargar también de diversas páginas de Internet, entre otras del IGBMC (Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, Francia); <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/> y del EBI (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>) y de las páginas de Internet duplicadas del EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, Reino Unido).

Preferiblemente, se hace uso del programa informático ClustalW de la versión 1.8 para determinar la identidad entre las proteínas descritas en el contexto de la presente invención y otras proteínas. Aquí, los parámetros han de configurarse como sigue: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAOPEN=10, GAPEXTEND=0,05, GAPDIST=8, MAX-DIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP.

Preferiblemente, se hace uso del programa informático ClustalW de la versión 1.8 para determinar la identidad del ejemplo entre la secuencia de nucleótidos de las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el contexto de la presente invención y la secuencia de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos. Aquí, los parámetros han de configurarse como sigue:

KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAOPEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40,  
TRANSITIONS: sin ponderar.

La identidad significa además que existe una equivalencia funcional y/o estructural entre las moléculas de ácidos nucleicos en cuestión o las proteínas codificadas por ellas. Las moléculas de ácidos nucleicos que son homólogas a las moléculas descritas anteriormente y representan derivados de estas moléculas son generalmente variaciones de estas moléculas que representan modificaciones que tienen la misma función biológica. Pueden ser cualesquiera variaciones de origen natural, por ejemplo, secuencias de otras especies, o mutaciones, en las que estas mutaciones pueden haberse producido de manera natural o se han introducido mediante mutagénesis dirigida. Además, las variaciones pueden ser secuencias producidas sintéticamente. Las variantes alélicas pueden ser tanto variantes de origen natural como variantes producidas sintéticamente o variantes generadas mediante técnicas de ADN recombinante. Una forma especial de derivados son, por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos que difieren de las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el contexto de la presente invención debido a la degeneración del código genético.

Los diversos derivados de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT o una UDP-Glc-DH que tiene determinadas características comunes.

5 Estas pueden ser, por ejemplo, actividad biológica o enzimática, especificidad del sustrato, peso molecular, reactividad inmunológica, conformación, etc., y también propiedades físicas, tales como, por ejemplo, las propiedades de avance en la electroforesis en gel, comportamiento cromatográfico, coeficientes de sedimentación, solubilidad, propiedades espectroscópicas, estabilidad, pH óptimo, temperatura óptima, etc. Las personas expertas en la materia conocen las propiedades preferidas de las proteínas que tienen la actividad de una GFAT o una UDP-Glc-DH, se han mencionado ya anteriormente y son para aplicarse aquí de manera análoga.

10 En una realización preferida adicional, la presente invención se refiere a células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención en las que las moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT y/o que codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH se caracterizan porque los codones de dichas moléculas de ácidos nucleicos son diferentes de los codones de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican dicha proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT o codifican dicha proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH del organismo progenitor. De forma particularmente preferible, los codones de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT o que codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH se cambian de tal manera que se adaptan a la frecuencia de uso de los codones de la célula vegetal o de la planta en cuyo genoma se integran o se van a integrar.

20 La presente invención proporciona además células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención en la que las moléculas de ácidos nucleicos extrañas integradas de manera estable en el genoma de la célula vegetal o de la planta que codifican una hialuronano sintasa y/o que codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT y/o que codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH se unen a elementos reguladores que inician la transcripción en células vegetales (promotores). Estos pueden ser promotores homólogos o heterólogos. Los promotores pueden ser constitutivos, específicos de tejido, específicos de desarrollo o regulados por factores externos (por ejemplo, tras la aplicación de sustancias químicas, mediante la acción de factores abióticos, tales como calor y/o frío, sequía, enfermedad, etc.). Aquí, moléculas de ácidos nucleicos que codifican una hialuronano sintasa o una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT o una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH, cuyas moléculas de ácidos nucleicos se integran en el genoma de una célula vegetal genéticamente modificada de acuerdo con la invención o de una planta genéticamente modificada de acuerdo con la invención, pueden, en cada caso unirse al mismo promotor, o las secuencias individuales pueden unirse a diferentes promotores. Aquí, dos o tres promotores en cualquier combinación pueden en cada caso unirse a una molécula de ácido nucleico extraña relevante que codifica una hialuronano sintasa o a una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT o una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH en una célula vegetal genéticamente modificada de acuerdo con la invención o en una planta genéticamente modificada de acuerdo con la invención.

40 La presente descripción se refiere a células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o a plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención en las que al menos una molécula de ácido nucleico extraña, de forma particularmente preferible al menos dos moléculas de ácidos nucleicos extrañas, de manera especialmente preferible tres moléculas de ácidos nucleicos extrañas seleccionadas entre el grupo que consiste en moléculas de ácidos nucleicos que codifican una hialuronano sintasa o una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT o una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH se une(n) a un promotor específico de tejido. Los promotores específicos de tejido preferidos son promotores que inician la transcripción específicamente en tubérculos de plantas, frutos o células de semillas u hojas.

Para expresar moléculas de ácidos nucleicos que codifican una hialuronano sintasa o una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT o una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH, estas se unen a secuencias de ADN reguladoras que aseguran la transcripción en células vegetales. Estas incluyen promotores concretos. En general, cualquier promotor activo en células vegetales es adecuado para la expresión.

50 Aquí, el promotor puede escogerse de tal manera que la expresión es constitutiva o solo en un determinado tejido, en un determinado punto del desarrollo de la planta o en un punto temporal determinado por factores externos. Con respecto a la planta y con respecto a la molécula de ácido nucleico que se va a expresar, El promotor puede ser homólogo o heterólogo.

55 Los promotores adecuados son, por ejemplo, el promotor del ARN de 35S del virus del mosaico de la coliflor o del promotor de la ubiquitina procedente del maíz o del *Cestrum* YLCV (Virus de la Hoja Rizada Amarilla; documento WO 01 73087; Stavolone y col., 2003, Plant Mol. Biol. 53, 703-713) para una expresión constitutiva, el promotor B33 del patatingen (Rocha-Sosa y col., EMBO J. 8 (1989), 23-29) para una expresión específica de tubérculo en patatas o un promotor específico del fruto de tomate, tales como, por ejemplo, el promotor de la poligalacturonasa de tomate (Montgomery y col., 1993, Plant Cell 5, 1049-1062) o el promotor E8 de tomate (Metha y col., 2002, Nature Biotechnol. 20(6), 613-618) o el promotor de la ACC oxidasa de melocotón (Moon y Callahan, 2004, J. Experimental

- 5 Botany 55 (402), 1519-1528) o un promotor que asegura la expresión solo en tejidos fotosintéticamente activos, por ejemplo, el promotor ST-LS1 (Stockhaus y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus y col., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) o para una expresión específica de endospermo, el promotor HMWG de trigo, el promotor USP, el promotor de la faseolina, los promotores de los genes de la ceína de maíz (Pedersen y col., Cell 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio y col., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93), el promotor de la glutelina (Leisy y col., Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50; Zheng y col., Plant J. 4 (1993), 357-366; Yoshihara y col., FEBS Lett., 383 (1996), 213-218) o el promotor shrunken-1 (Werr y col., EMBO J. 4 (1985), 1373-1380), un promotor de la globulina (Nakase y col., 1996, Gene 170 (2), 223-226) o un promotor de la prolamina (Qu y Takaiwa, 2004, Plant Biotechnology Journal 2(2), 113-125). Sin embargo, es también posible usar promotores que son solo activos en un punto temporal determinado por factores externos (véase, por ejemplo, documento WO 9307279). De particular interés aquí pueden ser los promotores de las proteínas de choque térmico que permiten una inducción sencilla. Es posible además promotores específicos de semillas, tales como, por ejemplo, el promotor USP de *Vicia faba* que asegura una expresión específica de semilla en *Vicia faba* y otras plantas (Fiedler y col., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679; Baumlein y col., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467).
- 10
- 15 Es también adecuado el uso de promotores presentes en el genoma de virus que infectan para expresar las secuencias de ácidos nucleicos en plantas (Mitra y col., 1994, Biochem. Biophys Res Commun 204(1), 187-194; Mitra y Higgins, 1994, Plant Mol Biol 26(1), 85-93, Van Etten y col., 2002, Arch Virol 147, 1479-1516).
- En el contexto de la presente invención, debe entenderse que el término "específico de tejido" significa la limitación sustancial de una manifestación (por ejemplo, inicio de la transcripción) a un determinado tejido.
- 20 En el contexto de la presente invención, Los términos "célula de tubérculo, fruto o semilla" debe entenderse que significan todas las células presentes en un tubérculo, un fruto o en una semilla.
- En el contexto de la presente invención, debe entenderse que el término "promotor homólogo" significa un promotor que está presente naturalmente en células vegetales o plantas usadas para la preparación de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención (homólogas con respecto a la célula vegetal o a la planta) o significa un promotor que regula la regulación de la expresión de un gen en un organismo a partir del cual se ha aislado la secuencia (homóloga con respecto a la molécula de ácido nucleico que se va a expresar).
- 25
- En el contexto de la presente invención, debe entenderse que el término "promotor heterólogo" significa un promotor que no está presente naturalmente en células vegetales o plantas usadas para la preparación de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención (heterólogas con respecto a la célula vegetal o a la planta) o significa un promotor que está, en el organismo a partir del cual se ha aislado una molécula de ácido nucleico que se va a expresar, no presente naturalmente para regular la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico (heteróloga con respecto a la molécula de ácido nucleico que se va a expresar).
- 30
- 35 Puede estar también presente una secuencia de terminación (señal de poliadenilación) que sirve para añadir una cola poli-A al transcrito. Se piensa que la cola poli-A actúa en la estabilización de los transcritos. Se describen dichos elementos en la bibliografía (véase Gielen y col., EMBO J. 8 (1989), 23-29) y se pueden intercambiar según se desee.
- 40 Es también posible que se encuentren presentes secuencias intrónicas entre el promotor y la región de codificación. Dichas secuencias intrónicas pueden conducir a la estabilidad de la expresión y a una expresión aumentada en plantas (Callis y col., 1987, Genes Devel. 1, 1183-1200; Luehrsen, y Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-93; Rethmeier y col., 1997, Plant Journal 12(4), 895-899; Rose y Beliakoff, 2000, Plant Physiol. 122 (2), 535-542; Vasil y col., 1989, Plant Physiol. 91, 1575-1579; XU y col., 2003, Science in China Series C Vol. 46 No. 6, 561-569). Las secuencias intrónicas adecuadas son, por ejemplo, el primer intrón del gen sh1 de maíz, el primer intrón del gen 1 de la poliubiquitina de maíz, el primer intrón del gen EPSPS de arroz o uno de los dos primeros intrones del gen PAT1 de *Arabidopsis*.
- 45
- La presente invención se refiere también a plantas que comprenden células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención. Dichas plantas pueden producirse mediante regeneración de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención.
- 50 La presente invención se refiere también a partes procesables o consumibles de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención que comprenden células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención.
- En el contexto de la presente invención, debe entenderse que el término "partes procesables" significa partes de plantas que se usan para preparar alimentos comestibles y piensos, que se usan como fuente de materias primas en procedimientos industriales, como una fuente de materias primas para la preparación de productos farmacéuticos o como una fuente de materias primas para la preparación de productos cosméticos.
- 55
- En el contexto de la presente invención, debe entenderse que el término "partes consumibles" significa partes de

plantas que sirven como alimento al hombre o que se usan como alimento para animales.

La presente invención se refiere también a un material de propagación de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención que comprenden células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención.

5 Aquí, el término "material de propagación" comprende dos componentes de la planta que son adecuados para generar progenie mediante la ruta vegetativa o generativa. Adecuados para la propagación vegetativa son, por ejemplo, esquejes, cultivos de callos, rizomas o tubérculos. Otro material de propagación incluye, por ejemplo, frutos, semillas, plántulas, protoplastos, cultivos celulares, etc. El material de propagación toma preferiblemente la forma de tubérculos, frutos o semillas.

10 En una realización adicional, la presente invención se refiere a partes de plantas cosechables de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, tales como frutos, para almacenamiento y otras raíces, flores, botones florales, brotes, hojas o tallos, preferiblemente semillas, frutos o tubérculos, estas partes cosechables comprenden células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención.

15 Preferiblemente, la presente invención se refiere al material de propagación de acuerdo con la invención o a partes cosechables de plantas de acuerdo con la invención que comprenden hialuronano. Se prefiere particularmente el material de propagación de acuerdo con la invención o las partes cosechables de plantas de acuerdo con la invención que sintetizan hialuronano.

20 En el contexto de la presente invención, debe entenderse que el término "planta de patata" o "patata" significa especies de plantas del género *Solanum*, particularmente especies productoras de tubérculos del género *Solanum* y en particular *Solanum tuberosum*.

En el contexto de la presente invención, debe entenderse que el término "planta de tomate" o "tomate" significa especies de plantas del género *Lycopersicon*, en particular *Lycopersicon esculentum*.

25 Una ventaja adicional de la presente invención es que las partes cosechables, el material de propagación, las partes procesables o las plantas consumibles de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención comprenden más hialuronano que las plantas transgénicas sintetizadoras de hialuronano descritas en la bibliografía. Por consiguiente, las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención no son solo particularmente adecuadas para uso como materia prima a partir de la cual se puede aislar hialuronano sino que se pueden usar también directamente como alimentos comestibles/piensos o para preparar alimentos comestibles/piensos que tienen un carácter profiláctico o terapéutico (por ejemplo, para la profilaxis de la osteoartritis, documento US 6.607.745). debido a que las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención tienen un contenido de hialuronano mayor que las plantas descritas en la bibliografía, la preparación de dichos alimentos comestibles/piensos requiere cantidades menores de partes cosechables, el material de propagación, partes procesables o partes consumibles de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención. Si se consumen las partes consumibles de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, por ejemplo, directamente como se denominan de esta manera "nutracéuticas", es posible conseguir un efecto positivo ingiriendo incluso cantidades relativamente pequeñas de sustancias. Esto puede ser de particular significancia entre otras en la producción de alimentos animales, debido a que los alimentos animales tienen un contenido muy elevado de componentes de plantas, son inadecuados como piensos para diversas especies animales.

40 En virtud de la elevada capacidad del hialuronano de unirse al agua, las partes cosechables, el material de propagación, las partes procesables o las partes consumibles de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención tienen la ventaja de que se requieren menos espesantes cuando se produce el alimento comestible/pienso solidificado. Por tanto, por ejemplo, la producción de jaleas requiere menos azúcar lo que se asocia con un efecto positivo adicional sobre la salud. en la producción de alimentos comestibles/piensos en la que se requiere la deshidratación de la materia bruta de la planta, la ventaja de usar partes cosechables, el material de propagación, las partes procesables o las partes consumibles de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención consiste en el hecho de que ha de retirarse menos agua del material de la planta en cuestión, dando como resultado unos costes de producción más bajos y, debido a procedimientos de preparación más suaves (por ejemplo, una entrada de calor menor y/o más corta), un elevado valor nutritivo del alimento comestible/pienso en cuestión. Por tanto, por ejemplo, en la producción de salsa de tomate ha de introducirse menos energía a fin de conseguir la consistencia deseada.

50 La presente invención proporciona además un procedimiento para preparar una planta que sintetiza hialuronano, que comprende

a) modificar genéticamente una célula vegetal, en el que la modificación genética comprende las etapas i a iii siguientes

55 i) la introducción de una molécula de ácido nucleico extraña que codifica una hialuronano sintasa unida a secuencias reguladoras que aseguran la transcripción en células vegetales en la célula vegetal  
ii) introducción de una molécula de ácido nucleico extraña en la célula vegetal, la molécula de ácido

nucleico extraña que comprende una secuencia de codificación de una proteína que tiene la actividad de una glutamina: la fructosa 6-fosfato amidotransferasa-2 (GFAT-2) que se origina de animales o una glutamina: la fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT) que se origina de bacterias

5 iii) introducción de una molécula de ácido nucleico extraña en la célula vegetal, comprendiendo la molécula de ácido nucleico extraña una secuencia de codificación de una proteína que tiene la actividad de una glutamina:fructosa 6-fosfato UDP-glucosa deshidrogenasa

donde las etapas i a iii se pueden realizar en cualquier orden, individualmente, o cualquier combinación de las etapas i a iii se puede realizar simultáneamente

b) regenerando una planta a partir de células vegetales de la etapa a);

10 c) generando, si es adecuado, plantas adicionales utilizando las plantas de acuerdo con la etapa b), en la que, si es adecuado, se aislaron células vegetales de plantas de acuerdo con las etapas b) o c) y las etapas de procedimiento a) a c) se repitieron hasta que se generó la planta que tenía una molécula de ácido nucleico extraña que codificaba una hialuronano sintasa y tenía una actividad aumentada de una proteína que tenía la actividad (enzimática) de una GFAT en comparación con las células vegetales naturales no modificadas genéticamente correspondientes y una actividad aumentada de una proteína que tenía la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH en comparación con las células vegetales naturales no modificadas genéticamente correspondientes.

La presente descripción se refiere preferiblemente a procedimientos para preparar una planta que sintetiza hialuronano que comprende

20 a) modificar genéticamente una célula vegetal, en el que la modificación genética comprende las etapas i a iii siguientes en cualquier orden, o cualquier combinación de etapas i a iii se puede realizar individual o simultáneamente,

25 i) introducción de una molécula de ácido nucleico extraña que codifica una hialuronano sintasa unida a secuencias reguladoras que aseguran la transcripción en células vegetales en la célula vegetal

ii) la introducción de una molécula de ácido nucleico extraña en la célula vegetal, la molécula de ácido nucleico extraña que comprende una secuencia de codificación de una proteína que tiene la actividad de una glutamina: la fructosa 6-fosfato amidotransferasa-2 (GFAT-2) que se origina de animales o una glutamina: la fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT) que se origina de bacterias

30 iii) la introducción de una molécula de ácido nucleico extraña en la célula vegetal, comprendiendo la molécula de ácido nucleico extraña una secuencia de codificación de una proteína que tiene la actividad de una glutamina:fructosa 6-fosfato UDP-glucosa deshidrogenasa

35 b) regenerando una planta a partir de células vegetales que comprende la modificación genética de acuerdo con las etapas

i) a) i

ii) a) ii

iii) a) iii

40 iv) a) i y a) ii,

v) a) i y a) iii,

vi) a) ii y a) iii, o

vii) a) i y a) ii y a) iii

45 c) introducir en células vegetales de plantas de acuerdo con la etapa

i) b) i una modificación genética de acuerdo con la etapa a) ii,

ii) b) i una modificación genéticas de acuerdo genética de acuerdo con la etapa a) iii,

50 iii) b) i una modificación genética de acuerdo con la etapa) ii y simultáneamente una modificación genética de acuerdo con la etapa a) iii,

iv) b) ii una modificación genética de acuerdo con la etapa a) i,

v) b) ii una modificación genética de acuerdo con la etapa a) iii,

vi) b) ii una modificación genética de acuerdo con la etapa a) i y simultáneamente una modificación genética de acuerdo con la etapa a) iii,

55 vii) b) iii una modificación genética de acuerdo con la etapa a) i,

viii) b) iii una modificación genética de acuerdo con la etapa a) ii,

ix) b) iii una modificación genética de acuerdo con la etapa a) i y simultáneamente una modificación genética de acuerdo con la etapa a) ii,

x) b) iv una modificación genética de acuerdo con la etapa a) iii,

60 xi) b) v una modificación genética de acuerdo con la etapa a) ii, o xii) b) vi una modificación genética de acuerdo con la etapa a) i

y regenerar una planta

d) introducir en células vegetales de plantas de acuerdo con la etapa

- i) c) i una modificación genética de acuerdo con la etapa a) iii,
- ii) c) ii una modificación genética de acuerdo con la etapa a) ii,
- iii) c) iv una modificación genética de acuerdo con la etapa a) iii,
- iv) c) v una modificación genética de acuerdo con la etapa a) ii,
- v) c) vii una modificación genética de acuerdo con la etapa a) ii,
- vi) c) viii una modificación genética de acuerdo con la etapa a) i, o
- vii) c) ix una modificación genética de acuerdo con la etapa a) ii

y regenerar una planta

e) generando, si es adecuado, plantas adicionales con la ayuda de las plantas de acuerdo con cualquiera de las etapas b) vii, c) iii, c) vi, c) x, c) xi, c) xii o de acuerdo con cualquiera de las etapas d) i a d) vii.

La regeneración de las plantas de acuerdo con la etapa b) y, si es adecuado, las etapas c) y d) de los procedimientos de acuerdo con la invención se pueden realizar usando los procedimientos conocidos por la persona experta en la materia (descritos, por ejemplo, en "Plant Cell Culture Protocols", 1999, editado por R.D. Hall, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2).

Se puede realizar la generación de plantas adicionales (dependiendo del procedimiento de acuerdo con la etapa c) o la etapa e)) por ejemplo, mediante propagación vegetativa (por ejemplo, mediante esquejas, tubérculos o mediante cultivo de callos y regeneración de plantas intactas) o mediante propagación generativa. En este contexto, la propagación generativa tiene lugar generalmente en condiciones controladas, es decir, las plantas seleccionadas con características específicas se hibridan entre sí y se multiplican. La selección tiene lugar preferiblemente de tal manera que las plantas adicionales (dependiendo del procedimiento generado de acuerdo con la etapa c) o la etapa e)) comprende las modificaciones introducidas en las etapas precedentes.

En los procedimientos de acuerdo con la invención para preparar plantas que sintetizan hialuronano, se pueden realizar las modificaciones genéticas para generar las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención en etapas simultáneas o sucesivas y en cualquier combinación. Las plantas naturales y las células vegetales naturales se pueden usar como punto de partida en el que no se ha introducido una molécula de ácido nucleico extraña que codifica una hialuronano sintasa y en el que no se ha introducido una modificación genética que aumenta la actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT en comparación con las células vegetales no genéticamente modificadas y en el que no se han introducido todavía una modificación genética que aumenta la actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH en comparación con las células vegetales no modificadas genéticamente correspondientes. Las células vegetales o plantas que se han modificado ya genéticamente en el que no se ha introducido una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa y en el que se ha introducido ya una modificación para aumentar la actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT en comparación con las células vegetales naturales no genéticamente modificadas correspondientes y en el que se han introducido ya y/o en el que se ha introducido ya una modificación genética para aumentar la actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT en comparación con las células vegetales no modificadas genéticamente correspondientes. Aquí, es inmaterial si el mismo procedimiento que para la modificación genética resultante en una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc -DH se usa para sucesivas modificaciones genéticas que dan como resultado una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT, siempre que ambas modificaciones genéticas juntas den como resultado una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT y una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH en la misma célula vegetal. Es también inmaterial, cuyo procedimiento se usa para introducir una molécula de ácido nucleico extraña que codifica una hialuronano sintasa en la célula vegetal.

Los procedimientos para preparar una planta que sintetiza hialuronano, consisten en la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico extraña o de una pluralidad de moléculas de ácidos nucleicos extrañas en el genoma de la célula vegetal, en el que la(s) molécula(s) de ácidos nucleicos extrañas comprende/comprenden una hialuronano sintasa y una secuencia de codificación de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT y una secuencia de codificación de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH.

