

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 925**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2006 E 06806148 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 1951878**

54 Título: **Plantas con producción de hialuronano aumentada**

30 Prioridad:

**05.10.2005 EP 05090279**

**11.10.2005 US 725388 P**

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  
40789 Monheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**FROHBERG, CLAUS y  
ESSIGMANN, BERND**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 536 925 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

Plantas con producción de hialuronano aumentada

La presente invención se refiere a células vegetales y a plantas que sintetizan una mayor cantidad de hialuronano, y a procedimientos de preparación de dichas plantas, y también a procedimientos de preparación de hialuronano con la ayuda de estas células vegetales o plantas. En el presente documento, las células vegetales o plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención tienen una actividad aumentada de hialuronano sintasa y, además, una actividad de glutamina:fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT) aumentada en comparación con las células vegetales de tipo natural o plantas de tipo natural. La presente invención se refiere además al uso de plantas que tienen una mayor síntesis de hialuronano para la preparación de hialuronano y productos alimentarios o piensos que contienen hialuronano.

El hialuronano es un mucopolisacárido lineal, no ramificado, de origen natural (glucosaminoglucano) que está construido por moléculas alternas de ácido glucurónico y *N*-acetil-glucosamina. El bloque estructural básico de hialuronano consiste en el disacárido ácido glucurónico- $\beta$ -1,3-*N*-acetil-glucosamina. En el hialuronano, estas unidades de repetición están unidas entre sí a través enlaces  $\beta$ -1,4. En farmacia, con frecuencia, se hace uso de la expresión ácido hialurónico. Dado que, en la mayoría de los casos, el hialuronano está presente como un polianión y no como el ácido libre, de aquí en adelante, se usa preferentemente el término "hialuronano", pero se ha de entender que cada término engloba ambas formas moleculares.

El hialuronano tiene propiedades fisicoquímicas poco habituales tales como, por ejemplo, propiedades de polielectrolitos, propiedades viscoelásticas, una alta capacidad para unirse al agua, propiedades de formación de gel, que, además de otras propiedades del hialuronano, se describen en un artículo de revisión de Lapcik *et al.* (1998, *Chemical Reviews* 98(8), 2663-2684).

El hialuronano es un componente del tejido conjuntivo extracelular y los fluidos corporales de los vertebrados. En los seres humanos, el ácido hialurónico es sintetizado por la membrana celular de todas las células del organismo, especialmente las células mesenquimales, y está presente de forma ubicua en el organismo a una concentración particularmente elevada en los tejidos conjuntivos, la matriz extracelular, el cordón umbilical, el líquido de las articulaciones, el tejido cartilaginoso, la piel y el cuerpo vítreo del ojo (Bernhard Gebauer, 1998, Inaugural-Dissertation, Virchow-Klinikum Medizinische Fakultät Charité der Humboldt Universität zu Berlin; Fraser *et al.*, 1997, *Journal of Internal Medicine* 242, 27-33). Recientemente, el hialuronano también se ha encontrado en los organismos de animales no vertebrados (moluscos) (Volpi y Maccari, 2003, *Biochimie* 85, 619-625). Además, algunas bacterias patógenas gram-positivas (*Streptococcus* del grupo A y C) y bacterias gram-negativas (*Pasteurella*) sintetizan hialuronano como exopolisacáridos que protegen estas bacterias contra el ataque por el sistema inmunitario de su huésped, dado que el hialuronano es una sustancia no inmunogénica. Los virus que infectan las algas verdes unicelulares del género *Chlorella*, algunos de los cuales están presentes como endosimbiontes en las especies de *Paramecium*, otorgan a las algas verdes unicelulares la capacidad de sintetizar hialuronano tras la infección por el virus (Graves *et al.*, 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 para sintetizar hialuronano está mediada por una infección con un virus cuyo genoma tiene una secuencia que codifica la hialuronano sintasa (DeAngelis, 1997, *Science* 278, 1800-1803). Además, el genoma del virus contiene secuencias que codifican una glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT). La GFAT convierte la fructosa 6-fosfato y la glutamina en glucosamina 6-fosfato, que es un metabolito importante en la vía metabólica para la síntesis de hialuronano. Ambos genes codifican proteínas activas que, al igual que la hialuronano sintasa del virus, se transcriben de forma simultánea en la fase temprana de la infección viral (DeAngelis *et al.*, 1997, *Science* 278, 1800-1803, Graves *et al.*, 1999, *Virology* 257, 15-23). La actividad de una proteína que tiene la actividad glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT) no se podría detectar ni en extractos de células no infectadas por un virus ni en células infectadas por virus (Landstein *et al.*, 1998, *Virology* 250, 388-396). Por consiguiente, se desconoce el papel de la expresión de GFAT en las células de *Chlorella* infectadas por virus para la síntesis de hialuronano, y si se requieren para la síntesis de hialuronano. Las plantas de origen natural por sí mismas no tienen ningún ácido nucleico en su genoma que codifique proteínas que catalicen la síntesis de hialuronano y, aunque se ha descrito y caracterizado un gran número de hidratos de carbono de plantas, hasta la fecha, no ha sido posible detectar hialuronano ni moléculas relacionadas con el hialuronano en plantas no infectadas (Graves *et al.*, 1999, "Virology" 257, 15-23).

La catálisis de la síntesis de hialuronano es efectuada por una sola enzima integrada en la membrana o asociada a la membrana, la hialuronano sintasa. Las hialuronano sintasas que se han estudiado hasta la fecha 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 sintasas de vertebrados se distinguen además por las isoenzimas identificadas. Las diferentes isoenzimas se denominan por orden de identificación mediante números arábigos (por ejemplo, hsHAS1, hsHAS2, hsHAS3).

Todavía no se ha dilucidado por completo el mecanismo de transferencia de moléculas de hialuronano sintetizadas a través de la membrana citoplasmática en el medio que rodea la célula. Hipótesis anteriores asumieron que el transporte a través de la membrana celular fue efectuado por la propia hialuronano sintasa. Sin embargo, los

resultados más recientes indican que el transporte de moléculas de hialuronano a través de la membrana citoplasmática tiene lugar mediante el transporte dependiente de la energía a través de las proteínas transportadoras responsables de esta acción. Por lo tanto, se generaron cepas de *Streptococcus* mediante mutación en la que se inhibió la síntesis de una proteína de transporte activo. Estas cepas sintetizaron menos hialuronano que las correspondientes cepas de bacterias de tipo natural (Ouskova *et al.*, 2004, "Glycobiology" 14(10), 931-938). En los fibroblastos humanos, fue posible demostrar, con la ayuda de agentes que inhiben específicamente proteínas de transporte conocidas, que es posible reducir tanto la cantidad de hialuronano producida como la actividad de las hialuronano sintetas (Prehm y Schumacher, 2004, *Biochemical Pharmacology* 68, 1401-1410). Se desconoce en qué cantidad, en todo caso, las proteínas de transporte capaces de transportar hialuronano están presentes en las plantas.

Las propiedades poco frecuentes del hialuronano ofrecen una gran cantidad de posibilidades para su aplicación en diversos campos tales como, por ejemplo, farmacia, industria cosmética, en la producción de alimentos y piensos, en aplicaciones técnicas (por ejemplo, como lubricantes), etc. Las aplicaciones más importantes en las que el hialuronano se está usando actualmente están en el campo de la medicina y la cosmética (véase, por ejemplo, Lapcik *et al.*, 1998, *Chemical Reviews* 98(8), 2663-2684, Goa y Benfield, 1994, *Drugs* 47(3), 536-566).