Como ya se ha descrito anteriormente para las moléculas de ácidos nucleicos extrañas introducidas para la modificación genética en la célula vegetal o la planta, que se introduce en la etapa a) de los procedimientos de acuerdo con la invención para preparar una planta que sintetiza hialuronano puede ser una molécula de ácido nucleico individual o una pluralidad de moléculas de ácidos nucleicos. Por tanto, las moléculas de ácidos nucleicos extrañas que codifican una hialuronano sintasa y/o que codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT y/o que codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH pueden estar presentes juntas en una única molécula de ácido nucleico, o dos de las moléculas de ácidos nucleicos extrañas mencionadas pueden estar presentes juntas en una única molécula de ácido nucleico y la tercera molécula de ácido nucleico extraña puede estar presente en otra molécula de ácido nucleico, en cualquier combinación posible, o las tres moléculas de ácidos nucleicos extrañas mencionadas pueden en cada caso estar presentes en moléculas de ácidos nucleicos separadas individuales.

Además, para introducir una molécula de ácido nucleico extraña en la práctica de los procedimientos de acuerdo con la invención para preparar una planta que sintetiza hialuronano, es posible utilizar, en vez de células vegetales naturales o plantas naturales, células mutantes o mutantes que se distinguen porque tienen ya una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT y/o una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH. Si la célula mutante tiene ya una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT o una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH en comparación con las células vegetales naturales correspondientes o con las plantas naturales correspondientes, es suficiente realizar un procedimiento de acuerdo con la invención para preparar una planta que sintetiza hialuronano que una molécula de ácido nucleico extraña que codifica una hialuronano sintasa y una modificación genética que da como resultado un aumento en la actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH o un aumento en la actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT, en comparación con las células vegetales naturales no genéticamente correspondientes, se introduce en dichas células mutantes o mutantes. Si la célula mutante tiene ya una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT y una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH en comparación con las células vegetales naturales correspondientes de una planta natural correspondiente, se puede introducir una molécula de ácido nucleico extraña que codifica una hialuronano sintasa en dicha célula mutante o mutante para realizar un procedimiento de acuerdo con la invención para preparar una planta que sintetiza hialuronano.

Todo lo mencionado anteriormente que se refiere al uso de mutantes para la preparación de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención se aplica aquí de manera análoga.

La presente descripción se refiere a procedimientos de acuerdo con la invención para preparar una planta que sintetiza hialuronano, en la que la molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa en la etapa a) se selecciona entre el grupo que consiste en:

- a) moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque codifican una hialuronano sintasa vírica,
- b) moléculas de ácidos sintéticos caracterizadas porque codifican una hialuronano sintasa de un virus que infecta *Chlorella*,
- c) moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque codifican una hialuronano sintasa de un *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*,
- d) moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque codifican una hialuronano sintasa de un *Paramecium bursaria Chlorella virus 1* de la cepa H1,
- e) moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque los codones de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican una hialuronanosintasa están modificadas en comparación con los codones de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican la hialuronano sintasa en el organismo progenitor de la hialuronano sintasa,
- f) moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque los codones de la hialuronano sintasa se han modificado de tal manera que se adaptan a la frecuencia del uso de los codones de la célula vegetal o de la planta en cuyo genoma se van a integrar o se integran,
- g) moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque una hialuronano sintasa que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 2 o que codifican una hialuronano sintasa cuya secuencia de aminoácidos es al menos 70%, de forma preferible al menos 80%, de forma particularmente preferible al menos 90%, de manera especialmente preferible al menos 95% y lo más preferible al menos 98% idénticas a la idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 2,
- h) moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque codifican una proteína cuya secuencia de aminoácidos se puede derivar de la secuencia de codificación del ácido nucleico insertada en el plásmido DSM16664 o que codifican una proteína cuya secuencia de aminoácidos es al menos 70%, de forma preferible al menos 80%, de forma particularmente preferible al menos 90%, de manera especialmente preferible al menos 95% y lo más preferible al menos 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se deriva de la región de codificación de la secuencia de ácido nucleico insertada en el plásmido DSM16664,
- i) las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEC ID N° 1 o en la SEC ID N° 3 o que es al menos 70%, de forma preferible al menos 80%, con preferencia al menos 90%, de manera especialmente preferible al menos 95% y lo más preferible al menos 98% idéntica a la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEC ID N° 1 o en la SEC ID N° 3,
- j) moléculas de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia de ácido nucleico insertada en el plásmido DSM16664 o que es al menos 70%, de forma preferible al menos 80%, con preferencia al menos 90%, de manera especialmente preferible al menos 95% y lo más preferible al menos 98% idéntica a la secuencia insertada en el plásmido DSM16664,
- k) moléculas de ácidos nucleicos que codifican una hialuronano sintasa, en las que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la hialuronano sintasa se unen a elementos reguladores (promotores) que inician la transcripción en células vegetales o
- l) moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con k) en las que los promotores son promotores específicos de tejido, promotores particularmente preferibles que inician el inicio de la transcripción específicamente en células de tubérculos de plantas, frutos o semillas de plantas.

Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT se

selecciona entre el grupo que consiste en:

- 5 a) moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT que se origina a partir de bacterias o animales, preferiblemente de *Escherichia coli* o de ratón,  
b) moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque los codones de la molécula de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT están modificadas en comparación con los codones de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína correspondiente que tiene la actividad de una GFAT del organismo progenitor,  
10 c) moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque los codones de la proteína que tiene la actividad de una GFAT sintasa se han modificado de tal manera que se adaptan a la frecuencia del uso de los codones de la célula vegetal o de la planta en cuyo genoma se van a integrar o se integran,  
d) moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 10 o para una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 12;  
e) moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína cuya secuencia es al menos 70%, de forma preferible al menos 80%, con preferencia al menos 90%, de forma especialmente preferible al menos 95% y lo más preferible al menos 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 10 o de la SEC ID N° 12;  
15 f) las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEC ID N° 9 o una secuencia complementaria de la anterior o la secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEC ID N° 11 o una secuencia complementaria de la anterior o la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEC ID N° 13 o una secuencia complementaria de la anterior;  
20 g) las moléculas de ácidos nucleicos que son al menos 70%, de forma preferible al menos 80%, con preferencia al menos 90%, de forma especialmente preferible al menos 95% y lo más preferible al menos 98% idénticas a las secuencias de ácidos nucleicos descritas en h);  
h) moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones restrictivas con al menos una hebra de las secuencias de ácidos nucleicos descritas en f) o h);  
25 i) moléculas de ácidos nucleicos cuyas secuencias de nucleótidos difieren de la secuencia de moléculas de ácidos nucleicos mencionadas en f) o h) debido a la degeneración del código genético; y  
j) moléculas de ácidos nucleicos que son fragmentos, variantes y/o derivados alélicos de las moléculas de ácidos nucleicos mencionadas en a), b), c), d), e, f) o h),  
k) moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT, en las que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT se unen a elementos reguladores (promotores) que inician la transcripción en células vegetales o  
30 l) moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con m), en las que los promotores son específicos de tejido, promotores particularmente preferibles que inician el inicio de la transcripción específicamente en células de tubérculos de plantas, hojas, frutos o semillas de plantas.

35 La presente descripción se refiere a procedimientos de acuerdo con la invención para preparar una planta que sintetiza hialuronano, en los que la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH se selecciona del grupo que consiste en:

- 40 a) moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH que se origina a partir de virus, bacterias, animales o plantas,  
b) moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH de un virus que infecta *Chlorella*,  
c) moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH de un *Paramecium bursaria Chlorella virus*,  
45 d) las moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque los codones de la molécula de ácido nucleico codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH están modificadas en comparación con los codones de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína correspondiente que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH del organismo progenitor,  
e) moléculas de ácidos nucleicos caracterizadas porque los codones de la proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH se han modificado de tal manera que se adaptan a la frecuencia del uso de los codones de la célula vegetal o de la planta en cuyo genoma se van a integrar o se integran,  
50 f) moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 5;  
g) moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína cuya secuencia es al menos 70%, de forma preferible al menos 80%, con preferencia al menos 90%, de manera especialmente preferible al menos 95% y lo más preferible al menos 98% idénticas a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 5;  
55 h) las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 4 o una secuencia complementaria de la anterior o la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N° 6 o una secuencia complementaria de la anterior;  
i) las moléculas de ácidos nucleicos que son al menos 70%, de forma preferible al menos 80%, con preferencia al menos 90%, de forma especialmente preferible 95% y lo más preferible al menos 98% idénticas a las secuencias de ácidos nucleicos descritas en h);  
60 j) moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones restrictivas con al menos una hebra de las moléculas de ácidos nucleicos descritas en f) o h);

- k) moléculas de ácidos nucleicos cuyas secuencias de nucleótidos difieren de la secuencia de moléculas de ácidos nucleicos mencionadas en f) o h) debido a la degeneración del código genético; y
- l) moléculas de ácidos nucleicos que son fragmentos, variantes y/o derivados alélicos de las moléculas de ácidos nucleicos mencionadas en a), b), c), d), e, f) o h),
- 5 m) moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH en las que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH se unen a elementos reguladores (promotores) que inician la transcripción en células vegetales o
- 10 n) moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con m), en las que los promotores son específicos de tejido, promotores particularmente preferibles que inician el inicio de la transcripción específicamente en células de tubérculos de plantas, hojas, frutos o semillas de plantas.

En una realización preferida de la presente invención, los procedimientos para preparar una planta que sintetiza hialuronano se refieren a procedimientos para preparar una planta que sintetiza al menos 100, preferiblemente al menos 600, de forma particularmente preferible al menos 1000, de forma especialmente preferible al menos 1500, µg de hialuronano por g de peso fresco (PF) de material vegetal.

- 15 En una realización preferida adicional, los procedimientos de acuerdo con la invención para preparar una planta que sintetiza hialuronano se utilizan para preparar plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención.

La presente invención proporciona también plantas obtenibles mediante un procedimiento de acuerdo con la invención para preparar una planta que sintetiza hialuronano.

- 20 La presente invención se refiere además a un procedimiento para preparar hialuronano que comprende la etapa de extraer hialuronano de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, de material de propagación de acuerdo con la invención, de partes de plantas cosechables de acuerdo con la invención o de plantas o partes de estas plantas obtenibles mediante un procedimiento de acuerdo con la invención para preparar plantas que sintetizan hialuronano.

- 25 Preferiblemente, dicho procedimiento comprende también la etapa de cosechar las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, el material de propagación de acuerdo con la invención, las partes de plantas cosechables de acuerdo con la invención, las partes de plantas procesables de acuerdo con la invención antes de extraer el hialuronano, y de forma particularmente preferible además la etapa de cultivar células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención antes de la cosecha.

- 30 A diferencia de bacterias o tejidos animales, los tejidos de las plantas no tienen hialuronidasas y no contienen ninguna hialoadherina. Por consiguiente, como se ha descrito ya anteriormente, la extracción de hialuronano a partir de tejidos de plantas usando procedimientos relativamente sencillos. Si es necesario, los extractos acuosos, descrito anteriormente, de células o tejidos vegetales que contienen hialuronano se pueden purificar usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, precipitación repetida con etanol. Se describe un
- 35 procedimiento preferido para purificar hialuronano en los Procedimientos Generales, artículo 3.

- Los procedimientos ya descritos para extraer hialuronano a partir de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o a partir de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención son también adecuados para aislar hialuronano de material de propagación de acuerdo con la invención, de partes de plantas cosechables de acuerdo con la invención o de plantas o partes de estas plantas obtenibles mediante un
- 40 procedimiento de acuerdo con la invención para preparar plantas que sintetizan hialuronano.

- La presente invención proporciona también el uso de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, material de propagación de acuerdo con la invención, las partes de plantas cosechables de acuerdo con la invención, partes de plantas procesables de acuerdo con la invención o plantas obtenibles mediante un procedimiento de acuerdo con la invención para preparar
- 45 hialuronano.

La presente invención describe además composiciones que comprenden células vegetales de acuerdo con la invención. Aquí, no tiene importancia si las células vegetales están intactas o ya no están intactas debido a que se han destruido, por ejemplo, debido al procesamiento. Las composiciones son alimentos comestibles o piensos, productos farmacéuticos o cosméticos.

- 50 La presente invención describe además composiciones que comprenden células vegetales de acuerdo con la invención, de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, de material de propagación de acuerdo con la invención, de partes de plantas cosechables de acuerdo con la invención o de plantas obtenibles mediante un procedimiento de acuerdo con la invención y que comprenden moléculas de ácidos nucleicos recombinantes, en el que las moléculas de ácidos nucleicos recombinantes se caracterizan porque comprenden
- 55 moléculas de ácidos nucleicos que codifican una hialuronano sintasa y proteínas que tienen la actividad (enzimática) de una GFAT y proteínas que tienen la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH.

Una integración estable de moléculas de ácidos nucleicos extrañas en el genoma de una célula vegetal o de una

planta da como resultado moléculas de ácidos nucleicos extrañas que están flanqueadas tras la integración en el genoma de la célula vegetal mediante secuencias genómicas de ácidos nucleicos de plantas. Las composiciones descritas en el presente documento se caracterizan porque las moléculas de ácidos nucleicos recombinantes presentes en la composición están flanqueadas por secuencias genómicas de ácidos nucleicos de plantas.

- 5 Aquí, las secuencias genómicas de ácidos nucleicos de plantas pueden ser cualesquiera secuencias naturalmente presentes en el genoma de la célula vegetal o de la planta usada para preparar la composición.

Las moléculas de ácidos nucleicos recombinantes presentes en las composiciones descritas en el presente documento pueden ser moléculas individuales de ácidos nucleicos o diversas moléculas de ácidos nucleicos en las que las moléculas de ácidos nucleicos que codifican una hialuronano sintasa y las proteínas que tienen la actividad (enzimática) de una GFAT y las proteínas que tienen la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH están presentes en una molécula de ácido nucleico, o aquellas en las que las moléculas de ácidos nucleicos mencionadas pueden estar presentes en moléculas de ácidos nucleicos recombinantes separadas. Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican una hialuronano sintasa o codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT o que codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH pueden estar presentes juntas en una única molécula de ácido nucleico recombinante, o dos de las moléculas de ácidos nucleicos mencionadas pueden estar presentes juntas en una única molécula de ácido nucleico recombinante y la tercera molécula de ácido nucleico puede estar presente en otra molécula de ácido nucleico recombinante en cualquier combinación posible, o las tres moléculas de ácidos nucleicos mencionadas pueden en cada caso estar presentes en moléculas de ácidos nucleicos separadas individuales. Dependiendo de cómo las moléculas de ácidos nucleicos codifican una hialuronano sintasa o codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT o codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una UDP-Glc-DH están presentes en una composición, pueden estar flanqueadas por secuencias genómicas de ácidos nucleicos de plantas idénticas o diferentes.

Estas composiciones descritas en el presente documento que comprenden moléculas de ácidos nucleicos recombinantes pueden demostrarse utilizando procedimientos conocidos por las personas expertas en la materia, tales como, por ejemplo, procedimientos basados en la hibridación o, preferiblemente, utilizando procedimientos basados en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Preferiblemente, las composiciones descritas en el presente documento comprenden al menos 0,005%, con preferencia al menos 0,01%, de forma particularmente preferible al menos 0,05 % y de manera especialmente preferible al menos 0,1 % de hialuronano.

- 30 Preferiblemente, las composiciones descritas en el presente documento comprenden casi un 5%, con preferencia casi 2%, de forma particularmente preferible casi 1% y de manera especialmente preferible al menos 0,5% de hialuronano.

Como ya se ha mencionado anteriormente, es posible utilizar células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, material de propagación de acuerdo con la invención, las partes de plantas cosechables de acuerdo con la invención, las partes de plantas procesables de acuerdo con la invención, las partes de plantas consumibles de acuerdo con la invención o plantas obtenibles mediante un procedimiento de acuerdo con la invención para preparar alimentos comestibles o piensos. Sin embargo, es también posible el uso como materias primas para aplicaciones industriales, sin tener que aislar hialuronano. Por tanto, por ejemplo, se pueden aplicar plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o partes de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención a áreas bajo cultivo agrícola para conseguir un aumento de la unión del agua al suelo. Además, las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención se pueden usar para preparar agentes de secado (por ejemplo para el uso con artículos sensibles a la humedad durante el envío) o como absorbentes de líquidos (por ejemplo, en pañales o para absorber vertidos de líquidos acuosos). Para dichas aplicaciones, es posible usar plantas completas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, partes de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas trituradas genéticamente modificadas (por ejemplo, molidas) de acuerdo con la invención o partes de plantas de acuerdo con la invención, según sea necesario. Adecuadas para aplicaciones en las cuales se usan plantas o partes de plantas molidas están, en particular, partes de plantas que contienen hialuronano, pero solo una baja proporción de agua. Estas son preferiblemente granos de plantas de cereales (maíz, arroz, trigo, centeno, avena, cebada, sagú o sorgo). Debido a que las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención y las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención tienen un mayor contenido de hialuronano que las plantas transgénicas descritas en la bibliografía, en comparación con esto debe usarse menos material para aplicaciones industriales cuando se hace uso de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención.

La presente invención proporciona también procedimientos para preparar una composición de acuerdo con la invención, en el que se usan células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, material de propagación de acuerdo con la invención, las partes de plantas cosechables de acuerdo con la invención, las partes de plantas procesables de acuerdo con la invención, partes de plantas consumibles de acuerdo con la invención o plantas obtenibles mediante un

procedimiento de acuerdo con la invención para preparar una planta que sintetiza hialuronano. Los procedimientos para preparar una composición de acuerdo con la invención son preferiblemente procedimientos para preparar alimentos comestibles o piensos, procedimientos para preparar un producto farmacéutico o procedimientos para preparar un producto cosmético.

- 5 Las personas expertas en la materia conocen los procedimientos para preparar alimentos comestibles o piensos. Las personas expertas en la materia conocen también los procedimientos para utilizar plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o partes de plantas de acuerdo con la invención en áreas industriales e incluyen entre otros la trituración o el molido de plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención o partes de plantas de acuerdo con la invención; sin embargo, no se limitan exclusivamente a lo anterior. Se han descrito ya anteriormente algunas de las ventajas resultantes de la utilización de materias sujeto de acuerdo con la invención para preparar alimentos comestibles/piensos o para uso en áreas industriales.

Es particularmente preferible un procedimiento de acuerdo con la invención para preparar una composición que comprende hialuronano.

- 15 Se proporcionan igualmente mediante la presente descripción composiciones obtenibles mediante un procedimiento para preparar una composición de acuerdo con la invención

La presente invención se refiere también al uso de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, material de propagación de acuerdo con la invención, las partes de plantas cosechables de acuerdo con la invención, las partes de plantas procesables de acuerdo con la invención, partes de plantas consumibles de acuerdo con la invención o plantas obtenibles mediante un procedimiento de acuerdo con la invención para preparar una planta que sintetiza hialuronano para preparar una composición de acuerdo con la invención. Se da preferencia al uso de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención, material de propagación de acuerdo con la invención, las partes de plantas cosechables de acuerdo con la invención, las partes de plantas procesables de acuerdo con la invención, partes de plantas consumibles de acuerdo con la invención o de plantas obtenibles mediante un procedimiento de acuerdo con la invención para preparar una planta que sintetiza hialuronano para preparar alimentos comestibles o piensos, para preparar un producto farmacéutico o para preparar un producto cosmético.

### **Descripción de las secuencias**

- SEC ID N° 1: Secuencia de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*.
- SEC ID N° 2: Secuencia de aminoácidos de una hialuronano sintasa del *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*. La secuencia de aminoácidos que se muestra, que se puede derivar de la SEC ID N° 1.
- SEC ID N° 3: La secuencia sintética de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa de un *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*. La síntesis de los codones de la secuencia que se muestra se realizó de tal manera que se adaptó al uso de codones en células vegetales. La secuencia de ácido nucleico que se muestra codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 2.
- SEC ID N° 4: Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*.
- SEC ID N° 5: La secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*. La secuencia de aminoácidos que se muestra, que se puede derivar de la SEC ID N° 4.
- SEC ID N° 6: Una secuencia de ácido nucleico sintético que codifica una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*. La síntesis de los codones de la secuencia que se muestra se realizó de tal manera que se adaptó al uso de codones en células vegetales. La secuencia de ácido nucleico que se muestra codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 5.
- SEC ID N° 7: La secuencia de ácido nucleico de una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 procedente de ratón.
- SEC ID N° 8: La secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 procedente de ratón. La secuencia de aminoácidos que se muestra, que se puede derivar de la SEC ID N° 7.
- SEC ID N° 9: La secuencia de ácido nucleico de una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 procedente de ratón.

- SEC ID N° 10: La secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 procedente de ratón. La secuencia de aminoácidos que se muestra, que se puede derivar de la SEC ID N° 9.
- SEC ID N° 11: La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT procedente de *Escherichia coli*.
- SEC ID N° 12: La secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene la actividad de una GFAT de *Escherichia coli*. La secuencia de aminoácidos que se muestra, que se puede derivar de la SEC ID N° 11.
- SEC ID N° 13: La secuencia de ácido nucleico sintético que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT procedente de *Escherichia coli*. La síntesis de los codones de la secuencia que se muestra se realizó de tal manera que se adaptó al uso de codones en células vegetales. La secuencia de ácido nucleico que se muestra codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 12.
- SEC ID N° 14: Oligonucleótido sintético usado como cebador en el Ejemplo 1
- SEC ID N° 15: Oligonucleótido sintético usado como cebador en el Ejemplo 1

### **Descripción de las figuras**

Figura 1: Muestra una curva de calibración y la correspondiente ecuación de la línea de regresión utilizada para calcular el contenido de hialuronano en el tejido de la planta. La curva de calibración se estableció con la ayuda del kit de ensayo comercial (kit de ensayo del ácido hialurónico (AH) de Corgenix, Inc., Colorado, EE.UU, N° de producto 029-001) y las soluciones normalizadas suministradas al anterior.

### **Procedimientos generales**

Se describen a continuación los procedimientos que se pueden usar junto con la presente invención.

#### 1. Transformación de plantas de patata

Las plantas de patata se transformaron con ayuda de *Agrobacterium*, tal como se describe en Rocha-Sosa y col. EMBO J. 8, (1989), 23-29).

#### 2. Aislamiento de hialuronano del tejido vegetal

Para detectar la presencia de hialuronano y determinar el contenido de hialuronano en el tejido vegetal, el material vegetal se trabajó de la siguiente forma: se añadieron aproximadamente 200 µl de agua (desmineralizada, conductividad = 18 MΩ) a aproximadamente 0,3 g de material de tubérculo, y la mezcla se trituró en un molino de bolas oscilante de laboratorio (MM200, de Retsch, Alemania) (30 s a 30 Hz). A continuación se añadieron aproximadamente 800 µl más de agua (desmineralizada, conductividad = 18 MΩ), y la mezcla se mezcló bien (utilizando, por ejemplo, un mezclador Vortex). Los residuos celulares y los componentes insolubles se separaron del sobrenadante por centrifugación a 16 000 xg durante 5 minutos.

#### 3. Purificación de hialuronano

Se pelaron aproximadamente 100 gramos de tubérculos, se recortaron en trozos de un tamaño de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> y, tras adición de 100 ml de agua (desmineralizada, conductividad = 18 MΩ), se trituraron en un mezclador Waring a la velocidad máxima durante aproximadamente 30 segundos. Los residuos celulares se eliminaron a continuación usando una manga de té. Los residuos celulares que se habían eliminado se resuspendieron en 300 ml de agua (desmineralizada, conductividad = 18 MΩ) y se volvieron a retirar usando una manga de té. Las dos suspensiones obtenidas (100 ml + 300 ml) se combinaron y se centrifugaron a 13 000 xg durante 15 minutos. Se añadió NaCl al sobrenadante de la centrifugación obtenido hasta alcanzar una concentración final del 1%. Una vez que el NaCl se hubo disuelto, la precipitación se realizó por adición de dos veces el volumen de etanol seguido por la mezcla completa e incubación a -20 °C durante la noche. A continuación la mezcla se centrifugó a 13 000 durante 15 minutos. El precipitado sedimentado obtenido tras esta centrifugación se disolvió en 100 ml de tampón (TrisHCl 50 mM, pH 8, CaCl<sub>2</sub> 1 mM) y a continuación se añadió proteinasa K hasta una concentración final de 100 mg/ml y la solución se incubó a 42 °C durante 2 horas. Esto fue seguido por 10 minutos de incubación a 95 °C. Una vez más, se añadió NaCl a esta solución hasta alcanzar una concentración final del 1%. Una vez que el NaCl se hubo disuelto, se realizó otra precipitación por adición de dos veces el volumen de etanol, mezcla completa e incubación a -20 °C durante aproximadamente 96 horas. Esto fue seguido por 15 minutos de centrifugación a 13 000 x g. El precipitado sedimentado obtenido tras esta centrifugación se disolvió en 30 ml de agua (desmineralizada, conductividad = 18 MΩ), y una vez más, se añadió NaCl hasta una concentración final de 1%. Al añadir dos veces el volumen de etanol, mezcla completa e incubación a -20 °C durante la noche, se produjo otra precipitación. El precipitado obtenido tras la posterior centrifugación a 13 000 xg durante 15 minutos se disolvió en 20 ml de agua (desmineralizada, conductividad = 18 MΩ).

Se realizó otra purificación mediante filtración centrífuga. Con este fin, en cada caso 5 ml del precipitado disuelto se

aplicaron a un filtro de membrana (CentriconAmicon, anchura de poro 10 000 NMWL, Prod. N° UCF8 01096), y la muestra se centrifugó a 2200 xg hasta que solo permanecieron aproximadamente 3 ml de la solución por encima del filtro. Dos veces más, tras adición de 3 ml de agua (desmineralizada, conductividad = 18 MΩ) a la solución por encima de la membrana y, en cada caso, se volvieron a centrifugar en condiciones idénticas hasta que, finalmente, solamente permanecieron aproximadamente 3 ml de la solución por encima del filtro. Las soluciones aún presentes por encima de la membrana después de la filtración centrífuga se eliminaron, y la membrana se lavó repetidamente (de tres a cinco veces) con aproximadamente 1,5 ml de agua (desmineralizada, conductividad = 18MΩ). Todas las soluciones que quedaban por encima de la membrana y las soluciones obtenidas del lavado se combinaron, se añadió NaCl hasta una concentración final de 1%, una vez que el NaCl se hubo disuelto, se añadió dos veces el volumen de etanol, la muestra se mezcló y se obtuvo un precipitado por almacenamiento a -20 °C durante la noche . El precipitado obtenido tras la posterior centrifugación a 13 000 xg durante 15 minutos se disolvió en 4 ml de agua (desmineralizada, conductividad= 18 MΩ) y después se criodesecó (24 horas a una presión de 0,37 mbar, equipo de criodesecación Christ Alpha 1-4 de Christ, Osterode, Alemania).

#### 4. Detección de hialuronano y determinación del contenido de hialuronano

El hialuronano se detectó usando una prueba comercial (kit de ensayo de ácido hialurónico (AH) de Corgenix, Inc., Colorado, EE.UU, Prod. N° 029-001) de acuerdo con las instrucciones del fabricante que se incorporan al presente documento en su memoria descriptiva a modo de referencia. El principio de la prueba se basa en la disponibilidad de una proteína que se une específicamente al hialuronano (HABP) y se lleva a cabo de forma similar a un ELISA, en la que una reacción de color indica el contenido de hialuronano en la muestra examinada. Por consiguiente, para la determinación cuantitativa del hialuronano, las muestras a medir deberán emplearse en una concentración tal que esté comprendida en los límites indicados (por ejemplo; dilución de la muestra en cuestión o uso de menos agua para extraer el hialuronano del tejido de la planta, dependiendo de si se ha excedido o no se ha alcanzado el límite).

En lotes paralelos, alícuotas de las muestras a determinar se sometieron inicialmente a digestión con hialuronidasa y después se midió usando la prueba comercial (kit de ensayo de ácido hialurónico (AH) de Corgenix, Inc., Colorado, EE.UU, Prod. N° 029-001). La digestión con hialuronidasa se realizó usando 400 µl del tubérculo patata extraído en tampón de hialuronidasa (tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 5,3; NaCl 150) por adición de 5 µg (aproximadamente 3 unidades) de hialuronidasa ((hialuronidasa tipo III de Sigma, Prod. N° H 2251) e incubación a 37 °C durante 30 min.

En cada caso, en una dilución 1:10, todas las muestras se usaron después para determinar el contenido en hialuronano.

5. Las desviaciones estándar citadas se calcularon según la fórmula siguiente:

$$\text{raíz cuadrada} \left[ \frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)} \right]$$

en la que x es el valor de los valores medidos individuales y n es el sumatorio de todos los valores medidos para determinar la desviación estándar en cuestión.

#### 6. Determinación de la actividad de una GFAT

La actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT se determinó como se describe en Rachel y col. (1996, J. Bacteriol. 178 (8), 2320-2327).

Para distinguir si una proteína tiene la actividad de una GFAT-1 o GFAT-2, se utilizó el procedimiento descrito en Hu y col. (2004, J. Biol. Chem. 279 (29), 29988-29993).

#### 7. Determinación de la actividad de una UDP-Glc-DH

La actividad de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH se determinó como se describe en Rachel y col. (1998, J. Bacteriol. 273 (39), 25117-25124).

#### 8. Transformación de plantas de tomate

Las plantas de tomate se transformaron con ayuda de *Agrobacterium* usando el procedimiento descrito en el documento US 5.565.347.

## Ejemplos

### 1. Preparación del vector de expresión en planta IR 47-71

El plásmido pBinAR es un derivado del plásmido vector binario pBin19 (Bevan, 1984, Nucl Acids Res 12:8711-8721)

que se construyó de la siguiente forma:

5 Un fragmento con una longitud de 529 pb que comprendía los nucleótidos 6909-7437 del promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor se aisló en forma de un fragmento *EcoR* I/*Kpn* I a partir del plásmido pDH51 (Pietrzak y col, 1986 Nucleic Acids Res. 14, 5858) y se ligó entre los sitios de restricción *EcoR* I y *Kpn* I de polienlazador de pUC18. De esta manera, se formó el plásmido pUC18-35S. Usando las endonucleasas de restricción *Hind* III y *Pvu* II, un fragmento con una longitud de 192 pb que incluía la señal de poliadenilación (extremo 3') del gen *Octopina sintasa* (gen 3) del ADN-T del plásmido Ti pTiACH5 (Gielen y col, 1984, EMBO Journal 3, 835-846) (nucleótidos 11 749-11 939) se aisló a partir del plásmido pAGV40 (Herrera-Estrella y col, 1983 Nature, 303, 209-213). Tras la adición de los enlazadores *Sph* I al sitio de restricción *Pvu* II, el fragmento se ligó entre los sitios de restricción *Sph* I y *Hind* III de pUC18-35S. Esto produjo el plásmido pA7. Aquí, el polienlazador completo que comprende el promotor 35S y el terminador OCS se eliminó con *EcoR* I e *Hind* III y se ligó en el vector pBin19 adecuadamente escindido. Esto produjo el vector de expresión en planta pBinAR (Höfgen y Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230).

15 El promotor del gen de la patatina B33 de *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa y col., 1989, EMBO J. 8, 23-29) fue, al igual que el fragmento *Ora* I (nucleótidos -1512 - +14), ligado en el vector pUC19 escindido con *Sst* I cuyos extremos se habían enromado usando la ADN polimerasa T4. Esto produjo el plásmido pUC19-B33. De este plásmido se eliminó el promotor B33 usando *EcoR* I y *Sma* I y se ligó en el vector pBinAr adecuadamente restringido. Esto produjo el vector de expresión en planta pBinB33.

20 Para facilitar etapas de clonación adicionales, se extendió el MCS (sitio de clonación múltiple, por sus siglas en inglés). Con este fin, se sintetizaron dos oligonucleótidos complementarios, se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, se enfriaron lentamente a temperatura ambiente para permitir una buena fijación (hibridación) y se clonaron en los sitios de restricción *Sal* I y *Kpn* I de pBinB33. Los oligonucleótidos usados con este fin tuvieron la siguiente secuencia:

25 5'-TCg ACA ggC CTg gAT CCT TAA TTA AAC TAg TCT CgA ggA gCT Cgg TAC-3'  
5'-CgA gCT CCT CgA gAC TAg TTT AAT TAA ggA TCC Agg CCT g-3'

El plásmido obtenido se denominó IR 47-71.

## 2. Preparación del vector de expresión en planta pBinARHyg

30 El fragmento que comprende el promotor de 35S, el terminador Ocs y el sitio de clonación múltiple completo se eliminó de pA7 usando las endonucleasas de restricción *EcoR* I y *Hind* III y se clonó en el vector pBIBHyg (Becker, 1990, Nucleic Acids Res. 18, 203) que se había cortado con las mismas endonucleasas de restricción. El plásmido obtenido se denominó pBinARHyg.

## 3. Preparación del vector de clonación IC 317-204

35 Los fragmentos de ácido nucleico que comprenden el terminador OCS se aislaron del plásmido IR 47-71 usando las endonucleasas de restricción *Xho* I e *Hind* III y se clonaron en el vector pBlueScript KS (de Stratagene, Prod. N° 212207) que se había cortado con las mismas endonucleasas de restricción. El plásmido obtenido se denominó IC 306-204.

40 Los fragmentos de ácido nucleico que comprenden el promotor B33 se aislaron del plásmido IR 47-71 usando las endonucleasas de restricción *Bam* HI y *Eco* RI y se clonaron en el vector pBlueScript KS (de Stratagene, Prod. N° 212207) que se había cortado con las mismas endonucleasas de restricción. El plásmido obtenido se denominó IC 314-204.

El terminador OCS se aisló de IC 306-204 usando la endonucleasa de restricción *Bam* HI y se clonó en el plásmido IC 314-204 que se había cortado con la misma endonucleasa de restricción. El plásmido obtenido se denominó IC 317-204.

## 4. Síntesis de moléculas de ácido nucleico

45 a) Síntesis de moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronano sintasa de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*

50 La secuencia de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa (HAS) de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1* fue sintetizada por Medigenomix GmbH (Múnich, Alemania) y se clonó en el vector pCR2.1 de Invitrogen (Prod. N° K2000-01). El plásmido obtenido se denominó IC 323-215. La secuencia de ácido nucleico sintética que codifica la proteína HAS del *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*, se muestra en la SEC ID N° 3. La correspondiente secuencia de ácido nucleico aislada originalmente del *Paramecium bursaria Chlorella virus 1* se muestra en la SEC ID N° 1.

b) Síntesis de moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*

La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*, fue sintetizada por Entelechon GmbH y se clonó en el vector pCR4Topo de Invitrogen (Prod. N° K4510-20). El plásmido obtenido se denominó IC 339-222. La secuencia de ácido nucleico sintética que codifica la proteína UDP-Glc-DH de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*, se muestra en la SEC ID N° 6. La correspondiente secuencia de ácido nucleico aislada originalmente de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1* se muestra en la SEC ID N° 4.

c) Síntesis de moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT de *Escherichia coli*

La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT de *Escherichia coli* fue sintetizada por Entelechon GmbH y se clonó en el vector pCR4Topo de Invitrogen (Prod. N° K4510-20). El plásmido obtenido se denominó IC 373-256. La secuencia de ácido nucleico sintética que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT de *Escherichia coli*, se muestra en la SEC ID N° 13. La correspondiente secuencia de ácido nucleico aislada originalmente de *Escherichia coli* se muestra en la SEC ID N° 11.

5. Origen de moléculas de ácido nucleico adicionales

a) Moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 de ratón

La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 se compró a BioCat GmbH, Heidelberg (Art. N° MMM1013-65346, clon de ADNc MGC:58262, IMAGE:6742987). Se trata de un clon producido por I.M.A.G.E. Konsortium (<http://image.llnl.gov>) y distribuido por BioCat GmbH. Aquí, el ADNc que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 se clonó en el vector pCMV Sport 6 de Invitrogen. El plásmido obtenido se denominó IC 365-256. La secuencia de ácido nucleico, insertada en IC 365-256, que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 de *Mus musculus*, comparada con la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 7, un cambio de base de T a C en la posición 1090 y un cambio de base de G a en la posición 2027. Estos cambios de bases no dan como resultado cambios de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos codificadas por las dos moléculas de ácido nucleico diferentes.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 del ratón se muestra en la SEC ID N° 8.

Para facilitar etapas de clonación adicionales, la secuencia que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 se aisló con las endonucleasas de restricción *Xho I* y *Eco RV* de IC 365-256 y se clonó en el plásmido pME9 (vector pBlueSkript de Stratagene, Prod. N° 212207) que tiene un sitio de clonación múltiple modificado que tiene adicionalmente un sitio de restricción *Pac I* en ambos extremos, dicho plásmido se había cortado con las mismas endonucleasas de restricción. El plásmido obtenido se denominó IC 367-256.

b) Moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 de ratón

Las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 de ratón se compraron a (Clon ID 4167189, clon de ADNc MGC:18324, IMAGE:4167189). Se trata de un clon producido por I.M.A.G.E. Konsortium (<http://image.llnl.gov>) y distribuido por Invitrogen. Aquí, el ADNc que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 se clonó en el vector pCMV Sport 6 de Invitrogen. El plásmido se denominó IC 369-256. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 de *Mus musculus* se muestra en la SEC ID N° 9.

6. Preparación del vector de expresión en planta IC 341-222 que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*

Usando la digestión con restricción con *BamH I* y *Xho I*, las moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de codificación de la hialuronano sintasa se aislaron a partir del plásmido IC 323-215 y se clonaron en los sitios de restricción *BamH I* y *Xho I* del plásmido IR 47-71. El vector de expresión en planta obtenido se denominó IC 341-222.

7. Preparación de los vectores de expresión en planta IC 370-256 y IC 376-256 que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 del ratón y una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*

Usando la digestión con restricción con *BamH I* y *Kpn I*, se aislaron moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de codificación de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1* a partir del plásmido IC 339-222 y se clonaron en el plásmido pA7 que se había cortado con las mismas endonucleasas de restricción. El plásmido obtenido se denominó IC 342-222.

Mediante la digestión con restricción con *Xba I* y *Kpn I*, se aislaron moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de codificación de una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1* a partir del plásmido IC 342-222 y se clonaron en el vector de expresión pBinAR Hyg que se había

restringido con *Xba* I y *Kpn* I. El plásmido obtenido se denominó IC 349-222.

5 En la siguiente etapa, un fragmento de ácido nucleico que comprende el promotor B33 y el terminador OCS, fragmento que se había aislado a partir de IC 317-204 mediante digestión con restricción con *Eco* IR, se clonó en el sitio de restricción *Eco* IR de IC 349-222. Aquí, se garantizó que los promotores (35S y 833) estaban orientados en paralelo. El vector obtenido se denominó IC 354-222.

En una etapa de clonación adicional, un fragmento de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 del ratón se aisló mediante digestión con restricción con *Xho* I y *Eco* RV a partir de IC 367-256 y se clonó en el plásmido IC 354-222, que se había restringido con *Xho* I y *Ecl*136 II. El vector de expresión en planta obtenido se denominó IC 370-256.

10 Después de un análisis de secuencia del plásmido IC 370-256, se descubrió que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 del ratón tenía modificaciones en dos posiciones en comparación con la secuencia de ácido nucleico insertada en el plásmido IC 365-256. Comparada con la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 7, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 de ratón contenido en el plásmido IC 370-256 tiene un cambio de base de G a A en la posición 1160, un cambio de base de T a C en la posición 1190, un cambio de base de T a C en la posición 1245 y de G a A en la posición 2027. Esta secuencia de ácido nucleico modificada codifica una proteína que, con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 8, tiene una modificación en los aminoácidos de la posición 304 de R a Q y en la posición 366 de C a R.

20 Para obtener un vector de expresión en planta que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 correcta a partir de ratón, la secuencia de codificación de la proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 del ratón se aisló de nuevo a partir de IC 365-256 mediante digestión con restricción con *Xho* I y *Eco* RV y se clonó en el plásmido IC 354-222, restringido con *Xho* I y *Ecl*136 II. El vector de expresión en planta obtenido se denominó IC 376-256.

25 La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 del ratón que estaba incluida en el plásmido IC 376-256 es idéntica a la secuencia de codificación de una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 del ratón insertada en el plásmido 365-256. La secuencia de aminoácidos codificada por esta molécula de ácido nucleico se muestra en la SEC ID N° 8.

30 8. Preparación del vector de expresión en planta IC 372-256 que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 del ratón y una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*

Un fragmento de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 del ratón se aisló a partir de IC 369-256 mediante digestión con restricción con *Xho* I y *Eco* RV y se clonó en el plásmido IC 354-222, restringido con *Xho* I y *Ecl*136 II. El vector de expresión en planta obtenido se denominó IC 372-256.

35 9. Preparación del vector de expresión en planta IC 375-271 que comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT de *Escherichia coli* y una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*

40 Un fragmento de ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de la proteína que tiene la actividad de una GFAT de *Escherichia coli* se aisló a partir de IC 373-256 mediante digestión con restricción con *Xho* I y *Eco* RV y se clonó en el plásmido IC 354-222, restringido con *Xho* I y *Ecl*136 II. El vector de expresión en planta obtenido se denominó IC 375-271.

10. Transformación de plantas de patata con vectores de expresión en planta que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronano sintasa

45 Plantas de patata se transformaron usando el vector de expresión en planta IC 341-222, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una hialuronano sintasa de *Paramecium bursaria Chlorella virus 1* bajo el control del promotor del gen de la patatina B33 de *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa y col., 1989, EMBO J. 8, 23-29) usando el procedimiento proporcionado en el punto 1 de los Procedimientos generales. Las plantas de patata transgénica obtenidas, que se transformaron con el plásmido IC 341-222, se denominaron 365 ES.

50 11. Análisis de las plantas transgénicas transformadas con vectores de expresión en planta que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronano sintasa

a) Construcción de una curva de calibración

Se construyó una curva de calibración usando soluciones patrón suministradas con el kit de ensayo comercial (ácido hialurónico (AH) de Corgenix, Inc., Colorado, EE.UU, Prod. N° 029-001), de acuerdo con los procedimientos descritos por el fabricante. Para determinar la extinción a 1600 ng/ml de hialuronano, se utilizó el doble de la cantidad, en función de la cantidad de patrón suministrado indicado por el fabricante, que comprende 800 ng/ml de hialuronano. En cada caso se realizaron tres series de mediciones independientes, y se determinó el correspondiente promedio. Esto produjo la siguiente curva de calibración:

**Tabla 1:** Valores para construir una curva de calibración para la determinación cuantitativa del contenido de hialuronano en el tejido vegetal. Con ayuda de un programa informático (Microsoft Office Excel 2002, SP2), los valores medidos obtenidos se introdujeron en un diagrama, y se determinó la ecuación de la función de la línea de tendencia (véase la Fig. 1).  $E_{450nm}$  se refiere a la extinción a una longitud de onda de 450 nm, s.d. es la desviación estándar de la media calculada de los valores individuales.

Concentración de hialuronano	Mediciones individuales independientes			Promedio	s.d.
	$E_{450 nm}$	$E_{450 nm}$	$E_{450 nm}$		
0 ng/ml	0,100	0,096	0,096	0,097	0,002
50 ng/ml	0,224	0,183	0,222	0,210	0,023
100 ng/ml	0,396	0,263	0,377	0,345	0,072
200 ng/ml	0,554	0,443	0,653	0,550	0,105
500 ng/ml	1,231	0,850	1,221	1,101	0,217
800 ng/ml	1,465	1,265	1,795	1,508	0,268
1600 ng/ml	2,089	2,487	3,170	2,582	0,547

b) Análisis de los tubérculos de patata de las líneas 365 ES

En un invernadero, se cultivaron plantas individuales de la línea 365 ES en el suelo en macetas de 6 cm. En cada caso, se procesaron aproximadamente 0,3 g de material de tubérculos de patata de las plantas individuales de acuerdo con el procedimiento descrito en el punto 2 de los Procedimientos generales.

Usando el procedimiento descrito en el punto 4 de los Procedimientos generales, se determinó la cantidad de hialuronano presente en los respectivos extractos vegetales mediante la curva de calibración mostrada en el Ejemplo 10a) y la Fig. 1. Aquí, el sobrenadante obtenido tras la centrifugación se utilizó en una dilución de 1:10 para determinar el contenido de hialuronano. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:

**Tabla 2:** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido por plantas transgénicas independiente seleccionadas de la línea 365 ES. La columna 1 se refiere a la planta de la que se ha obtenido el material de tubérculo (aquí, "tipo natural" se refiere a las plantas no transformadas que, sin embargo, tienen el genotipo usado como material de partida para la transformación). La columna 2 indica la cantidad de material de tubérculo de la planta en cuestión utilizada para determinar el contenido de hialuronano. La columna 3 contiene la extinción medida de una dilución 1:10 del respectivo extracto vegetal. La columna 4 se calculó con ayuda de la ecuación de regresión lineal (véase la Fig 1) teniendo en cuenta el factor de dilución, como se establece a continuación:  $((\text{valor columna 3} - 0,149)/0,00185) \times 10$ . La columna 5 indica la cantidad de hialuronano basada en el peso fresco usado y se calculó de la siguiente forma:  $(\text{valor columna 4}/\text{valor columna 2})/1000$ . "n.d." significa no detectable.

Nombre de la planta	Peso del material vegetal empleado [g]	Extinción $E_{450}$	Cantidad de hialuronano [ng/ml]	Hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]
365 EP 13	0,297	2,746	14038	47
365 EP 74	0,306	4,000	20816	68
Tipo natural	0,305	0,111	n.d.	n.d.

12. Transformación de las plantas que sintetizan hialuronano con vectores de expresión en planta que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT y una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH. En cada caso, las plantas de patata de las líneas 365 ES 13 y 365 ES 74 se transformaron con los vectores de expresión en planta IC 370-256, RO 376-256, IC 372-256 e IC 375-271 usando el procedimiento proporcionado en el punto 1 de los Procedimientos generales.
- 5 Las plantas de patata transgénicas obtenidas de la línea 365 ES 13 que se habían transformado con el plásmido IC370-256 se denominaron 393 ES.
- Las plantas de patata transgénicas obtenidas de la línea 365 ES 74 que se habían transformado con el plásmido IC370-256 se denominaron 394 ES.
- 10 Las plantas de patata transgénicas obtenidas de la línea 365 ES 13 que se habían transformado con el plásmido IC372-256 se denominaron 395 ES.
- Las plantas de patata transgénicas obtenidas de la línea 365 ES 74 que se habían transformado con el plásmido IC372-256 se denominaron 396 ES.
- 15 Las plantas de patata transgénicas obtenidas de la línea 365 ES 13 que se habían transformado con el plásmido IC375-271 se denominaron 403 ES.
- Las plantas de patata transgénicas obtenidas de la línea 365 ES 74 que se habían transformado con el plásmido IC375-271 se denominaron 404 ES.
- Las plantas de patata transgénicas obtenidas de la línea 365 ES 13 que se habían transformado con el plásmido IC376-256 se denominaron 408 ES.
- 20 Las plantas de patata transgénicas obtenidas de la línea 365 ES 74 que se habían transformado con el plásmido IC376-256 se denominaron 409 ES.
13. Análisis de plantas de patata transgénicas que sintetizan hialuronano transformadas adicionalmente con vectores de expresión en planta que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT y una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH
- 25 En un invernadero, plantas individuales de las líneas 393 ES, 394 ES, 395 ES, 396 ES, 403 ES, 404 ES y 409 ES se cultivaron en el suelo en macetas de 6 cm. En cada caso, se procesaron aproximadamente 0,3 g de material de tubérculos u hojas de patata de las plantas individuales de acuerdo con el procedimiento descrito en el punto 2 de los Procedimientos generales. Usando el procedimiento descrito en el punto 4 de los Procedimientos generales, se determinó la cantidad de hialuronano contenido en los respectivos extractos vegetales mediante una curva de calibración generada de acuerdo con el Ejemplo 10a), dicha curva de calibración se generó nueva para cada serie de mediciones individuales. Aquí, para determinar el contenido de hialuronano, el sobrenadante obtenido después de la centrifugación se diluyó en cada caso con agua (desmineralizada, conductividad = 18 Mn) de forma tal que los valores de extinción medidos para las muestras individuales estaban comprendidas en el intervalo lineal de la curva de calibración. Los resultados de las plantas originadas a partir de las transformaciones lineales con varios plásmidos se muestran a continuación.
- 30
- 35
- a) Análisis de los tubérculos de la línea 393 ES
- Para cata tubérculo de las plantas transgénicas individuales de las líneas denominadas 393 ES, se tomaron dos muestras independientes, y el contenido de hialuronano, en cada caso, se determinó por separado. A continuación se calcularon la media y la desviación estándar de los valores obtenidos de las mediciones individuales usando la fórmula proporcionada en el punto 5 de los Procedimientos generales. Se calcularon las medias y desviaciones estándar indicadas para las plantas denominadas naturales y las plantas denominadas 365 ES 13 calculando la cantidad de hialuronano en tubérculos de, en cada caso, diez plantas diferentes que eran progenie vegetativa de la planta natural (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) y de la línea 365 ES 13, respectivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:
- 40
- 45 **Tabla 3:** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en tubérculos de plantas transgénicas independiente seleccionadas de la línea 393 ES. La columna 1 contiene el nombre de la planta del que se ha obtenido el material del tubérculo (aquí, "natural" se refiere a plantas que no se han transformado; 365 ES 13 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 370-256 para generar las líneas 393 ES). La columna 2 muestra la media de la cantidad de hialuronano determinada para los tubérculos en cuestión. La columna 3 muestra la desviación estándar de las medias determinadas.
- 50

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
393 EP 6	126,42	12,7
393 EP 18	113,10	26,1
393 EP 23	112,83	18,7
393 EP 38	102,81	19,2
393 EP 36	99,71	16,7
393 EP 52	90,78	3,5
393 EP 50	90,31	8,7
393 EP 49	88,63	14,4
393 EP 32	87,82	15,2
393 EP 16	86,09	17,8
393 EP 33	80,47	16,3
Tipo natural	0,52	0,8
365 EP 13	72,62	16,4

b) Análisis de los tubérculos de la línea 394 ES

5 Para cata tubérculo de las plantas transgénicas individuales de las líneas denominadas 394 ES, se tomaron dos muestras independientes, y el contenido de hialuronano, en cada caso, se determinó por separado. A continuación se calcularon la media y la desviación estándar de los valores obtenidos de las mediciones individuales usando la fórmula proporcionada en el punto 5 de los Procedimientos generales. Se calcularon las medias y desviaciones estándar indicadas para las plantas denominadas naturales y las plantas denominadas 365 ES calculando la cantidad de hialuronano en tubérculos de, en cada caso, 18 plantas naturales diferentes y 26 plantas de la línea 365 ES 74 que eran progenie vegetativa de la planta natural (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) y de la línea 365 ES 74, respectivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:

15 **Tabla 4** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en tubérculos de plantas transgénicas independiente seleccionadas de la línea 394 ES. La columna 1 contiene el nombre de la planta del que se ha obtenido el material del tubérculo (aquí, "natural" se refiere a plantas que no se han transformado; 365 ES 74 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 370-256 para generar las líneas 394 ES). La columna 2 muestra la media de la cantidad de hialuronano determinada para los tubérculos en cuestión. La columna 3 muestra la desviación estándar de las medias determinadas.

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
394 EP 47	242,24	12,7
394 EP 37	227,66	15,2
394 EP 45	185,90	12,8
394 EP 56	176,82	25,1
394 EP 43	172,83	15,3
394 EP 14	168,80	27,1
394 EP 52	157,81	16,1
394 EP 28	145,20	8,5
394 EP 5	131,11	17,9
394 EP 26	127,56	13,5

(continuación)

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
394 EP 1	126,22	15,4
394 EP 15	125,46	9,9
Tipo natural	1,29	0,8
365 EP 74	104,34	26,1

c) Análisis de los tubérculos de la línea 395 ES

5 Para cata tubérculo de las plantas transgénicas individuales de las líneas denominadas 395 ES, si es posible, se tomaron dos muestras independientes, y el contenido de hialuronano, en cada caso, se determinó por separado. A continuación se calcularon la media y la desviación estándar de los valores obtenidos de las mediciones individuales usando la fórmula proporcionada en el punto 5 de los Procedimientos generales. Se calcularon las medias y desviaciones estándar indicadas para las plantas denominadas naturales y las plantas denominadas 365 ES calculando la cantidad de hialuronano en tubérculos de, en cada caso, 10 plantas naturales diferentes y 18 plantas de la línea 365 ES 13 que eran progenie vegetativa de la planta natural (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) y de la línea 365 ES 13, respectivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:

15 **Tabla 5** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en tubérculos de plantas transgénicas independiente seleccionadas de la línea 395 ES. La columna 1 contiene el nombre de la planta del que se ha obtenido el material del tubérculo (aquí, "natural" se refiere a plantas que no se han transformado; 365 ES 13 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 372-256 para generar las líneas 395 ES). La columna 2 muestra la media de la cantidad de hialuronano determinada para los tubérculos en cuestión. La columna 3 muestra la desviación estándar de las medias determinadas. En el caso de las plantas para las que no se indica la desviación estándar, se determinó el contenido de hialuronano de una sola muestra de tubérculo.

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [mg/g]	Desviación estándar
395 EP 17	1321,75	
395 EP 29	1145,32	
395 EP 60	999,66	484,50
395 EP 16	791,64	
395 EP 53	770,93	57,35
395 EP 10	651,30	
395 EP 26	299,37	58,78
395 EP 3	288,21	
395 EP 13	228,22	
395 EP 38	96,10	12,30
Tipo natural	0,31	0,22
365 EP 13	77,16	16,56

20

d) Análisis de las hojas de la línea 395 ES

25 Se determinó el contenido de hialuronano de las hojas individuales de las plantas de las líneas que tienen el nombre 395 ES. Se calcularon las medias y desviaciones estándar indicadas para las plantas denominadas naturales y las plantas denominadas 365 ES calculando en cada caso la cantidad de hialuronano en hojas de 4 plantas naturales diferentes y 9 plantas de la línea 365 ES 13, que eran progenie vegetativa de la planta natural (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) y de la línea 365 ES 13, respectivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:

5 **Tabla 6** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en hojas de plantas transgénicas independiente seleccionadas de la línea 395 ES. La columna 1 contiene el nombre de la planta del que se ha obtenido el material del tubérculo (aquí, "natural" se refiere a plantas que no se han transformado; 365 ES 13 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 372-256 para generar las líneas 395 ES). La columna 2 muestra la media de la cantidad de hialuronano determinada para los tubérculos en cuestión. La columna 3 muestra la desviación estándar de las medias determinadas. En el caso de las plantas para las que no se indica la desviación estándar, se determinó el contenido de hialuronano de una sola muestra de hoja.

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [µg/g]	Desviación estándar
395 EP 34	619,17	
395 EP 45	589,52	
395 EP 51	420,81	
395 EP 46	405,81	
395 EP 24	401,68	
395 EP 12	392,90	
395 EP 43	381,78	
395 EP 21	368,04	
395 EP 33	352,25	
395 EP 25	350,90	
395 EP 22	344,44	
395 EP 48	338,52	
395 EP 4	300,86	
395 EP 28	298,30	
395 EP 36	291,51	
395 EP 2	274,05	
395 EP 14	219,96	
395 EP 56	158,39	
395 EP 57	94,17	
Tipo natural	0,18	0,14
365 EP 13	44,76	18,71

10 e) Análisis de los tubérculos de la línea 396 ES

15 Para cada tubérculo de las plantas transgénicas individuales de las líneas denominadas 396, se tomaron dos muestras independientes, y el contenido de hialuronano, en cada caso, se determinó por separado. A continuación se calcularon la media y la desviación estándar de los valores obtenidos de las mediciones individuales usando la fórmula proporcionada en el punto 5 de los Procedimientos generales. Se calcularon las medias y desviaciones estándar indicadas para las plantas denominadas naturales y las plantas denominadas 365 ES calculando la cantidad de hialuronano en tubérculos de, en cada caso, 12 plantas naturales diferentes y 14 plantas de la línea 365 ES 74 que eran progenie vegetativa de la planta natural (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) y de la línea 365 ES 74, respectivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:

5 **Tabla 7** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en tubérculos de plantas transgénicas independiente seleccionadas de la línea 396 ES. La columna 1 contiene el nombre de la planta del que se ha obtenido el material del tubérculo (aquí, "natural" se refiere a plantas que no se han transformado; 365 ES 74 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 372-256 para generar las líneas 396 ES). La columna 2 muestra la media de la cantidad de hialuronano determinada para los tubérculos en cuestión. La columna 3 muestra la desviación estándar de las medias determinadas.

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
396 EP 42	1283,02	229,8
396 ES44	1146,29	235,1
396 EP 33	804,90	500,1
396 EP 9	670,56	91,7
396 EP 2	389,61	67,2
396 EP 15	380,60	18,4
396 EP 28	371,66	159,9
396 EP 30	204,20	13,5
396 EP 8	186,69	55,5
396 EP 4	161,61	25,8
Tipo natural	0,95	0,6
365 EP 74	142,70	57,5

f) Análisis de las hojas de la línea 396 ES

10 Se determinó el contenido de hialuronano de las hojas individuales de las plantas de las líneas que tienen el nombre 396 ES. Se calcularon las medias y desviaciones estándar indicadas para las plantas denominadas naturales y las plantas denominadas 365 ES calculando en cada caso la cantidad de hialuronano en hojas de 4 plantas naturales diferentes y 6 plantas de la línea 365 ES 13, que eran progenie vegetativa de la planta natural (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) y de la línea 365 ES 13, respectivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas  
15 seleccionadas:

20 **Tabla 8** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en hojas de plantas transgénicas independiente seleccionadas de la línea 396 ES. La columna 1 contiene el nombre de la planta del que se ha obtenido el material de la hoja (aquí, "natural" se refiere a plantas que no se han transformado; 365 ES 74 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 372-256 para generar las líneas 396 ES). La columna 2 muestra la media de la cantidad de hialuronano determinada para los tubérculos en cuestión. La columna 3 muestra la desviación estándar de las medias determinadas. En el caso de las plantas para las que no se indica la desviación estándar, se determinó el contenido de hialuronano de una sola muestra de hoja.

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
396 EP 51	1160,57	
396 EP 32	941,89	
396 EP 11	938,33	
396 EP 36	860,54	
396 EP 57	807,97	

(continuación)

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
396 EP 25	801,58	
396 EP 34	796,79	
396 EP 50	619,23	
396 EP 49	538,75	
396 EP 48	461,05	
396 EP 24	443,57	
396 EP 17	426,79	
396 EP 16	416,43	
396 EP 23	271,85	
396 EP 43	258,47	
396 EP 14	186,78	
Tipo natural	0,15	0,08
365 EP 74	106,35	56,77

g) Análisis de los tubérculos de la línea 403 ES

5 Para cada tubérculo de las plantas transgénicas individuales de las líneas denominadas 403 ES, se tomaron dos muestras independientes, de ser posible, y el contenido de hialuronano, en cada caso, se determinó por separado. A  
10 continuación se calcularon la media y la desviación estándar de los valores obtenidos de las mediciones individuales usando la fórmula proporcionada en el punto 5 de los Procedimientos generales. Se calcularon las medias y desviaciones estándar indicadas para las plantas denominadas naturales y las plantas denominadas 365 ES calculando la cantidad de hialuronano en tubérculos de, en cada caso, 10 plantas naturales diferentes y 10 plantas  
15 de la línea 365 ES 13 que eran progenie vegetativa de la planta natural (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) y de la línea 365 ES 13, respectivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:

15 **Tabla 9** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en tubérculos de plantas transgénicas independiente seleccionadas de la línea 403 ES. La columna 1 contiene el nombre de la planta del que se ha obtenido el material del tubérculo (aquí, "natural" se refiere a plantas que no se han transformado; 365 ES 13 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 375-271 para generar las líneas 403 ES). La columna 2 muestra la media de la cantidad de hialuronano determinada para los tubérculos en cuestión. La columna 3 muestra la desviación estándar de las medias determinadas. "n.d." significa que no fue posible detectar el hialuronano en los tubérculos. En el caso de las plantas para las que no se indica la desviación estándar, se determinó el contenido de  
20 hialuronano de una sola muestra de tubérculo.

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
403 EP 2	687,90	
403 EP 5	457,56	
403 EP 4	366,34	
403 EP 15	295,00	
403 EP 30	241,03	
403 EP 8	140,51	
403 EP 41	107,65	
Tipo natural	n.d.	-
365 EP 13	89,42	24,87

h) Análisis de las hojas de la línea 403 ES

Se determinó el contenido de hialuronano de las hojas individuales de las plantas de las líneas que tienen el nombre 403 ES. Se calcularon las medias y desviaciones estándar indicadas para las plantas denominadas naturales y las plantas denominadas 365 ES calculando en cada caso la cantidad de hialuronano en hojas de 5 plantas naturales diferentes y 5 plantas de la línea 365 ES 13, que eran progenie vegetativa de la planta natural (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) y de la línea 365 ES 13, respectivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:

**Tabla 10** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en hojas de plantas transgénicas independiente seleccionadas de la línea 403 ES. La columna 1 contiene el nombre de la planta del que se ha obtenido el material de la hoja (aquí, "natural" se refiere a plantas que no se han transformado; 365 ES 13 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 375-271 para generar las líneas 403 ES). La columna 2 muestra la media de la cantidad de hialuronano determinada para los tubérculos en cuestión. La columna 3 muestra la desviación estándar de las medias determinadas. En el caso de las plantas para las que no se indica la desviación estándar, se determinó el contenido de hialuronano de una sola muestra de hoja.

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [µg/g]	Desviación estándar
403 EP 10	1186,32	
403 EP 50	1141,75	
403 EP 9	1017,62	
403 EP 42	959,01	
403 EP 40	930,39	
403 EP 33	904,65	
403 EP 6	884,45	
403 EP 47	841,92	
403 EP 37	725,39	
403 EP 2	653,23	
403 EP 48	579,14	
403 EP 27	510,98	
Tipo natural	3,93	2,87
365 EP 13	85,46	17,3

i) Análisis de los tubérculos de la línea 404 ES

Para cada tubérculo de las plantas transgénicas individuales de las líneas denominadas 404 ES, se tomaron dos muestras independientes, de ser posible, y el contenido de hialuronano, en cada caso, se determinó por separado. A continuación se calcularon la media y la desviación estándar de los valores obtenidos de las mediciones individuales usando la fórmula proporcionada en el punto 5 de los Procedimientos generales. Se calcularon las medias y desviaciones estándar indicadas para las plantas denominadas naturales y las plantas denominadas 365 ES calculando la cantidad de hialuronano en tubérculos de, en cada caso, 10 plantas naturales diferentes y 12 plantas de la línea 365 ES 74 que eran progenie vegetativa de la planta natural (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) y de la línea 365 ES 74, respectivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:

**Tabla 11** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en tubérculos de plantas transgénicas independiente seleccionadas de la línea 404 ES. La columna 1 contiene el nombre de la planta del que se ha obtenido el material del tubérculo (aquí, "natural" se refiere a plantas que no se han transformado; 365 ES 74 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 375-271 para generar las líneas 404 ES). La columna 2 muestra la media de la cantidad de hialuronano determinada para los tubérculos en cuestión. La columna 3 muestra la desviación estándar de las medias determinadas. "n.d." significa que no fue posible detectar el hialuronano en los tubérculos. En el caso de las plantas para las que no se indica la desviación estándar, se determinó el contenido de hialuronano de una sola muestra de tubérculo.

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
404 EP 16	633,53	
404 EP 47	188,42	7,80
404 EP 45	174,21	1,03
404 EP 17	155,09	
404 EP 2	138,33	4,91
404 EP 30	124,38	
404 EP 18	116,10	14,98
Tipo natural	n.d.	-
365 EP 74	110,23	15,94

j) Análisis de las hojas de la línea 404 ES

Se determinó el contenido de hialuronano de las hojas individuales de las plantas de las líneas que tienen el nombre 404 ES. Se calcularon las medias y desviaciones estándar indicadas para las plantas denominadas naturales y las plantas denominadas 365 ES calculando en cada caso la cantidad de hialuronano en hojas de 7 plantas naturales diferentes y 9 plantas de la línea 365 ES 74, que eran progenie vegetativa de la planta natural (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) y de la línea 365 ES 74, respectivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:

**Tabla 12** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en hojas de plantas transgénicas independiente seleccionadas de la línea 404 ES. La columna 1 contiene el nombre de la planta del que se ha obtenido el material de la hoja (aquí, "natural" se refiere a plantas que no se han transformado; 365 ES 74 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 375-271 para generar las líneas 404 ES). La columna 2 muestra la media de la cantidad de hialuronano determinada para las hojas en cuestión. La columna 3 muestra la desviación estándar de las medias determinadas. En el caso de las plantas para las que no se indica la desviación estándar, se determinó el contenido de hialuronano de una sola muestra de hoja.

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
404 EP 13	1547,12	
404 EP 35	1388,51	
404 EP 29	1146,68	
404 EP 36	1095,11	
404 EP 44	921,11	
404 EP 42	849,43	
404 EP 46	846,81	
404 EP 15	832,32	
404 EP 23	817,91	
404 EP 1	801,14	
404 EP 38	651,12	
404 EP 14	616,79	
404 EP 16	615,92	
404 EP 20	581,11	
404 EP 37	533,89	
404 EP 8	521,92	

(continuación)

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
404 EP 21	489,73	
404 EP 43	479,34	
404 EP 24	434,06	
404 EP 40	371,88	
404 EP 9	366,46	
404 EP 6	365,15	
404 EP 28	359,96	
404 EP 39	353,74	
404 EP 34	310,76	
404 EP 48	302,54	
404 EP 11	231,39	
404 EP 10	226,83	
404 EP 7	218,42	
404 EP 26	205,00	
Tipo natural	0,25	0,09
365 EP 74	83,24	44,73

k) Análisis de los tubérculos de la línea 409 ES

5 Para cata tubérculo de las plantas transgénicas individuales de las líneas denominadas 409 ES, se tomaron muestras, y se determinó el contenido de hialuronano en cada caso. Se calcularon las medias y desviaciones estándar indicadas para las plantas denominadas naturales y las plantas denominadas 365 ES calculando la cantidad de hialuronano en tubérculos de, en cada caso, 4 plantas naturales diferentes y 6 plantas de la línea 365 ES 74 que eran progenie vegetativa de la planta natural (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) y de la línea 365 ES 74, respectivamente. Se calcularon la media y la desviación estándar de los valores obtenidos de las mediciones individuales usando la fórmula proporcionada en el punto 5 de los Procedimientos generales. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:

10 **Tabla 13** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en tubérculos de plantas transgénicas independiente seleccionadas de la línea 395 ES. La columna 1 contiene el nombre de la planta del que se ha obtenido el material del tubérculo (aquí, "natural" se refiere a plantas que no se han transformado, 365 ES 74 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 375-271 para generar las líneas 409 ES). La columna 2 muestra la media de la cantidad de hialuronano determinada para los tubérculos en cuestión. La columna 3 muestra la desviación estándar de las medias determinadas. "n.d." significa que no fue posible detectar el hialuronano en los tubérculos. En el caso de las plantas para las que no se indica la desviación estándar, se determinó el contenido de hialuronano de una sola muestra de tubérculo.

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
409 EP 3	68,75	
409 EP 4	59,80	
409 EP 13	55,87	
409 EP 16	60,28	
409 EP 22	69,47	
409 EP 23	108,67	

(continuación)

Nombre de la planta	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
409 EP 28	66,95	
409 EP 29	79,58	
Tipo natural	n.d.	-
365 EP 74	40,53	16,75

l) Análisis de las hojas de la línea 409 ES

Se determinó el contenido de hialuronano de las hojas individuales de las plantas de las líneas que tienen el nombre 409 ES. Se calcularon las medias y desviaciones estándar indicadas para las plantas denominadas naturales y las plantas denominadas 365 ES calculando en cada caso la cantidad de hialuronano en hojas de 4 plantas naturales diferentes y 6 plantas de la línea 365 ES 74, que eran progenie vegetativa de la planta natural (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) y de la línea 365 ES 74, respectivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:

**Tabla 14** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en hojas de plantas transgénicas independiente seleccionadas de la línea 409 ES. La columna 1 contiene el nombre de la planta del que se ha obtenido el material de la hoja ("natural" se refiere a plantas que no se han transformado); 365 ES 74 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 376-256 para generar las líneas 409 ES). La columna 2 muestra la cantidad de hialuronano determinada para las hojas en cuestión. La columna 3 muestra la desviación estándar de las medias determinadas. "n.d." significa que no se pudo detectar el hialuronano en los tubérculos. En el caso de las plantas para las que no se indica la desviación estándar, se determinó el contenido de hialuronano de una sola muestra de hoja.

Nombre de la planta	Cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
409 EP 3	68,75	
409 EP 4	59,80	
409 EP 13	55,87	
409 EP 16	60,28	
409 EP 22	69,47	
409 EP 23	108,67	
409 EP 28	66,95	
409 EP 29	79,58	
Tipo natural	n.d.	-
365 EP 74	40,53	16,75

m) Determinación del contenido de hialuronano con respecto al peso fresco y con respecto al peso seco

Las hojas individuales de las plantas de las líneas 395 ES y 396 ES, antes de recoger los tubérculos de las plantas en cuestión, se retiraron de las plantas y se dividieron por la mitad. Una mitad de cada hoja individual, en cada caso, se congeló con nitrógeno líquido, la correspondiente otra mitad se criodeseccó durante la noche.

Aproximadamente 0,3 g de material de la hoja del congelado o aproximadamente 0,02 g de las muestras de hojas criodeseccadas se trituraron en un molino de bolas oscilante de laboratorio (MM200, de Retsch, Alemania) (30 s a 30 HZ). Se añadieron aproximadamente 300 ml de agua (desmineralizada, conductividad = 18 Mn) a continuación a cada muestra individual triturada, que se mezclaron a continuación con un mezclador de vórtice, y los residuos celulares y los componentes insolubles se separaron a continuación del sobrenadante por centrifugación (5 minutos a 16 000 xg). Se retiró el sobrenadante, y cada muestra se completó hasta 500 con agua (desmineralizada, conductividad = 18 Mn). Se usaron alícuotas de las muestras preparadas de esta forma para determinar el contenido de hialuronano usando el procedimiento descrito en el punto 4 de los Procedimientos generales 4. Se calcularon la media y la desviación estándar usando la fórmula proporcionada en el punto 5 de los Procedimientos generales. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:

5 **Tabla 15** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en hojas de plantas transgénicas independiente seleccionadas de las líneas 395 ES y 396 ES. La columna 1 cita la planta del que se ha obtenido el material de la hoja. 365 ES 13 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 372-256 para generar las líneas 395 ES. 365 ES 74 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 372-256 para generar las líneas 396 ES. La columna 2 indica la cantidad de hialuronano determinada para las diferentes hojas de las plantas en cuestión. La columna 3 indica la media de las cantidades de hialuronano medidas en diferentes hojas de una planta. La columna 4 muestra la desviación estándar de las medias determinadas.

Nombre de la planta	Cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
395ES 16 I	570,87	491,04	146,80
395ES 16 II	321,62		
395ES 16 III	580,64		
395ES 17 I	414,39	532,55	120,37
395ES 17 II	655,02		
395ES 17 III	528,23		
396ES 9 I	316,64	241,21	88,31
396ES 9 II	144,08		
396ES 9 III	262,92		
396ES 16 I	462,80	622,99	139,45
396ES 16 II	688,92		
396ES 16 III	717,24		
365ES 13 I	43,23	52,77	16,04
365ES 13 II	71,28		
365ES 13 III	43,80		
365ES 74 I	169,75	158,00	12,52
365ES 74 II	144,83		
365ES 74 III	159,42		

10  
15 **Tabla 16** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso seco) producido en hojas de plantas transgénicas independiente seleccionadas de las líneas 395 ES y 396 ES. La columna 1 cita la planta del que se ha obtenido el material de la hoja. 365 ES 13 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 372-256 para generar las líneas 395 ES. 365 ES 74 se refiere a plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 372-256 para generar las líneas 396 ES. La columna 2 indica la cantidad de hialuronano determinada para las diferentes hojas de las plantas en cuestión. La columna 3 indica la media de las cantidades de hialuronano medidas en diferentes hojas de una planta. La columna 4 muestra la desviación estándar de las medias determinadas.

Nombre de la planta	Cantidad de hialuronano basado en peso seco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso seco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Desviación estándar
395ES 16 I	5212,63	4633,54	636,00
395ES 16 II	3952,86		
395ES 16 III	4735,12		

(continuación)

Nombre de la planta	Cantidad de hialuronano basado en peso seco del material vegetal [µg/g]	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso seco del material vegetal [µg/g]	Desviación estándar
395ES 17 I	4402,04	4313,57	77,25
395ES 17 II	4259,45		
395ES 17 III	4279,23		
396ES 9 I	3918,45	2543,02	1383,15
396ES 9 II	1152,27		
396ES 9 III	2558,35		
396ES 16 I	4428,93	5077,92	932,12
396ES 16 II	6146,03		
396ES 16 III	4658,81		
365ES 13 I	373,90	398,74	104,57
365ES 13 II	513,49		
365ES 13 III	308,82		
365ES 74 I	1403,83	1207,71	170,52
365ES 74 II	1094,43		
365ES 74 III	1124,87		

14. Transformación de plantas de tomate con vectores de expresión en planta que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronano sintasa

5 Las plantas de tomate se transformaron inicialmente usando el vector de expresión en planta IC 341-222 que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una hialuronano sintasa de *Paramecium bursaria* *Chlorella* virus 1 bajo el control del promotor del gen de la patatina B33 de *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa y col., 1989, EMBO J. 8, 23-29) usando el procedimiento proporcionado en el punto 8 de los Procedimientos generales. Las plantas de tomate transgénico obtenidas, que se habían transformado con el plásmido IC 341-222, se denominaron 367 ES.

10 Las plantas de tomate de las líneas 367 ES 25 y 367 ES 42 se transformaron a continuación con el vector de expresión en planta IC 341-222 usando el procedimiento proporcionado en el punto 8 de los Procedimientos generales. Las plantas de tomate transgénico obtenidas de la línea 367 ES 25, que se habían transformado con el plásmido IC 341-222, se denominaron 399 ES. Las plantas de tomate transgénico obtenidas de la línea 367 ES 42, que se habían transformado con el plásmido IC 341-222, se denominaron 400 ES.

15 Las plantas de tomate de las líneas 367 ES 25 se transformaron a continuación con el vector de expresión en planta IC 375-271 usando el procedimiento proporcionado en el punto 8 de los Procedimientos generales. Las plantas de tomate transgénico obtenidas de la línea 367 ES 25, que se habían transformado con el plásmido IC 375-271, se denominaron 405 ES.

20 15. Análisis de plantas de tomate transgénicas que sintetizan hialuronano transformadas adicionalmente con vectores de expresión en planta que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT y una proteína que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH

a) Hojas de plantas de tomate de las líneas 399 ES y 400 ES

25 De diferentes plantas de tomate seleccionadas de las líneas 399 ES y 400 ES, que se habían cultivado en el suelo en un invernadero, en cada caso se recogió una hoja que se congeló en nitrógeno líquido. La elaboración adicional y la determinación del contenido de hialuronano se realizaron como se describe en el Ejemplo 11b) para las hojas de las plantas de patata. Se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 17:** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en hojas de plantas transgénicas independiente seleccionadas de las líneas 395 ES y 396 ES. La columna 1 se refiere a la planta del que se ha obtenido el material de la hoja. 367 ES 25 y 367 ES 42 se refieren a diferentes plantas que expresan una hialuronano sintasa y se usaron como material de partida para la transformación con el vector de expresión en planta IC 372-256 para generar las líneas 399 ES y 400 ES, respectivamente. La columna 2 indica el valor de la cantidad de hialuronano determinada para las diferentes hojas de las plantas en cuestión. Natural se refiere a plantas que no se han transformado.

Nombre de la planta	Cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [µg/g]
Tipo natural	0,06
367 EP 25	57,19
399 EP 1	260,24
399 EP 11	835,69
367 EP 42	88,99
400 EP 3	513,27

b) Frutos de plantas de tomate de las líneas 399 ES y 400 ES

De diferentes plantas de tomate seleccionadas de las líneas 399 ES y 400 ES, que se habían cultivado en el suelo en un invernadero, se recogieron en cada caso frutos maduros, se trituraron, se centrifugaron, y el sobrenadante, tras la centrifugación, se filtró. La elaboración adicional del filtrado y la determinación del contenido de hialuronano se realizaron como se describe en el Ejemplo 11b) para las hojas de las plantas de patata. Se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 18:** Cantidad de hialuronano (en mg de hialuronano por g de peso fresco) producido en frutos maduros de plantas transgénicas independiente seleccionadas de las líneas 395 ES y 396 ES. La columna 1 se refiere a la planta del que se ha obtenido el material de la hoja. 367 ES 25-1 y 267 ES-2 se refieren a diferente progenie clonal de la planta 367 ES 25, y 367 ES 42-1 y 267 ES 42-2 se refieren a diferente progenie clonal de la planta 367 ES 42. La columna 2 indica la media de la cantidad de hialuronano determinada en los frutos de las plantas en cuestión. Con este fin, se determinó el contenido de hialuronano de, en cada caso, 3 (líneas 399 ES-1, 400 ES 3), 5 (líneas 367 ES-25-1, 325 ES-2, 367 ES 42-1, 367 ES 42-2) o 6 (línea 399 ES-11) frutos diferentes de las líneas en cuestión. La columna 3 muestra la desviación estándar de las medias determinadas.

Nombre de la planta	Cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [µg/g]	Desviación estándar
Tipo natural	0,01	0,01
367 ES 25 -1	12,04	3,9
367 ES 25 -2	8,51	1,8
399 EP 1	87,02	20,6
399 EP 11	292,79	51,3
367 ES 42-1	12,20	2,4
367 ES 42-2	10,35	2,9
400 EP 3	31,59	13,7

c) Frutos de plantas de tomate de las líneas 405 ES

De diferentes plantas de tomate seleccionadas de las líneas y 405 ES, que se habían cultivado en el suelo en un invernadero, se recogieron en cada caso frutos maduros, se trituraron, se centrifugaron, y el sobrenadante, tras la centrifugación, se filtró. La elaboración adicional del filtrado y la determinación del contenido de hialuronano se realizaron como se describe en el Ejemplo 11b) para las hojas de las plantas de patata. Se obtuvieron los siguientes resultados:

5 **Tabla 19:** Cantidad de hialuronano (en  $\mu\text{g}$  de hialuronano por g de peso fresco) producido en frutos maduros de plantas transgénicas independiente seleccionadas de las líneas 405 ES. La columna 1 se refiere a la planta del que se ha obtenido el material de la hoja. 367 ES 25-8 y 367 ES 25-9 se refieren a diferente progenie clonal de la planta 367 ES 25. Las extensiones en cifras latinas se refieren a los diferentes frutos de la planta respectiva. ("wt" se refiere a las plantas no transformadas). La columna 2 indica la media de la cantidad de hialuronano determinada en los frutos de las plantas en cuestión. La columna 3 muestra la desviación estándar de las medias determinadas.

Nombre de la muestra	Cantidad de hialuronano basado en peso fresco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]	Media de la cantidad de hialuronano basado en peso seco del material vegetal [ $\mu\text{g/g}$ ]
405ES 5 I	207,20	254,94
405ES 5 II	302,67	
405ES 10 I	1232,38	1074,94
405ES 10 II	917,50	
wt I	0,86	0,46
wt II	0,06	
367ES 25-8 I	136,67	155,70
367ES 25-8 II	174,72	
367ES 25-9 I	37,76	

#### 16) Observaciones finales

10 Cuando se determinó el contenido de hialuronano de diferentes hojas de una planta, se encontró que las hojas más viejas de la misma planta contenían por lo general más hialuronano que las hojas más jóvenes de la misma planta. Por consiguiente, el contenido de hialuronano en hojas parece aumentar con la edad de la hoja, por lo que puede asumirse que el hialuronano se acumula con el tiempo. Este fenómeno puede explicar las diferentes cantidades de hialuronano encontradas en mediciones independientes para la progenie de la misma línea.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Bayer CropScience GmbH

<120> Procedimientos y medios mejorados para producir hialuronano

20 <130> BCS 05-5010 PCT

<150> EP05090277.4  
<151> 05-10-2005

25 <150> EP06090053.7  
<151> 07-04-2006

<150> US60/725.530  
<151> 11-10-2005

30 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.3

35 <210> 1  
<211> 1707  
<212> ADN  
<213> *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*

40 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1707)

<300>

ES 2 536 916 T3

<308> PB42580  
 <309> 24-12-1995  
 <313> (50903)..(52609)

5 <400> 1

atg ggt aaa aat ata atc ata atg gtt tcg tgg tac acc atc ata act	48
Met Gly Lys Asn Ile Ile Ile Met Val Ser Trp Tyr Thr Ile Ile Thr	
1 5 10 15	
tca aat cta atc gcg gtt gga gga gcc tct cta atc ttg gct ccg gca	96
Ser Asn Leu Ile Ala Val Gly Gly Ala Ser Leu Ile Leu Ala Pro Ala	
20 25 30	
att act ggg tat gtt cta cat tgg aat att gct ctc tcg aca atc tgg	144
Ile Thr Gly Tyr Val Leu His Trp Asn Ile Ala Leu Ser Thr Ile Trp	
35 40 45	
gga gta tca gct tat ggt att ttc gtt ttt ggg ttt ttc ctt gca caa	192
Gly Val Ser Ala Tyr Gly Ile Phe Val Phe Gly Phe Phe Leu Ala Gln	
50 55 60	
ggt tta ttt tca gaa ctg aac agg aaa cgt ctt cgc aag tgg att tct	240
Val Leu Phe Ser Glu Leu Asn Arg Lys Arg Leu Arg Lys Trp Ile Ser	
65 70 75 80	
ctc aga cct aag ggt tgg aat gat gtt cgt ttg gct gtg atc att gct	288
Leu Arg Pro Lys Gly Trp Asn Asp Val Arg Leu Ala Val Ile Ile Ala	
85 90 95	
gga tat cgc gag gat cct tat atg ttc cag aag tgc ctc gag tct gta	336
Gly Tyr Arg Glu Asp Pro Tyr Met Phe Gln Lys Cys Leu Glu Ser Val	
100 105 110	
cgt gac tct gat tat ggc aac gtt gcc cgt ctg att tgt gtg att gac	384
Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Asn Val Ala Arg Leu Ile Cys Val Ile Asp	
115 120 125	

ES 2 536 916 T3

ggt gat gag gac gat gat atg agg atg gct gcc gtt tac aag gcg atc Gly Asp Glu Asp Asp Asp Met Arg Met Ala Ala Val Tyr Lys Ala Ile 130 135 140	432
tac aat gat aat atc aag aag ccc gag ttt gtt ctg tgt gag tca gac Tyr Asn Asp Asn Ile Lys Lys Pro Glu Phe Val Leu Cys Glu Ser Asp 145 150 160	480
gac aag gaa ggt gaa cgc atc gac tct gat ttc tct cgc gac att tgt Asp Lys Glu Gly Glu Arg Ile Asp Ser Asp Phe Ser Arg Asp Ile Cys 165 170 175	528
gtc ctc cag cct cat cgt gga aaa cgg gag tgt ctt tat act ggg ttt Val Leu Gln Pro His Arg Gly Lys Arg Glu Cys Leu Tyr Thr Gly Phe 180 185 190	576
caa ctt gca aag atg gac ccc agt gtc aat gct gtc gtt ctg att gac Gln Leu Ala Lys Met Asp Pro Ser Val Asn Ala Val Val Leu Ile Asp 195 200 205	624
agc gat acc gtt ctc gag aag gat gct att ctg gaa gtt gta tac cca Ser Asp Thr Val Leu Glu Lys Asp Ala Ile Leu Glu Val Val Tyr Pro 210 215 220	672
ctt gca tgc gat ccc gag atc caa gcc gtt gca ggt gag tgt aag att Leu Ala Cys Asp Pro Glu Ile Gln Ala Val Ala Gly Glu Cys Lys Ile 225 230 240	720
tgg aac aca gac act ctt ttg agt ctt ctc gtc gct tgg cgg tac tat Trp Asn Thr Asp Thr Leu Leu Ser Leu Val Ala Trp Arg Tyr Tyr 245 250 255	768
tct gcg ttt tgt gtg gag agg agt gcc cag tct ttt ttc agg act gtt Ser Ala Phe Cys Val Glu Arg Ser Ala Gln Ser Phe Phe Arg Thr Val 260 265 270	816
cag tgc gtt ggg ggg cca ctg ggt gcc tac aag att gat atc att aag Gln Cys Val Gly Gly Pro Leu Gly Ala Tyr Lys Ile Asp Ile Ile Lys 275 280 285	864
gag att aag gac ccc tgg att tcc cag cgc ttt ctt ggt cag aag tgt Glu Ile Lys Asp Pro Trp Ile Ser Gln Arg Phe Leu Gly Gln Lys Cys 290 295 300	912
act tac ggt gac gac cgc cgg cta acc aac gag atc ttg atg cgt ggt Thr Tyr Gly Asp Asp Arg Arg Leu Thr Asn Glu Ile Leu Met Arg Gly 305 310 315 320	960
aaa aag gtt gtg ttc act cca ttt gct gtt ggt tgg tct gac agt ccg Lys Lys Val Val Phe Thr Pro Phe Ala Val Gly Trp Ser Asp Ser Pro 325 330 335	1008
acc aat gtg ttt cgg tac atc gtt cag cag acc cgc tgg agt aag tcg Thr Asn Val Phe Arg Tyr Ile Val Gln Gln Thr Arg Trp Ser Lys Ser 340 345 350	1056
tgg tgc cgc gaa att tgg tac acc ctc ttc gcc gcg tgg aag cac ggt Trp Cys Arg Glu Ile Trp Tyr Thr Leu Phe Ala Ala Trp Lys His Gly 355 360 365	1104
ttg tct gga att tgg ctg gcc ttt gaa tgt ttg tat caa att aca tac Leu Ser Gly Ile Trp Leu Ala Phe Glu Cys Leu Tyr Gln Ile Thr Tyr 370 375 380	1152
ttc ttc ctc gtg att tac ctc ttt tct cgc cta gcc gtt gag gcc gac Phe Phe Leu Val Ile Tyr Leu Phe Ser Arg Leu Ala Val Glu Ala Asp 385 390 400	1200

ES 2 536 916 T3

cct cgc gcc cag aca gcc acg gtg att gtg agc acc acg gtt gca ttg 1248  
 Pro Arg Ala Gln Thr Ala Thr Val Ile Val Ser Thr Thr Val Ala Leu  
 405 410 415

att aag tgt ggg tat ttt tca ttc cga gcc aag gat att cgg gcg ttt 1296  
 Ile Lys Cys Gly Tyr Phe Ser Phe Arg Ala Lys Asp Ile Arg Ala Phe  
 420 425 430

tac ttt gtg ctt tat aca ttt gtt tac ttt ttc tgt atg att ccg gcc 1344  
 Tyr Phe Val Leu Tyr Thr Phe Val Tyr Phe Phe Cys Met Ile Pro Ala  
 435 440 445

agg att act gca atg atg acg ctt tgg gac att gcc tgg ggt act cgc 1392  
 Arg Ile Thr Ala Met Met Thr Leu Trp Asp Ile Gly Trp Gly Thr Arg  
 450 455 460

ggt gga aac gag aag cct tcc gtt ggc acc cgg gtc gct ctg tgg gca 1440  
 Gly Gly Asn Glu Lys Pro Ser Val Gly Thr Arg Val Ala Leu Trp Ala  
 465 470 475 480

aag caa tat ctc att gca tat atg tgg tgg gcc gcg gtt gtt gcc gct 1488  
 Lys Gln Tyr Leu Ile Ala Tyr Met Trp Trp Ala Ala Val Val Gly Ala  
 485 490 495

gga gtt tac agc atc gtc cat aac tgg atg ttc gat tgg aat tct ctt 1536  
 Gly Val Tyr Ser Ile Val His Asn Trp Met Phe Asp Trp Asn Ser Leu  
 500 505 510

tct tat cgt ttt gct ttg gtt ggt att tgt tct tac att gtt ttt att 1584  
 Ser Tyr Arg Phe Ala Leu Val Gly Ile Cys Ser Tyr Ile Val Phe Ile  
 515 520 525

ggt att gtg ctg gtg gtt tat ttc acc gcc aaa att acg act tgg aat 1632  
 Val Ile Val Leu Val Val Tyr Phe Thr Gly Lys Ile Thr Thr Trp Asn  
 530 535 540

ttc acg aag ctt cag aag gag cta atc gag gat cgc gtt ctg tac gat 1680  
 Phe Thr Lys Leu Gln Lys Glu Leu Ile Glu Asp Arg Val Leu Tyr Asp  
 545 550 555 560

gca act acc aat gct cag tct gtg tga 1707  
 Ala Thr Thr Asn Ala Gln Ser Val  
 565

<210> 2  
 <211> 568  
 5 <212> PRT  
 <213> *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*  
 <400> 2

Met Gly Lys Asn Ile Ile Ile Met Val Ser Trp Tyr Thr Ile Ile Thr  
 1 5 10 15

Ser Asn Leu Ile Ala Val Gly Gly Ala Ser Leu Ile Leu Ala Pro Ala  
 20 25 30

Ile Thr Gly Tyr Val Leu His Trp Asn Ile Ala Leu Ser Thr Ile Trp  
 35 40 45

Gly Val Ser Ala Tyr Gly Ile Phe Val Phe Gly Phe Phe Leu Ala Gln  
 50 55 60

10

ES 2 536 916 T3

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

ES 2 536 916 T3

Thr Asn Val Phe Arg Tyr Ile Val Gln Gln Thr Arg Trp Ser Lys Ser  
 340 345 350

Trp Cys Arg Glu Ile Trp Tyr Thr Leu Phe Ala Ala Trp Lys His Gly  
 355 360 365

Leu Ser Gly Ile Trp Leu Ala Phe Glu Cys Leu Tyr Gln Ile Thr Tyr  
 370 375 380

Phe Phe Leu Val Ile Tyr Leu Phe Ser Arg Leu Ala Val Glu Ala Asp  
 385 390 400

Pro Arg Ala Gln Thr Ala Thr Val Ile Val Ser Thr Thr Val Ala Leu  
 405 410 415

Ile Lys Cys Gly Tyr Phe Ser Phe Arg Ala Lys Asp Ile Arg Ala Phe  
 420 425 430

Tyr Phe Val Leu Tyr Thr Phe Val Tyr Phe Phe Cys Met Ile Pro Ala  
 435 440 445

Arg Ile Thr Ala Met Met Thr Leu Trp Asp Ile Gly Trp Gly Thr Arg  
 450 455 460

Gly Gly Asn Glu Lys Pro Ser Val Gly Thr Arg Val Ala Leu Trp Ala  
 465 470 475 480

Lys Gln Tyr Leu Ile Ala Tyr Met Trp Trp Ala Ala Val Val Gly Ala  
 485 490 495

Gly Val Tyr Ser Ile Val His Asn Trp Met Phe Asp Trp Asn Ser Leu  
 500 505 510

Ser Tyr Arg Phe Ala Leu Val Gly Ile Cys Ser Tyr Ile Val Phe Ile  
 515 520 525

Val Ile Val Leu Val Val Tyr Phe Thr Gly Lys Ile Thr Thr Trp Asn  
 530 535 540

Phe Thr Lys Leu Gln Lys Glu Leu Ile Glu Asp Arg Val Leu Tyr Asp  
 545 550 555 560

Ala Thr Thr Asn Ala Gln Ser Val  
 565

<210> 3  
 <211> 1707  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia sintética que codifica una proteína hialuronano sintasa de *Paramecium bursaria Chlorella* virus

10

<400> 3

ES 2 536 916 T3

atgggtaaga acattatcat tatggtgtcc tggtagacaaa ttattacaag taatctcatc 60  
gcagttggtg gtgcatctct tattctcgct ccagctatca ctggatatgt tcttcaactg 120  
aacatcgccc tctcaactat ttggggagtt tccgcatatg gtatttttgt tttcgggttc 180  
tttttggtc aggttctggt ctcagagctc aatcgtaaga gactcaggaa gtggattagc 240  
cttagaccaa aggggtggaa tgacgttcgt ctcgctgtca ttatcgctgg ctaccgtgaa 300  
gatccttaca tgtttcaaaa gtgcttggaa tcagttaggg atagtgatta tggcaacgtc 360  
gctagactga tctgtgtgat tgatggagat gaggacgacg atatgaggat ggcagctggt 420  
tataaggcta tctataatga taacattaag aagcctgaat ttgttctttg cgagtctgat 480  
gacaaggaag gagaacggat tgattcagat ttctcacgtg atatctcgct tctccaacct 540  
catcgtggga agcgtgaatg tctttataca ggtttccaac tcgccaaaat ggacccatca 600  
gtgaacgctg tggttcttat cgatagtgat actgtgctgg agaaagatgc tatcttggag 660  
gttgtttacc ctcttgccctg tgatcctgaa attcaagctg tggctggaga gtgcaagatc 720  
tggaacacag atactcttct ttctctgctt gtcgcatgga gatattactc cgcattctgt 780  
gtggagagga gcgctcaatc ctttttccgt accgttcaat gcgttgggtg tcttttggga 840  
gcttacaaaa ttgatatcat caaggagatt aaggacccat ggattagtca aaggtttctt 900  
ggtcagaagt gcacttatgg cgatgatcgt agattgacta acgaaatcct tatgaggggc 960  
aagaaagtcg tttttactcc atttgctgtc ggatggctctg attcacctac aaatgttttc 1020  
cgttatattg tgcaacaaac acgttggagt aagagctggt gtagggagat ctggtacact 1080  
ttgttcgctg cttggaagca cgggcttagc ggaatttggc ttgcttttga atgcctttac 1140  
cagattacat actttttctt ggtgatctat ttgttttcac gtcttgccgt cgaggctgac 1200  
cctagagcac agactgcaac tgtgattggt tctactacag tcgcacttat taagtgtggc 1260  
tatttcagtt ttagagcaaa agatattaga gccctctatt ttgttttgta cacatttgtt 1320  
tatttctttt gcatgattcc agctcgtatt accgctatga tgacctgtg ggacatcgga 1380  
tggggaacta gaggtggtaa cgaaaagcct tctgtgggaa caaggggtggc cctttgggca 1440  
aaacaatatc tcatcgcta catgtggtgg gccgctgtcg ttggtgccgg agtgactca 1500  
atcgttcata actggatggt tgactggaac tctttgagct atcgtttcgc tcttgtgggt 1560  
atttgttctt acattgtttt catcgtgatt gtgctcgttg tgtatttcac tggtaaaatc 1620  
acaacctgga atttactaa acttcaaaag gaattgattg aagacagggc tctgtatgat 1680  
gctactacca acgcccagtc agtttaa 1707

- 5 <210> 4
- <211> 1260
- <212> ADN
- <213> *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*
- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (62)..(1228)
- <300>
- <308> U42580.4
- <309> 20-09-2004
- 15 <313> (291749)..(292918)

ES 2 536 916 T3

<400> 4

atcaacgtga tttatatattt aaacaaagac cattcacatc tttagtactt aattaattat	60
a atg tca cga atc gca gtc gtt ggt tgt ggt tac gtc gga acc gct tgt	109
Met Ser Arg Ile Ala Val Val Gly Cys Gly Tyr Val Gly Thr Ala Cys	
1 5 10 15	
gca gta ctt ctt gct caa aaa aac gaa gtc atc gtg ctt gat att agc	157
Ala Val Leu Leu Ala Gln Lys Asn Glu Val Ile Val Leu Asp Ile Ser	
20 25 30	
gaa gac cgt gtt caa cta atc aag aac aag aag agt cca atc gag gac	205
Glu Asp Arg Val Gln Leu Ile Lys Asn Lys Lys Ser Pro Ile Glu Asp	
35 40 45	
aag gaa atc gaa gag ttt ctc gaa acg aaa gac ctg aac ctg acc gcg	253
Lys Glu Ile Glu Glu Phe Leu Glu Thr Lys Asp Leu Asn Leu Thr Ala	
50 55 60	
acg act gac aag gtt ctt gca tac gaa aac gcc gaa ttt gtc atc atc	301
Thr Thr Asp Lys Val Leu Ala Tyr Glu Asn Ala Glu Phe Val Ile Ile	
65 70 75 80	
gca acc ccg act gac tat gac gtg gtt act agg tat ttt aac acg aaa	349
Ala Thr Pro Thr Asp Tyr Asp Val Val Thr Arg Tyr Phe Asn Thr Lys	
85 90 95	
tct gtg gaa aac gtc att ggg gac gtg atc aaa aat aca cag acc cat	397
Ser Val Glu Asn Val Ile Gly Asp Val Ile Lys Asn Thr Gln Thr His	
100 105 110	
cca act atc gtg att aaa tct acc atc ccc att gga ttt gtt gat aag	445
Pro Thr Ile Val Ile Lys Ser Thr Ile Pro Ile Gly Phe Val Asp Lys	
115 120 125	
gtt cgt gag caa ttc gac tac caa aat atc att ttc tcc cca gaa ttt	493
Val Arg Glu Gln Phe Asp Tyr Gln Asn Ile Ile Phe Ser Pro Glu Phe	
130 135 140	
ctg cgt gaa ggt aga gcc ttg tat gat aat ctc tac cca tcc cgt atc	541
Leu Arg Glu Gly Arg Ala Leu Tyr Asp Asn Leu Tyr Pro Ser Arg Ile	
145 150 155 160	
atc gta gga gat gat tcc ccc att gcg ctt aag ttc gca aac ctt ctc	589
Ile Val Gly Asp Asp Ser Pro Ile Ala Leu Lys Phe Ala Asn Leu Leu	
165 170 175	
gtt gaa ggt tct aaa act ccg ctt gcc cct gtc ctg acg atg gga act	637
Val Glu Gly Ser Lys Thr Pro Leu Ala Pro Val Leu Thr Met Gly Thr	
180 185 190	
cgc gaa gcc gag gcc gtc aaa cta ttc tct aac acg tat ctt gca atg	685
Arg Glu Ala Glu Ala Val Lys Leu Phe Ser Asn Thr Tyr Leu Ala Met	
195 200 205	
cga gtt gca tac ttc aac gaa cta gat aca ttc gca atg tct cac ggt	733
Arg Val Ala Tyr Phe Asn Glu Leu Asp Thr Phe Ala Met Ser His Gly	
210 215 220	

atg aat gcg aaa gaa atc att gat ggt gtg act ctg gag cct cgc att 781  
 Met Asn Ala Lys Glu Ile Ile Asp Gly Val Thr Leu Glu Pro Arg Ile  
 225 230 235 240

ggt cag ggg tac tca aac cct tcg ttc ggt tat gga gct tat tgc ttt 829  
 Gly Gln Gly Tyr Ser Asn Pro Ser Phe Gly Tyr Gly Ala Tyr Cys Phe  
 245 250 255

cca aag gat acg aag caa ctg ctg gct aat ttc gag gga gtg cct caa 877  
 Pro Lys Asp Thr Lys Gln Leu Leu Ala Asn Phe Glu Gly Val Pro Gln  
 260 265 270

gat atc atc gga gca att gta gaa tca aat gag act cgc aag gaa gtg 925  
 Asp Ile Ile Gly Ala Ile Val Glu Ser Asn Glu Thr Arg Lys Glu Val  
 275 280 285

att gtg agt gaa gta gaa aat cgt ttc ccc acg act gtt ggt gtg tat 973  
 Ile Val Ser Glu Val Glu Asn Arg Phe Pro Thr Thr Val Gly Val Tyr  
 290 295 300

aag ctc gcc gct aaa gcg ggt tct gat aat ttt cgg agt tct gca att 1021  
 Lys Leu Ala Ala Lys Ala Gly Ser Asp Asn Phe Arg Ser Ser Ala Ile  
 305 310 320

gta gac ata atg gag cga ctt gca aac aag ggt tat cac att aag att 1069  
 Val Asp Ile Met Glu Arg Leu Ala Asn Lys Gly Tyr His Ile Lys Ile  
 325 330 335

ttc gaa cca act gtg gaa caa ttc gaa aac ttt gaa gtt gat aac aac 1117  
 Phe Glu Pro Thr Val Glu Gln Phe Glu Asn Phe Glu Val Asp Asn Asn  
 340 345 350

ctg aca aca ttt gcg act gag agc gat gta att atc gca aac aga gtt 1165  
 Leu Thr Thr Phe Ala Thr Glu Ser Asp Val Ile Ile Ala Asn Arg Val  
 355 360 365

ccc gtt gaa cat cgc att ctc ttt ggt aaa aaa tta atc aca cgt gat 1213  
 Pro Val Glu His Arg Ile Leu Phe Gly Lys Lys Leu Ile Thr Arg Asp  
 370 375 380

gta tat ggc gat aac taaaatgttt tcaatatgat gttgttaatg at 1260  
 Val Tyr Gly Asp Asn  
 385

<210> 5  
 <211> 389  
 <212> PRT  
 <213> *Paramecium bursaria Chlorella virus 1*  
 <400> 5

Met Ser Arg Ile Ala Val Val Gly Cys Gly Tyr Val Gly Thr Ala Cys  
 1 5 10 15

Ala Val Leu Leu Ala Gln Lys Asn Glu Val Ile Val Leu Asp Ile Ser  
 20 25 30

Glu Asp Arg Val Gln Leu Ile Lys Asn Lys Lys Ser Pro Ile Glu Asp  
 35 40 45

Lys Glu Ile Glu Glu Phe Leu Glu Thr Lys Asp Leu Asn Leu Thr Ala  
 50 55 60

5

10

ES 2 536 916 T3

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

Phe Glu Pro Thr Val Glu Gln Phe Glu Asn Phe Glu Val Asp Asn Asn  
 340 345 350

Leu Thr Thr Phe Ala Thr Glu Ser Asp Val Ile Ile Ala Asn Arg Val  
 355 360 365

Pro Val Glu His Arg Ile Leu Phe Gly Lys Lys Leu Ile Thr Arg Asp  
 370 375 380

Val Tyr Gly Asp Asn  
 385

5 <210> 6  
 <211>1170  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia sintética que codifica una proteína *Paramecium bursaria chlorella* virus que tiene la actividad de una UDP-Glc-DH

<400> 6

```

atgtctcgca tagctgttgt aggatgtggc tatgtgggaa ctgcatgtgc ggttctactt      60
gctcaaaaga acgaagttat tgtgcttgat attagtgaag accgtgttca acttattaag      120
aacaagaagt ctctattga ggataaggaa atcgaagagt tcttgaaac aaaggatctt      180
aatcttactg cgactacaga taaggttctt gcctacgaga acgctgagtt tgtgataatc      240
gctacaccaa ccgattacga cgttgtgact cgatatttca ataccaaatc cgtggaaaac      300
gttataggag atgttatcaa gaacactcaa acccacccta ctatcgtcac caagtcacaca      360
attcccatcg gtttcgttga taaggtcaga gaggcagttg attatcaaaa cattatcttc      420
tcacctgagt tcttaaggga gggctcgtct ctctacgata atttgtatcc gtcccgtatt      480
atcgttggcg acgattctcc tatcgtctc aagttcgc aaatcttagt tgagggtagt      540
aagaccctt tggctcctgt tttgacaatg ggaaccagag aagcagaagc tgtcaagcta      600
ttctctaata cctaccttgc catgagggta gcatacttta acgaacttga tacatttgct      660
atgtcgcacg gtatgaatgc caaggagatt atagatggtg tcaactttaga gcccaggatc      720
ggtcaaggat attctaacc atcattcggc tatggagctt actgctttcc taaggacact      780
aagcagttgc tggcaaactt cgagggagtt cctcaagaca tcataggcgc tattgtggag      840
tcaaacgaaa caaggaaaga ggtgatagtt agtgaggtag agaatcgttt cccaacgaca      900
gtcgggtgtt acaaactggc agctaaagct ggtagcgata acttcaggtc aagtgtctatt      960
gtcgacatca tggaaacgct ggctaacaaa ggttaccaca ttaagatctt tgagccaact     1020
gtagagcagc tcgaaaattt cgaagttgac aataacttga caacgtttgc tactgagtc     1080
gacgttatta tcgcaaactc tgtccctgtg gaacatagaa tcctatttgg aaagaagctc     1140
attaccagag atgtttacgg tgataattaa                                     1170
    
```

15 <210> 7  
 <211> 2298  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

ES 2 536 916 T3

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (150)..(2192)

5 <220>  
 <221> mutación  
 <222> (1060)..(1060)  
 <223> Secuencia insertada en el plásmido IC 370-256 que contiene un cambio de la base G a A en la posición 1060

10 <220>  
 <221> alelo  
 <222> (1190)..(1190)  
 <223> Secuencia insertada en el plásmido IC 365-256 que contiene un cambio de la base T a C en la posición 1190

15 <220>  
 <221> mutación  
 <222> (1245)..(1245)  
 <223> Secuencia insertada en el plásmido IC 365-256 que contiene un cambio de la base T a C en la posición 1245

20 <220>  
 <221> alelo  
 <222> (2027)..(2027)  
 <223> Secuencia insertada en el plásmido IC 365-256 que contiene un cambio de la base G a A en la posición 2027

25 <300>  
 <308> BC050762.1  
 <309> 08-03-2005  
 <313> (150)..(2195)

30 <400> 7

35

```

gagagcgaag cgagcgctga gtcggactgt cgggtctgag ctgtcgcatt ccagagtcct      60
ctcattgccca ccaccccggc ccgagctcac cctcgcttct gaagctctcc gcgcgcccga      120
cagctcagccc ctcgcccgtg accaacatc atg tgc ggt ata ttt gct tat tta      173
                               Met Cys Gly Ile Phe Ala Tyr Leu
                               1                               5

aat tac cat gtt cct cga aca aga cga gaa atc ttg gag aca cta atc      221
Asn Tyr His Val Pro Arg Thr Arg Arg Glu Ile Leu Glu Thr Leu Ile
 10                               15                               20

aaa ggc ctt cag aga ctg gaa tac aga gga tat gat tct gct ggt gtg      269
Lys Gly Leu Gln Arg Leu Glu Tyr Arg Gly Tyr Asp Ser Ala Gly Val
 25                               30                               35

gga ctt gac gga ggc aat gac aaa gac tgg gaa gcc aac gcc tgc aaa      317
Gly Leu Asp Gly Gly Asn Asp Lys Asp Trp Glu Ala Asn Ala Cys Lys
                               45                               50                               55

atc cag ctc att aag aag aaa gga aaa gtt aag gca ctg gat gaa gaa      365
Ile Gln Leu Ile Lys Lys Lys Gly Lys Val Lys Ala Leu Asp Glu Glu
                               60                               65                               70

gtt cac aaa caa caa gat atg gac ttg gat ata gaa ttt gat gtg cat      413
Val His Lys Gln Gln Asp Met Asp Leu Asp Ile Glu Phe Asp Val His
 75                               80                               85

ctt gga ata gct cat acc cgt tgg gcg aca cat gga gaa ccc aat cct      461

```

ES 2 536 916 T3

Leu	Gly	Ile	Ala	His	Thr	Arg	Trp	Ala	Thr	His	Gly	Glu	Pro	Asn	Pro		
90						95					100						
gtc	aat	agt	cac	ccc	cag	cgc	tct	gat	aaa	aat	aat	gaa	ttc	att	gtt		509
Val	Asn	Ser	His	Pro	Gln	Arg	Ser	Asp	Lys	Asn	Asn	Glu	Phe	Ile	Val		120
105					110					115							
att	cat	aat	gga	atc	atc	acc	aac	tac	aaa	gac	ttg	aaa	aag	ttt	ctg		557
Ile	His	Asn	Gly	Ile	Ile	Thr	Asn	Tyr	Lys	Asp	Leu	Lys	Lys	Phe	Leu		135
			125						130								
gaa	agc	aaa	ggc	tat	gac	ttt	gaa	tct	gaa	aca	gac	aca	gaa	acc	att		605
Glu	Ser	Lys	Gly	Tyr	Asp	Phe	Glu	Ser	Glu	Thr	Asp	Thr	Glu	Thr	Ile		150
			140					145					150				
gcc	aag	ctc	gtc	aag	tac	atg	tat	gac	aac	tgg	gag	agc	cag	gac	gtc		653
Ala	Lys	Leu	Val	Lys	Tyr	Met	Tyr	Asp	Asn	Trp	Glu	Ser	Gln	Asp	Val		165
		155					160					165					
agt	ttt	acc	acc	ttg	gtg	gag	aga	gtt	atc	caa	caa	ttg	gaa	ggc	gcc		701
Ser	Phe	Thr	Thr	Leu	Val	Glu	Arg	Val	Ile	Gln	Gln	Leu	Glu	Gly	Ala		180
	170					175					180						
ttt	gct	ctt	gtg	ttt	aaa	agt	gtc	cat	ttt	ccc	ggg	caa	gca	gtt	ggc		749
Phe	Ala	Leu	Val	Phe	Lys	Ser	Val	His	Phe	Pro	Gly	Gln	Ala	Val	Gly		200
	185				190					195							
aca	agg	cga	ggt	agc	cct	ctc	ttg	att	ggg	gtg	cgg	agt	gaa	cat	aag		797
Thr	Arg	Arg	Gly	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Val	Arg	Ser	Glu	His	Lys		215
				205					210					215			
ctt	tct	aca	gat	cac	att	ccg	att	ctg	tac	aga	aca	ggc	aaa	gac	aag		845
Leu	Ser	Thr	Asp	His	Ile	Pro	Ile	Leu	Tyr	Arg	Thr	Gly	Lys	Asp	Lys		230
			220					225					230				
aaa	gga	agc	tgc	ggt	ctt	tcc	cgt	gtg	gac	agc	acg	aca	tgc	ctg	ttc		893
Lys	Gly	Ser	Cys	Gly	Leu	Ser	Arg	Val	Asp	Ser	Thr	Thr	Cys	Leu	Phe		245
		235					240					245					
cct	gtt	gag	gaa	aag	gca	gtt	gaa	tat	tac	ttt	gct	tct	gat	gca	agt		941
Pro	Val	Glu	Glu	Lys	Ala	Val	Glu	Tyr	Tyr	Phe	Ala	Ser	Asp	Ala	Ser		260
	250					255					260						
gcc	gtg	ata	gag	cac	acc	aat	cgt	gtc	atc	ttt	ctg	gaa	gat	gat	gat		989
Ala	Val	Ile	Glu	His	Thr	Asn	Arg	Val	Ile	Phe	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp		280
	265				270					275							
gtt	gca	gca	gtg	gtg	gat	ggc	cgt	ctc	tct	atc	cac	cga	att	aaa	cga		1037
Val	Ala	Ala	Val	Val	Asp	Gly	Arg	Leu	Ser	Ile	His	Arg	Ile	Lys	Arg		295
			285						290					295			
act	gca	gga	gac	cat	cct	ggc	cga	gct	gtg	caa	act	ctc	cag	atg	gag		1085
Thr	Ala	Gly	Asp	His	Pro	Gly	Arg	Ala	Val	Gln	Thr	Leu	Gln	Met	Glu		310
			300					305					310				
ctc	cag	cag	atc	atg	aag	ggc	aac	ttt	agt	tca	ttt	atg	cag	aag	gaa		1133
Leu	Gln	Gln	Ile	Met	Lys	Gly	Asn	Phe	Ser	Ser	Phe	Met	Gln	Lys	Glu		325
		315				320						325					
att	ttt	gag	cag	cca	gaa	tct	gtt	gtg	aac	aca	atg	aga	gga	aga	gtc		1181
Ile	Phe	Glu	Gln	Pro	Glu	Ser	Val	Val	Asn	Thr	Met	Arg	Gly	Arg	Val		340
	330					335					340						
aat	ttt	gat	gac	tac	act	gtg	aat	ttg	gga	ggg	ttg	aaa	gat	cac	att		1229
Asn	Phe	Asp	Asp	Tyr	Thr	Val	Asn	Leu	Gly	Gly	Leu	Lys	Asp	His	Ile		360
	345				350					355					360		
aag	gag	atc	cag	cgg	tgt	cgg	cgg	ttg	att	ctt	att	gct	tgt	ggc	aca		1277

ES 2 536 916 T3

Lys	Glu	Ile	Gln	Arg 365	Cys	Arg	Arg	Leu	Ile 370	Leu	Ile	Ala	Cys	Gly 375	Thr		
agt	tac	cac	gct	ggt	gtg	gca	acc	cgt	cag	gtc	ctg	gag	gag	ctg	acc	1325	
Ser	Tyr	His	Ala 380	Gly	Val	Ala	Thr	Arg 385	Gln	Val	Leu	Glu	Glu 390	Leu	Thr		
gag	ctg	ccc	gtg	atg	gtg	gag	ctt	gcc	agt	gac	ttc	ttg	gat	aga	aac	1373	
Glu	Leu	Pro 395	Val	Met	Val	Glu	Leu 400	Ala	Ser	Asp	Phe	Leu 405	Asp	Arg	Asn		
act	cca	gtc	ttt	cga	gat	gat	ggt	tgc	ttt	ttc	att	agt	caa	tca	ggc	1421	
Thr	Pro 410	Val	Phe	Arg	Asp	Asp 415	Val	Cys	Phe	Phe	Ile 420	Ser	Gln	Ser	Gly		
gag	aca	gct	gac	acc	ctg	atg	gga	ctt	cgt	tac	tgt	aag	gag	aga	gga	1469	
Glu	Thr	Ala	Asp	Thr	Leu 430	Met	Gly	Leu	Arg	Tyr 435	Cys	Lys	Glu	Arg	Gly 440		
gcc	tta	act	gtg	ggg	atc	aca	aat	aca	gtc	ggc	agt	tct	ata	tca	agg	1517	
Ala	Leu	Thr	Val	Gly 445	Ile	Thr	Asn	Thr	Val 450	Gly	Ser	Ser	Ile	Ser	Arg		
gag	aca	gat	tgc	ggg	gtt	cat	att	aat	gct	ggt	cct	gag	att	ggc	gtg	1565	
Glu	Thr	Asp	Cys 460	Gly	Val	His	Ile	Asn 465	Ala	Gly	Pro	Glu	Ile 470	Gly	Val		
gcc	agt	aca	aag	gca	tac	acc	agc	cag	ttt	gtg	tcc	ctc	gtg	atg	ttt	1613	
Ala	Ser	Thr 475	Lys	Ala	Tyr	Thr	Ser 480	Gln	Phe	Val	Ser	Leu 485	Val	Met	Phe		
gct	ctc	atg	atg	tgt	gat	gac	agg	atc	tcc	atg	caa	gag	aga	cgc	aaa	1661	
Ala	Leu 490	Met	Met	Cys	Asp	Asp 495	Arg	Ile	Ser	Met	Gln 500	Glu	Arg	Arg	Lys		
gag	atc	atg	ctc	gga	ctg	aag	cga	ctg	ccg	gac	ttg	att	aag	gaa	gtg	1709	
Glu	Ile 505	Met	Leu	Gly	Leu 510	Lys	Arg	Leu	Pro	Asp 515	Leu	Ile	Lys	Glu	Val 520		
ctg	agc	atg	gat	gat	gaa	atc	cag	aag	ctg	gcc	acg	gag	ctt	tac	cac	1757	
Leu	Ser	Met	Asp	Asp 525	Glu	Ile	Gln	Lys	Leu 530	Ala	Thr	Glu	Leu	Tyr 535	His		
cag	aag	tcg	gtc	ctg	ata	atg	ggg	cgg	ggc	tac	cat	tat	gct	aca	tgc	1805	
Gln	Lys	Ser 540	Val	Leu	Ile	Met	Gly 545	Arg	Gly	Tyr	His	Tyr	Ala 550	Thr	Cys		
ctt	gaa	ggg	gct	ctg	aaa	atc	aag	gag	att	act	tat	atg	cat	tcg	gaa	1853	
Leu	Glu	Gly 555	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys 560	Glu	Ile	Thr	Tyr	Met 565	His	Ser	Glu		
ggc	atc	ctt	gct	ggt	gag	ctc	aag	cac	ggc	cct	ctg	gcc	ttg	gtg	gac	1901	
Gly	Ile 570	Leu	Ala	Gly	Glu	Leu 575	Lys	His	Gly	Pro	Leu 580	Ala	Leu	Val	Asp		
aag	ttg	atg	cct	gtc	atc	atg	atc	atc	atg	cga	gac	cac	act	tat	gcc	1949	
Lys	Leu 585	Met	Pro	Val	Ile 590	Met	Ile	Ile	Met	Arg 595	Asp	His	Thr	Tyr	Ala 600		
aag	tgc	cag	aac	gct	ctt	cag	cag	gtg	ggt	gca	cgg	cag	ggg	cgt	cca	1997	
Lys	Cys	Gln	Asn 605	Ala	Leu	Gln	Gln	Val 610	Val	Ala	Arg	Gln	Gly 615	Arg	Pro		
gtc	gtg	atc	tgt	gat	aag	gag	gat	act	gag	acc	att	aag	aat	aca	aaa	2045	
Val	Val	Ile	Cys 620	Asp	Lys	Glu	Asp	Thr 625	Glu	Thr	Ile	Lys	Asn 630	Thr	Lys		
agg	aca	atc	aag	gtg	ccc	cac	tca	gtg	gac	tgc	ttg	cag	ggc	att	ctc	2093	

ES 2 536 916 T3

```

Arg Thr Ile Lys Val Pro His Ser Val Asp Cys Leu Gln Gly Ile Leu
      635                               640                               645
agt gtg att ccc ctg cag ctg ctg gct ttc cac ctg gct gtg ctg aga      2141
Ser Val Ile Pro Leu Gln Leu Leu Ala Phe His Leu Ala Val Leu Arg
      650                               655                               660

ggc tac gat gtt gat ttt cca cgg aat ctt gcc aaa tct gta aca gta      2189
Gly Tyr Asp Val Asp Phe Pro Arg Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val
      665                               670                               675                               680

gag taacagacac ctgaaactta agacagttaa gcaacacgag ataccttttg      2242
Glu

tatttaaatt ttgatttaa actatcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa      2298

```

5  
<210> 8  
<211> 681  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*  
<400> 8

```

Met Cys Gly Ile Phe Ala Tyr Leu Asn Tyr His Val Pro Arg Thr Arg
 1      5      10      15

Arg Glu Ile Leu Glu Thr Leu Ile Lys Gly Leu Gln Arg Leu Glu Tyr
      20      25      30

Arg Gly Tyr Asp Ser Ala Gly Val Gly Leu Asp Gly Gly Asn Asp Lys
      35      40      45

Asp Trp Glu Ala Asn Ala Cys Lys Ile Gln Leu Ile Lys Lys Lys Gly
 50      55

Lys Val Lys Ala Leu Asp Glu Glu Val His Lys Gln Gln Asp Met Asp
 65      70      75      80

Leu Asp Ile Glu Phe Asp Val His Leu Gly Ile Ala His Thr Arg Trp
      85      90      95

Ala Thr His Gly Glu Pro Asn Pro Val Asn Ser His Pro Gln Arg Ser
      100      105      110

Asp Lys Asn Asn Glu Phe Ile Val Ile His Asn Gly Ile Ile Thr Asn
      115      120      125

Tyr Lys Asp Leu Lys Lys Phe Leu Glu Ser Lys Gly Tyr Asp Phe Glu
      130      135      140

Ser Glu Thr Asp Thr Glu Thr Ile Ala Lys Leu Val Lys Tyr Met Tyr
      145      150      155      160

Asp Asn Trp Glu Ser Gln Asp Val Ser Phe Thr Thr Leu Val Glu Arg
      165      170      175

```

10

ES 2 536 916 T3

Val Ile Gln Gln Leu Glu Gly Ala Phe Ala Leu Val Phe Lys Ser Val  
 180 185 190  
 His Phe Pro Gly Gln Ala Val Gly Thr Arg Arg Gly Ser Pro Leu Leu  
 195 200 205  
 Ile Gly Val Arg Ser Glu His Lys Leu Ser Thr Asp His Ile Pro Ile  
 210 215 220  
 Leu Tyr Arg Thr Gly Lys Asp Lys Lys Gly Ser Cys Gly Leu Ser Arg  
 225 230 235 240  
 Val Asp Ser Thr Thr Cys Leu Phe Pro Val Glu Glu Lys Ala Val Glu  
 245 250 255  
 Tyr Tyr Phe Ala Ser Asp Ala Ser Ala Val Ile Glu His Thr Asn Arg  
 260 265 270  
 Val Ile Phe Leu Glu Asp Asp Asp Val Ala Ala Val Val Asp Gly Arg  
 275 280 285  
 Leu Ser Ile His Arg Ile Lys Arg Thr Ala Gly Asp His Pro Gly Arg  
 290 295 300  
 Ala Val Gln Thr Leu Gln Met Glu Leu Gln Gln Ile Met Lys Gly Asn  
 305 310 315 320  
 Phe Ser Ser Phe Met Gln Lys Glu Ile Phe Glu Gln Pro Glu Ser Val  
 325 330 335  
 Val Asn Thr Met Arg Gly Arg Val Asn Phe Asp Asp Tyr Thr Val Asn  
 340 345 350  
 Leu Gly Gly Leu Lys Asp His Ile Lys Glu Ile Gln Arg Cys Arg Arg  
 355 360 365  
 Leu Ile Leu Ile Ala Cys Gly Thr Ser Tyr His Ala Gly Val Ala Thr  
 370 375 380  
 Arg Gln Val Leu Glu Glu Leu Thr Glu Leu Pro Val Met Val Glu Leu  
 385 390 395 400  
 Ala Ser Asp Phe Leu Asp Arg Asn Thr Pro Val Phe Arg Asp Asp Val  
 405 410 415  
 Cys Phe Phe Ile Ser Gln Ser Gly Glu Thr Ala Asp Thr Leu Met Gly  
 420 425 430  
 Leu Arg Tyr Cys Lys Glu Arg Gly Ala Leu Thr Val Gly Ile Thr Asn  
 435 440 445

ES 2 536 916 T3

Thr Val Gly Ser Ser Ile Ser Arg Glu Thr Asp Cys Gly Val His Ile  
 450 455 460  
 Asn Ala Gly Pro Glu Ile Gly Val Ala Ser Thr Lys Ala Tyr Thr Ser  
 465 470 475 480  
 Gln Phe Val Ser Leu Val Met Phe Ala Leu Met Met Cys Asp Asp Arg  
 485 490 495  
 Ile Ser Met Gln Glu Arg Arg Lys Glu Ile Met Leu Gly Leu Lys Arg  
 500 505 510  
 Leu Pro Asp Leu Ile Lys Glu Val Leu Ser Met Asp Asp Glu Ile Gln  
 515 520 525  
 Lys Leu Ala Thr Glu Leu Tyr His Gln Lys Ser Val Leu Ile Met Gly  
 530 535 540  
 Arg Gly Tyr His Tyr Ala Thr Cys Leu Glu Gly Ala Leu Lys Ile Lys  
 545 550 555 560  
 Glu Ile Thr Tyr Met His Ser Glu Gly Ile Leu Ala Gly Glu Leu Lys  
 565 570 575  
 His Gly Pro Leu Ala Leu Val Asp Lys Leu Met Pro Val Ile Met Ile  
 580 585 590  
 Ile Met Arg Asp His Thr Tyr Ala Lys Cys Gln Asn Ala Leu Gln Gln  
 595 600 605  
 Val Val Ala Arg Gln Gly Arg Pro Val Val Ile Cys Asp Lys Glu Asp  
 610 615 620  
 Thr Glu Thr Ile Lys Asn Thr Lys Arg Thr Ile Lys Val Pro His Ser  
 625 630 635 640  
 Val Asp Cys Leu Gln Gly Ile Leu Ser Val Ile Pro Leu Gln Leu Leu  
 645 650 655  
 Ala Phe His Leu Ala Val Leu Arg Gly Tyr Asp Val Asp Phe Pro Arg  
 660 665 670  
 Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val Glu  
 675 680

<210> 9  
 <211> 2049  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

5

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2046)

10

ES 2 536 916 T3

<300>  
 <308> BC031928.1  
 <309> 07-10-2003  
 <313> (51)..(299)

5

<400> 9

atg tgc gga atc ttt gcc tac atg aat tac aga gtt ccc aag aca agg	48
Met Cys Gly Ile Phe Ala Tyr Met Asn Tyr Arg Val Pro Lys Thr Arg	
1 5 10 15	
aaa gag att ttc gaa acc ctt atc agg ggt ctg cag cgg ctg gag tac	96
Lys Glu Ile Phe Glu Thr Leu Ile Arg Gly Leu Gln Arg Leu Glu Tyr	
20 25 30	
cgg ggc tat gac tct gcg ggg gtt gcc att gat ggg aat aac cac gaa	144
Arg Gly Tyr Asp Ser Ala Gly Val Ala Ile Asp Gly Asn Asn His Glu	
35 40 45	
gtc aaa gaa aga cac atc cat ctt gtg aag aaa agg ggg aaa gta aag	192
Val Lys Glu Arg His Ile His Leu Val Lys Lys Arg Gly Lys Val Lys	
50 55 60	
gct ctg gat gaa gaa ctt tac aag caa gat agc atg gac ttg aag gtg	240
Ala Leu Asp Glu Glu Leu Tyr Lys Gln Asp Ser Met Asp Leu Lys Val	
65 70 75 80	
gag ttt gag aca cac ttc ggc att gcc cac aca cgt tgg gcc acc cac	288
Glu Phe Glu Thr His Phe Gly Ile Ala His Thr Arg Trp Ala Thr His	
85 90 95	
ggg gtt ccc aat gct gtc aac agt cac ccc cag cgt tcg gac aaa gac	336
Gly Val Pro Asn Ala Val Asn Ser His Pro Gln Arg Ser Asp Lys Asp	
100 105 110	
aat gaa ttt gtt gtc atc cac aac ggg atc atc act aat tac aag gat	384
Asn Glu Phe Val Val Ile His Asn Gly Ile Ile Thr Asn Tyr Lys Asp	
115 120 125	
cta agg aag ttt ctg gaa agc aaa ggc tac gag ttt gag tca gaa aca	432
Leu Arg Lys Phe Leu Glu Ser Lys Gly Tyr Glu Phe Glu Ser Glu Thr	
130 135 140	
gac acg gag acc atc gcc aag ctg att aaa tat gta ttt gac aac aga	480
Asp Thr Glu Thr Ile Ala Lys Leu Ile Lys Tyr Val Phe Asp Asn Arg	
145 150 155 160	
gag act gag gac ata acg ttt tcc aca ttg gtc gaa aga gtc att cag	528
Glu Thr Glu Asp Ile Thr Phe Ser Thr Leu Val Glu Arg Val Ile Gln	
165 170 175	
cag ttg gaa ggc gcc ttt gca ctg gtt ttc aag agt att cac tac ccg	576
Gln Leu Glu Gly Ala Phe Ala Leu Val Phe Lys Ser Ile His Tyr Pro	
180 185 190	
gga gaa gct gtc gcc acg agg aga ggc agc ccc ttg ctc atc ggg gta	624
Gly Glu Ala Val Ala Thr Arg Arg Gly Ser Pro Leu Leu Ile Gly Val	
195 200 205	
cga agc aaa tac aaa ctc tcc aca gag cag atc ccc gtc tta tat ccg	672
Arg Ser Lys Tyr Lys Leu Ser Thr Glu Gln Ile Pro Val Leu Tyr Pro	
210 215 220	
aca tgc aat atc gag aat gtg aag aat atc tgc aag act agg atg aag	720
Thr Cys Asn Ile Glu Asn Val Lys Asn Ile Cys Lys Thr Arg Met Lys	
225 230 235 240	

ES 2 536 916 T3

aga	ctg	gac	agc	tcc	acc	tgc	ctg	cac	gct	gtg	ggc	gat	aaa	gct	gtg	768
Arg	Leu	Asp	Ser	Ser	Thr	Cys	Leu	His	Ala	Val	Gly	Asp	Lys	Ala	Val	
				245					250					255		
gaa	ttc	ttc	ttt	gct	tct	gat	gca	agt	gcc	atc	ata	gaa	cac	acc	aac	816
Glu	Phe	Phe	Phe	Ala	Ser	Asp	Ala	Ser	Ala	Ile	Ile	Glu	His	Thr	Asn	
			260					265					270			
cgg	gtc	atc	ttc	tta	gaa	gat	gat	gat	atc	gct	gca	gtg	gct	gat	ggg	864
Arg	Val	Ile	Phe	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Ile	Ala	Ala	Val	Ala	Asp	Gly	
		275					280					285				
aaa	ctc	tcc	att	cac	cga	gtc	aag	cgc	tca	gct	act	gat	gac	ccc	tcc	912
Lys	Leu	Ser	Ile	His	Arg	Val	Lys	Arg	Ser	Ala	Thr	Asp	Asp	Pro	Ser	
	290					295					300					
cga	gcc	atc	cag	acc	ttg	cag	atg	gaa	ctg	cag	caa	ata	atg	aaa	ggt	960
Arg	Ala	Ile	Gln	Thr	Leu	Gln	Met	Glu	Leu	Gln	Gln	Ile	Met	Lys	Gly	
	305				310					315					320	
aac	ttc	agc	gca	ttt	atg	cag	aag	gag	atc	ttc	gag	cag	cca	gaa	tca	1008
Asn	Phe	Ser	Ala	Phe	Met	Gln	Lys	Glu	Ile	Phe	Glu	Gln	Pro	Glu	Ser	
				325					330					335		
gtt	ttt	aat	acc	atg	aga	ggt	cgg	gtg	aat	ttt	gag	acc	aac	aca	gtg	1056
Val	Phe	Asn	Thr	Met	Arg	Gly	Arg	Val	Asn	Phe	Glu	Thr	Asn	Thr	Val	
			340					345					350			
ctc	ctg	ggt	ggc	ttg	aag	gac	cat	ttg	aaa	gag	atc	cga	cga	tgc	cga	1104
Leu	Leu	Gly	Gly	Leu	Lys	Asp	His	Leu	Lys	Glu	Ile	Arg	Arg	Cys	Arg	
		355					360					365				
agg	ctc	att	gtg	att	ggc	tgt	gga	acc	agc	tac	cat	gcc	gct	gtg	gct	1152
Arg	Leu	Ile	Val	Ile	Gly	Cys	Gly	Thr	Ser	Tyr	His	Ala	Ala	Val	Ala	
	370					375					380					
aca	cgg	caa	gtc	tta	gag	gaa	ctg	acc	gag	ctg	cct	gtg	atg	gtt	gaa	1200
Thr	Arg	Gln	Val	Leu	Glu	Glu	Leu	Thr	Glu	Leu	Pro	Val	Met	Val	Glu	
	385				390					395				400		
ctt	gcc	agt	gac	ttt	ctg	gac	agg	aac	aca	cct	gtg	ttc	agg	gat	gac	1248
Leu	Ala	Ser	Asp	Phe	Leu	Asp	Arg	Asn	Thr	Pro	Val	Phe	Arg	Asp	Asp	
			405					410						415		
gtt	tgc	ttt	ttc	ata	agc	caa	tca	ggt	gag	act	gca	gac	acg	ctc	ctg	1296
Val	Cys	Phe	Phe	Ile	Ser	Gln	Ser	Gly	Glu	Thr	Ala	Asp	Thr	Leu	Leu	
			420					425					430			
gcg	ctg	cga	tac	tgt	aag	gat	cga	ggt	gcg	ctg	acc	gtg	ggc	atc	acc	1344
Ala	Leu	Arg	Tyr	Cys	Lys	Asp	Arg	Gly	Ala	Leu	Thr	Val	Gly	Ile	Thr	
		435				440						445				
aac	acc	gtg	ggt	agc	tcc	atc	tcc	cgg	gag	act	gac	tgt	ggc	gtc	cac	1392
Asn	Thr	Val	Gly	Ser	Ser	Ile	Ser	Arg	Glu	Thr	Asp	Cys	Gly	Val	His	
		450				455					460					
atc	aac	gca	ggg	ccc	gag	att	ggg	gtg	gcc	agc	acc	aag	gcg	tac	acc	1440
Ile	Asn	Ala	Gly	Pro	Glu	Ile	Gly	Val	Ala	Ser	Thr	Lys	Ala	Tyr	Thr	
					470				475						480	
agc	cag	ttc	atc	tct	ctg	gtg	atg	ttt	ggt	ttg	atg	atg	tct	gaa	gat	1488
Ser	Gln	Phe	Ile	Ser	Leu	Val	Met	Phe	Gly	Leu	Met	Met	Ser	Glu	Asp	
				485				490						495		
cga	att	tct	cta	cag	aac	agg	aga	caa	gag	atc	atc	cgt	ggc	ctc	aga	1536
Arg	Ile	Ser	Leu	Gln	Asn	Arg	Arg	Gln	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Leu	Arg	
			500					505					510			

tct tta ccg gag ctg atc aaa gaa gtg ctg tcc ctg gat gag aag atc 1584  
 Ser Leu Pro Glu Leu Ile Lys Glu Val Leu Ser Leu Asp Glu Lys Ile  
 515 520 525

cat gac ttg gcc ctg gag ctc tac aca caa agg tct ctc ctc gtg atg 1632  
 His Asp Leu Ala Leu Glu Leu Tyr Thr Gln Arg Ser Leu Leu Val Met  
 530 535 540

gga cgg gga tat aac tat gcc aca tgt ctg gaa ggt gcc ttg aaa att 1680  
 Gly Arg Gly Tyr Asn Tyr Ala Thr Cys Leu Glu Gly Ala Leu Lys Ile  
 545 550 555 560

aag gag ata acc tac atg cat tca gaa ggt atc cta gcc gga gag ctg 1728  
 Lys Glu Ile Thr Tyr Met His Ser Glu Gly Ile Leu Ala Gly Glu Leu  
 565 570 575

aag cac ggg ccc ctt gct ctc gtc gac aag cag atg cca gtc atc atg 1776  
 Lys His Gly Pro Leu Ala Leu Val Asp Lys Gln Met Pro Val Ile Met  
 580 585 590

gtc atc atg aag gat cct tgc ttt gcc aag tgc cag aat gcc ctg cag 1824  
 Val Ile Met Lys Asp Pro Cys Phe Ala Lys Cys Gln Asn Ala Leu Gln  
 595 600 605

cag gtc act gcc cgc cag ggt cgc cca atc ata ctg tgt tcc aag gat 1872  
 Gln Val Thr Ala Arg Gln Gly Arg Pro Ile Ile Leu Cys Ser Lys Asp  
 610 615 620

gac acc gag agc tcc aag ttt gca tat aaa acc att gaa ctt ccc cac 1920  
 Asp Thr Glu Ser Ser Lys Phe Ala Tyr Lys Thr Ile Glu Leu Pro His  
 625 630 635 640

aca gtg gac tgt ctc cag ggt atc ctg agc gtg att cca ctc cag ctt 1968  
 Thr Val Asp Cys Leu Gln Gly Ile Leu Ser Val Ile Pro Leu Gln Leu  
 645 650 655

ctg tcc ttc cac ctg gct gtc ctc cga ggt tat gat gtt gac ttc ccc 2016  
 Leu Ser Phe His Leu Ala Val Leu Arg Gly Tyr Asp Val Asp Phe Pro  
 660 665 670

aga aac cta gcc aag tct gtc act gtg gaa tga 2049  
 Arg Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val Glu  
 675 680

<210> 10  
 <211> 682  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 10

Met Cys Gly Ile Phe Ala Tyr Met Asn Tyr Arg Val Pro Lys Thr Arg  
 1 5 10 15

Lys Glu Ile Phe Glu Thr Leu Ile Arg Gly Leu Gln Arg Leu Glu Tyr  
 20 25 30

Arg Gly Tyr Asp Ser Ala Gly Val Ala Ile Asp Gly Asn Asn His Glu  
 35 40 45

Val Lys Glu Arg His Ile His Leu Val Lys Lys Arg Gly Lys Val Lys  
 50 55 60

10

ES 2 536 916 T3

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

ES 2 536 916 T3

Val Phe Asn Thr Met Arg Gly Arg Val Asn Phe Glu Thr Asn Thr Val  
 340 345 350  
 Leu Leu Gly Gly Leu Lys Asp His Leu Lys Glu Ile Arg Arg Cys Arg  
 355 360 365  
 Arg Leu Ile Val Ile Gly Cys Gly Thr Ser Tyr His Ala Ala Val Ala  
 370 375 380  
 Thr Arg Gln Val Leu Glu Glu Leu Thr Glu Leu Pro Val Met Val Glu  
 385 390 395 400  
 Leu Ala Ser Asp Phe Leu Asp Arg Asn Thr Pro Val Phe Arg Asp Asp  
 405 410 415  
 Val Cys Phe Phe Ile Ser Gln Ser Gly Glu Thr Ala Asp Thr Leu Leu  
 420 425 430  
 Ala Leu Arg Tyr Cys Lys Asp Arg Gly Ala Leu Thr Val Gly Ile Thr  
 435 440 445  
 Asn Thr Val Gly Ser Ser Ile Ser Arg Glu Thr Asp Cys Gly Val His  
 450 455 460  
 Ile Asn Ala Gly Pro Glu Ile Gly Val Ala Ser Thr Lys Ala Tyr Thr  
 465 470 475 480  
 Ser Gln Phe Ile Ser Leu Val Met Phe Gly Leu Met Met Ser Glu Asp  
 485 490 495  
 Arg Ile Ser Leu Gln Asn Arg Arg Gln Glu Ile Ile Arg Gly Leu Arg  
 500 505 510  
 Ser Leu Pro Glu Leu Ile Lys Glu Val Leu Ser Leu Asp Glu Lys Ile  
 515 520 525  
 His Asp Leu Ala Leu Glu Leu Tyr Thr Gln Arg Ser Leu Leu Val Met  
 530 535 540  
 Gly Arg Gly Tyr Asn Tyr Ala Thr Cys Leu Glu Gly Ala Leu Lys Ile  
 545 550 555 560  
 Lys Glu Ile Thr Tyr Met His Ser Glu Gly Ile Leu Ala Gly Glu Leu  
 565 570 575  
 Lys His Gly Pro Leu Ala Leu Val Asp Lys Gln Met Pro Val Ile Met  
 580 585 590  
 Val Ile Met Lys Asp Pro Cys Phe Ala Lys Cys Gln Asn Ala Leu Gln  
 595 600 605

ES 2 536 916 T3

Gln Val Thr Ala Arg Gln Gly Arg Pro Ile Ile Leu Cys Ser Lys Asp  
 610 615 620

Asp Thr Glu Ser Ser Lys Phe Ala Tyr Lys Thr Ile Glu Leu Pro His  
 625 630 635 640

Thr Val Asp Cys Leu Gln Gly Ile Leu Ser Val Ile Pro Leu Gln Leu  
 645 650 655

Leu Ser Phe His Leu Ala Val Leu Arg Gly Tyr Asp Val Asp Phe Pro  
 660 665 670

Arg Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val Glu  
 675 680

5 <210> 11  
 <211> 1830  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1827)

15 <300>  
 <308> U00096.2  
 <309> 08-09-2005  
 <313> (3909862)..(3911691)

<400> 11

atg tgt gga att gtt ggc gcg atc gcg caa cgt gat gta gca gaa atc	48
Met Cys Gly Ile Val Gly Ala Ile Ala Gln Arg Asp Val Ala Glu Ile	
1 5 10 15	
ctt ctt gaa ggt tta cgt cgt ctg gaa tac cgc gga tat gac tct gcc	96
Leu Leu Glu Gly Leu Arg Arg Leu Glu Tyr Arg Gly Tyr Asp Ser Ala	
20 25 30	
ggt ctg gcc gtt gtt gat gca gaa ggt cat atg acc cgc ctg cgt cgc	144
Gly Leu Ala Val Val Asp Ala Glu Gly His Met Thr Arg Leu Arg Arg	
35 40 45	
ctc ggt aaa gtc cag atg ctg gca cag gca gcg gaa gaa cat cct ctg	192
Leu Gly Lys Val Gln Met Leu Ala Gln Ala Ala Glu Glu His Pro Leu	
50 55 60	
cat ggc ggc act ggt att gct cac act cgc tgg gcg acc cac ggt gaa	240
His Gly Gly Thr Gly Ile Ala His Thr Arg Trp Ala Thr His Gly Glu	
65 70 75 80	
cct tca gaa gtg aat gcg cat ccg cat gtt tct gaa cac att gtg gtg	288
Pro Ser Glu Val Asn Ala His Pro His Val Ser Glu His Ile Val Val	
85 90 95	
gtg cat aac ggc atc atc gaa aac cat gaa ccg ctg cgt gaa gag cta	336
Val His Asn Gly Ile Ile Glu Asn His Glu Pro Leu Arg Glu Glu Leu	
100 105 110	
aaa gcg cgt ggc tat acc ttc gtt tct gaa acc gac acc gaa gtg att	384
Lys Ala Arg Gly Tyr Thr Phe Val Ser Glu Thr Asp Thr Glu Val Ile	
115 120 125	

ES 2 536 916 T3

gcc cat ctg gtg aac tgg gag ctg aaa caa ggc ggg act ctg cgt gag 432  
 Ala His Leu Val Asn Trp Glu Leu Lys Gln Gly Gly Thr Leu Arg Glu  
 130 135 140

gcc gtt ctg cgt gct atc ccg cag ctg cgt ggt gcg tac ggt aca gtg 480  
 Ala Val Leu Arg Ala Ile Pro Gln Leu Arg Gly Ala Tyr Gly Thr Val  
 145 150 155 160

atc atg gac tcc cgt cac ccg gat acc ctg ctg gcg gca cgt tct ggt 528  
 Ile Met Asp Ser Arg His Pro Asp Thr Leu Leu Ala Ala Arg Ser Gly  
 165 170 175

agt ccg ctg gtg att ggc ctg ggg atg ggc gaa aac ttt atc gct tct 576  
 Ser Pro Leu Val Ile Gly Leu Gly Met Gly Glu Asn Phe Ile Ala Ser  
 180 185 190

gac cag ctg gcg ctg ttg ccg gtg acc cgt cgc ttt atc ttc ctt gaa 624  
 Asp Gln Leu Ala Leu Leu Pro Val Thr Arg Arg Phe Ile Phe Leu Glu  
 195 200 205

gag ggc gat att gcg gaa atc act cgc cgt tcg gta aac atc ttc gat 672  
 Glu Gly Asp Ile Ala Glu Ile Thr Arg Arg Ser Val Asn Ile Phe Asp  
 210 215 220

aaa act ggc gcg gaa gta aaa cgt cag gat atc gaa tcc aat ctg caa 720  
 Lys Thr Gly Ala Glu Val Lys Arg Gln Asp Ile Glu Ser Asn Leu Gln  
 225 230 235 240

tat gac gcg ggc gat aaa ggc att tac cgt cac tac atg cag aaa gag 768  
 Tyr Asp Ala Gly Asp Lys Gly Ile Tyr Arg His Tyr Met Gln Lys Glu  
 245 250 255

atc tac gaa cag ccg aac gcg atc aaa aac acc ctt acc gga cgc atc 816  
 Ile Tyr Glu Gln Pro Asn Ala Ile Lys Asn Thr Leu Thr Gly Arg Ile  
 260 265 270

agc cac ggt cag gtt gat tta agc gag ctg gga ccg aac gcc gac gaa 864  
 Ser His Gly Gln Val Asp Leu Ser Glu Leu Gly Pro Asn Ala Asp Glu  
 275 280 285

ctg ctg tcg aag gtt gag cat att cag atc ctc gcc tgt ggt act tct 912  
 Leu Leu Ser Lys Val Glu His Ile Gln Ile Leu Ala Cys Gly Thr Ser  
 290 295 300

tat aac tcc ggt atg gtt tcc cgc tac tgg ttt gaa tcg cta gca ggt 960  
 Tyr Asn Ser Gly Met Val Ser Arg Tyr Trp Phe Glu Ser Leu Ala Gly  
 305 310 315 320

att ccg tgc gac gtc gaa atc gcc tct gaa ttc cgc tat cgc aaa tct 1008  
 Ile Pro Cys Asp Val Glu Ile Ala Ser Glu Phe Arg Tyr Arg Lys Ser  
 325 330 335

gcc gtg cgt cgt aac agc ctg atg atc acc ttg tca cag tct ggc gaa 1056  
 Ala Val Arg Arg Asn Ser Leu Met Ile Thr Leu Ser Gln Ser Gly Glu  
 340 345 350

acc gcg gat acc ctg gct ggc ctg cgt ctg tcg aaa gag ctg ggt tac 1104  
 Thr Ala Asp Thr Leu Ala Gly Leu Arg Leu Ser Lys Glu Leu Gly Tyr  
 355 360 365

ctt ggt tca ctg gca atc tgt aac gtt ccg ggt tct tct ctg gtg cgc 1152  
 Leu Gly Ser Leu Ala Ile Cys Asn Val Pro Gly Ser Ser Leu Val Arg  
 370 375 380

gaa tcc gat ctg gcg cta atg acc aac gcg ggt aca gaa atc ggc gtg 1200  
 Glu Ser Asp Leu Ala Leu Met Thr Asn Ala Gly Thr Glu Ile Gly Val  
 385 390 395 400

ES 2 536 916 T3

gca tcc act aaa gca ttc acc act cag tta act gtg ctg ttg atg ctg 1248  
 Ala Ser Thr Lys Ala Phe Thr Thr Gln Leu Thr Val Leu Leu Met Leu 405 410 415

gtg gcg aag ctg tct cgc ctg aaa ggt ctg gat gcc tcc att gaa cat 1296  
 Val Ala Lys Leu Ser Arg Leu Lys Gly Leu Asp Ala Ser Ile Glu His 420 425 430

gac atc gtg cat ggt ctg cag gcg ctg ccg agc cgt att gag cag atg 1344  
 Asp Ile Val His Gly Leu Gln Ala Leu Pro Ser Arg Ile Glu Gln Met 435 440 445

ctg tct cag gac aaa cgc att gaa gcg ctg gca gaa gat ttc tct gac 1392  
 Leu Ser Gln Asp Lys Arg Ile Glu Ala Leu Ala Glu Asp Phe Ser Asp 450 455 460

aaa cat cac gcg ctg ttc ctg ggc cgt ggc gat cag tac cca atc gcg 1440  
 Lys His His Ala Leu Phe Leu Gly Arg Gly Asp Gln Tyr Pro Ile Ala 465 470 475 480

ctg gaa ggc gca ttg aag ttg aaa gag atc tct tac att cac gct gaa 1488  
 Leu Glu Gly Ala Leu Lys Leu Lys Glu Ile Ser Tyr Ile His Ala Glu 485 490 495

gcc tac gct gct ggc gaa ctg aaa cac ggt ccg ctg gcg cta att gat 1536  
 Ala Tyr Ala Ala Gly Glu Leu Lys His Gly Pro Leu Ala Leu Ile Asp 500 505 510

gcc gat atg ccg gtt att gtt gtt gca ccg aac aac gaa ttg ctg gaa 1584  
 Ala Asp Met Pro Val Ile Val Val Ala Pro Asn Asn Glu Leu Leu Glu 515 520 525

aaa ctg aaa tcc aac att gaa gaa gtt cgc gcg cgt ggc ggt cag ttg 1632  
 Lys Leu Lys Ser Asn Ile Glu Glu Val Arg Ala Arg Gly Gly Gln Leu 530 535 540

tat gtc ttc gcc gat cag gat gcg ggt ttt gta agt agc gat aac atg 1680  
 Tyr Val Phe Ala Asp Gln Asp Ala Gly Phe Val Ser Ser Asp Asn Met 545 550 555 560

cac atc atc gag atg ccg cat gtg gaa gag gtg att gca ccg atc ttc 1728  
 His Ile Ile Glu Met Pro His Val Glu Glu Val Ile Ala Pro Ile Phe 565 570 575

tac acc gtt ccg ctg cag ctg ctg gct tac cat gtc gcg ctg atc aaa 1776  
 Tyr Thr Val Pro Leu Gln Leu Leu Ala Tyr His Val Ala Leu Ile Lys 580 585 590

ggc acc gac gtt gac cag ccg cgt aac ctg gca aaa tcg gtt acg gtt 1824  
 Gly Thr Asp Val Asp Gln Pro Arg Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val 595 600 605

gag taa 1830  
 Glu

<210> 12  
 <211> 609  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*

<400> 12

Met Cys Gly Ile val Gly Ala Ile Ala Gln Arg Asp Val Ala Glu Ile  
 1 5 10 15

5

10

ES 2 536 916 T3

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

ES 2 536 916 T3

Leu Leu Ser Lys Val Glu His Ile Gln Ile Leu Ala Cys Gly Thr Ser  
 290 295 300

Tyr Asn Ser Gly Met Val Ser Arg Tyr Trp Phe Glu Ser Leu Ala Gly  
 305 310 315 320

Ile Pro Cys Asp Val Glu Ile Ala Ser Glu Phe Arg Tyr Arg Lys Ser  
 325 330 335

Ala Val Arg Arg Asn Ser Leu Met Ile Thr Leu Ser Gln Ser Gly Glu  
 340 345 350

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

Leu Gly Ser Leu Ala Ile Cys Asn Val Pro Gly Ser Ser Leu Val Arg  
 370 375 380

Glu Ser Asp Leu Ala Leu Met Thr Asn Ala Gly Thr Glu Ile Gly Val  
 385 390 395 400

Ala Ser Thr Lys Ala Phe Thr Thr Gln Leu Thr Val Leu Leu Met Leu  
 405 410 415

Val Ala Lys Leu Ser Arg Leu Lys Gly Leu Asp Ala Ser Ile Glu His  
 420 425 430

Asp Ile Val His Gly Leu Gln Ala Leu Pro Ser Arg Ile Glu Gln Met  
 435 440 445

Leu Ser Gln Asp Lys Arg Ile Glu Ala Leu Ala Glu Asp Phe Ser Asp  
 450 455 460

Lys His His Ala Leu Phe Leu Gly Arg Gly Asp Gln Tyr Pro Ile Ala  
 465 470 475 480

Leu Glu Gly Ala Leu Lys Leu Lys Glu Ile Ser Tyr Ile His Ala Glu  
 485 490 495

Ala Tyr Ala Ala Gly Glu Leu Lys His Gly Pro Leu Ala Leu Ile Asp  
 500 505 510

Ala Asp Met Pro Val Ile Val Val Ala Pro Asn Asn Glu Leu Leu Glu  
 515 520 525

Lys Leu Lys Ser Asn Ile Glu Glu Val Arg Ala Arg Gly Gly Gln Leu  
 530 535 540

Tyr Val Phe Ala Asp Gln Asp Ala Gly Phe Val Ser Ser Asp Asn Met  
 545 550 555 560

ES 2 536 916 T3

His Ile Ile Glu Met Pro His Val Glu Glu Val Ile Ala Pro Ile Phe  
 565 570 575

Tyr Thr Val Pro Leu Gln Leu Leu Ala Tyr His Val Ala Leu Ile Lys  
 580 585 590

Gly Thr Asp Val Asp Gln Pro Arg Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val  
 595 600 605

Glu

<210> 13

<211> 1830

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética que codifica una proteína de *Escherichia coli* que tiene la actividad de una GFAT

<400> 13

atgtgcggaa ttgttggtgc tatcgcccaa agagacgttg ctgagatttt gttagagggg 60  
 ctgcgaaggg tagagtatag aggatatgac tccgctggtc tggctgtcgt tgatgctgag 120  
 ggtcatatga caaggctaag aaggtttaga aaggttcaga tgcttgctca ggcagctgag 180  
 gaacatccat tgcattggagg tactgggtatt gcacatacca ggtgggctac tcattggggag 240  
 ccatcagaag ttaattgctca tccacatgtg agtgagcata tcgttgtagt tcacaatggg 300  
 ataattgaaa accacgaacc attgagggaa gagttaaagg caagaggata tactttttgtg 360  
 agtgagactg aactgaggt tattgcacat ttagtgaact gggactcaa acaggggggc 420  
 acattgctg aggctgtgtt aagagctatt cctcaactta gaggtgcata cggtactggt 480  
 attatggatt caagacaccc agatactctc cttgcagcta gatcaggtag tcccttggtc 540  
 ataggacttg gaatgggtga aaattttatc gctagcgacc aattggcctt attgccagtt 600  
 acaagacgat ttattttcct tgaagagggc gatattgctg agattactag aaggtctgtg 660  
 aacatctttg ataagactgg cgctgagggt aaacgtcagg atatcgagtc taaccttcaa 720  
 tacgatgctg gtgataaagg aatttacagg cattatatgc aaaaggaaat ttatgaacaa 780  
 ccaaatgcta tcaaaaacac acttactggc cgtattttctc atggacaggt cgatttaagc 840  
 gagcttggtc ctaatgcaga cgaactgcta tcaaaagttg agcacataca gatactggca 900  
 tgcggaacta gttataattc aggaatggtc tctagatact ggttcgaaag cttggcaggt 960  
 ataccttggt atgtagagat cgcttctgag tttaggtata gaaagtctgc tgtgcgtaga 1020  
 aattcattaa tgattacatt atctcaatcc ggagaaacag cagatacact ggctggattg 1080  
 aggctttcta aggaactcgg atatctgggt tcaattgcta tttgtaatgt accaggttcc 1140  
 tcattgggtc gtgaatcaga tctagcactt atgacaaatg caggaactga aataggtgtg 1200  
 gcaagtacca aggctttcac aaccactg accgtacttt taatgttggg agcaaaactc 1260

ES 2 536 916 T3

agtcgattaa aggggctaga tgcattctatc gaacatgata ttgttcacgg gcttcaagct 1320  
 ctcccttcaa gaattgaaca aatgctttca caagataaga gaatagaggc attggctgaa 1380  
 gatTTTTCCG acaaacatca cgcattgttt cttggacgtg gcgatcaata tccaattgca 1440  
 ttggaaggag ctttgaagtt gaaagaaata agttacattc acgcagaagc atatgcagct 1500  
 ggagaactca agcatgggtcc tttggcactc atcgacgctg acatgcccgt gatcgtagtg 1560  
 gctcctaata acgaactgct cgaaaagctt aaatcaaata tcgaagaggt tcgagctaga 1620  
 ggaggtcagc tttacgtttt cgctgaacaa gatgctggat tcgtgtcaag cgataaatg 1680  
 catataattg aaatgcctca cgttgaagaa gtgattgcac ctatatttta tacagtccca 1740  
 ttgcaacttc tagcttacca tgttgcactt attaaaggaa ctgatgttga tcagcctaga 1800  
 aacctagcaa aatctgtaac agtcgaataa 1830

5 <210> 14  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 14  
 tcgacaggcc tggatcctta attaaactag tctcaggag ctcggtac 48

15 <210> 15  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 15  
 cgagctctc gagactagt taattaagga tccaggcctg 40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula vegetal genéticamente modificada que tiene una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa vinculada a secuencias reguladoras que aseguran la transcripción en células vegetales integradas de manera estable en su genoma, en la que dicha célula vegetal tiene adicionalmente una pluralidad de moléculas de ácido nucleico extrañas integradas de manera estable en su genoma, en la que una primera molécula de ácido nucleico extraña codifica una proteína que tiene la actividad de una glutamina:fructosa 6-fosfato amidotransferasa-2 (GFAT-2) que se origina a partir de animales o una glutamina:fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT) que se origina a partir de bacterias y una segunda molécula de un ácido nucleico extraña que codifica una proteína que tiene la actividad de una UDP-glucosa deshidrogenasa (UDP-Glc-DH) y en la que dicha célula vegetal genéticamente modificada tiene una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad de una glutamina:fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT) y una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad de una UDP-glucosa deshidrogenasa (UDP-Glc-DH) en comparación con las células vegetales no modificadas genéticamente correspondientes.
- 15 2. La célula vegetal genéticamente modificada de acuerdo con la reivindicación 1 que sintetiza una cantidad aumentada de hialuronano en comparación con las células vegetales que tienen la actividad de una hialuronano sintasa y una actividad no aumentada de una glutamina:fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT) y una actividad no aumentada de una UDP-glucosa deshidrogenasa.
- 20 3. Una célula que comprende las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
4. Material de propagación de una planta de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
5. Una parte de planta cosechable de una planta de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
- 25 6. Un procedimiento de preparación de una planta que sintetiza hialuronano, que comprende
- a) modificar genéticamente una célula vegetal, en el que la modificación genética comprende las etapas i a iii siguientes
- 30 i) introducción de una molécula de ácido nucleico extraña que codifica una hialuronano sintasa unida a secuencias reguladoras que aseguran la transcripción en células vegetales en la célula vegetal
- ii) introducción de una molécula de ácido nucleico extraña en la célula vegetal, comprendiendo la molécula de ácido nucleico extraña una secuencia de codificación de una proteína que tiene la actividad de una glutamina:fructosa 6-fosfato amidotransferasa-2 (GFAT-2) que se origina de animales o una glutamina:fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT) que se origina de bacterias
- 35 iii) introducción de una molécula de ácido nucleico extraña en la célula vegetal, comprendiendo la molécula de ácido nucleico extraña una secuencia de codificación de una proteína que tiene la actividad de una glutamina:fructosa 6-fosfato UDP-glucosa deshidrogenasa
- en el que las etapas i a iii se pueden realizar en cualquier orden, individualmente, o cualquier combinación de las etapas i a iii se puede realizar simultáneamente
- 40 b) regenerando una planta a partir de las células vegetales de la etapa a).
7. Un procedimiento de preparación de hialuronano que comprende la etapa de extraer hialuronano a partir de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, a partir de plantas de acuerdo con la reivindicación 3, a partir del material de propagación de acuerdo con la reivindicación 4, o a partir de partes cosechables de plantas de acuerdo con la reivindicación 5.
- 45 8. El uso de una célula vegetal genéticamente modificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, una planta de acuerdo con la reivindicación 3, material de propagación de acuerdo con la reivindicación 4 o las partes cosechables de la planta de acuerdo con la reivindicación 5 para la preparación de hialuronano.
9. Un procedimiento de preparación de una composición que comprende hialuronano en el que son usadas las células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, las plantas de acuerdo con la reivindicación 3, material de propagación de acuerdo con la reivindicación 4, o las partes cosechables de la planta de acuerdo con la reivindicación 5.
- 50 10. El uso de células vegetales genéticamente modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, de plantas de acuerdo con la reivindicación 3, de material de propagación de acuerdo con la reivindicación 4 o de las partes de la planta cosechables para la preparación de una composición de acuerdo con la reivindicación 5 para preparar una composición.
- 55

Curva de calibración para calcular el contenido de hialuronano

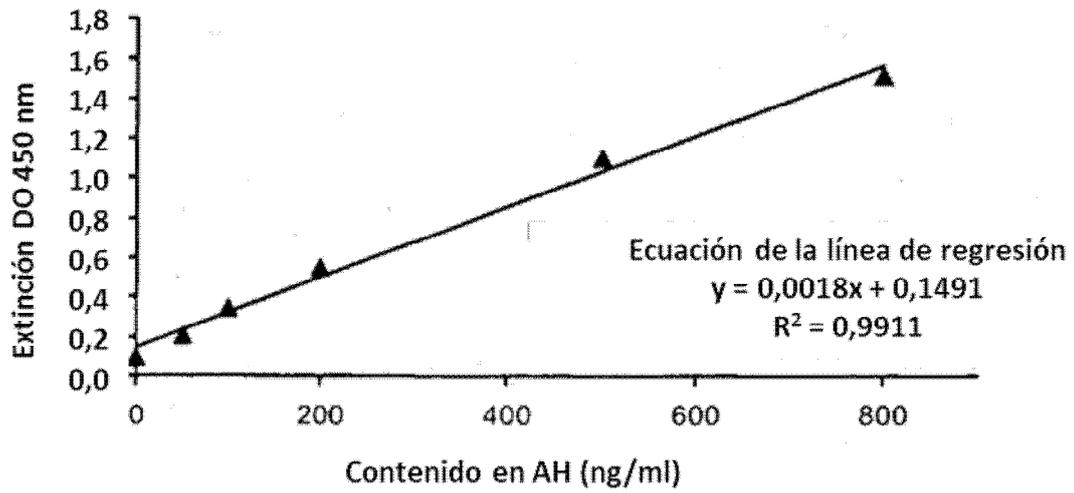


Fig. 1