En el campo de la medicina, los productos que contienen hialuronano se usan actualmente para el tratamiento intraarticular de la artrosis y en los productos oftálmicos usados para la cirugía ocular. El hialuronano también se usa para el tratamiento de trastornos de las articulaciones en caballos de carreras. Además, el ácido hialurónico es un componente de algunos productos rinológicos que, por ejemplo, en forma de gotas para los ojos y nasales, sirven para humedecer las membranas mucosas secas. Las soluciones que contienen hialuronano para inyección se usan como analgésicos y antirreumáticos. Los parches que comprenden hialuronano o hialuronano derivado se emplean en la cicatrización de heridas. Como dermaticos, los implantes de gel que contienen hialuronano se usan para corregir las deformaciones de la piel en cirugía plástica. Para las aplicaciones farmacológicas, se da preferencia al uso del hialuronano que tiene un alto peso molecular. En la medicina estética, los preparados de hialuronano están entre los materiales de relleno de la piel más adecuados. Mediante la inyección de hialuronano, durante un período limitado de tiempo, es posible atenuar las arrugas o aumentar el volumen de los labios. En los productos cosméticos, en particular, en cremas y lociones para la piel, con frecuencia, el hialuronano se usa como crema hidratante en virtud de su alta capacidad de retención de agua.

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

El hialuronano usado con fines comerciales actualmente se aísla de tejidos animales (crestas de gallo) o se prepara por fermentación usando cultivos bacterianos. El documento US 4.141.973 describe un procedimiento de aislamiento de hialuronano de crestas de gallo o, como alternativa, de cordones umbilicales. Además del hialuronano, los tejidos animales (por ejemplo, crestas de gallo, cordones umbilicales) también contienen otros mucopolisacáridos relacionados con el hialuronano, tales como sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratano, sulfato de heparán y heparina. Además, los organismos animales contienen proteínas (hialaderinas) que se unen específicamente al hialuronano y que se requieren para las más diversas funciones en el organismo, tales como, por ejemplo, la degradación del hialuronano en el hígado, la función del hialuronano como estructura principal para la migración de células, la regulación de la endocitosis, el anclaje del hialuronano en la superficie 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 ff.)

Las cepas de *Streptococcus* usadas para la producción bacteriana de hialuronano son exclusivamente bacterias patógenas. Durante el cultivo, estas bacterias también producen exotoxinas (pirogénicas) y hemolisinas (estreptolisina (en particular,  $\alpha$ - y  $\beta$ -hemolisina) (Kilian, M.: "Streptococcus and Enterococcus". En: *Medical Microbiology*. Greenwood, D.; Slack, RCA; Peutherer, J. F. (Eds.). Capítulo 16. Churchill Livingstone, Edinburgh, RU: pág. 174-188, 2002, ISBN 0443070776), que se liberan en el medio de cultivo. Esto dificulta la purificación y el aislamiento del hialuronano preparado con ayuda de cepas de *Streptococcus*. En particular para la aplicación farmacéutica, la presencia de exotoxinas y hemolisinas en la preparación es un problema. El documento US 4.801.539 describe la preparación de hialuronano por fermentación de una cepa bacteriana mutagenizada (*Streptococcus zooedemicus*). La cepa bacteriana mutagenizada usada ya no sintetiza  $\beta$ -hemolisina. El rendimiento obtenido fue de 3,6 g de hialuronano por litro de cultivo. El documento EP 0694616 describe un procedimiento para el cultivo de *Streptococcus zooedemicus* o *Streptococcus equi*, en el que, en las condiciones de cultivo empleadas, no se sintetizó estreptolisina, pero sí mayores cantidades de hialuronano. El rendimiento alcanzado fue de 3,5 g de hialuronano por litro de cultivo. Durante el cultivo, las cepas de *Streptococcus* liberan la enzima hialuronidasa en el medio de cultivo, como consecuencia de lo cual, en este sistema de producción, también se reduce el peso molecular durante la purificación. El uso de cepas de *Streptococcus* negativas en hialuronidasa o de procedimientos para la producción de hialuronano donde se inhibe la producción de hialuronidasa durante el cultivo se describe en el documento US 4.782.046. El rendimiento alcanzado fue de hasta 2,5 g de hialuronano por litro de cultivo, y el peso molecular medio máximo alcanzado fue de  $3,8 \times 10^6$  Da, en una distribución del peso molecular de  $2,4 \times 10^6$  a  $4,0 \times 10^6$ . Los documentos US 20030175902 y WO 03 054163 describen la preparación de hialuronano con la ayuda de la expresión heteróloga de una hialuronano sintasa de *Streptococcus equisimilis* en *Bacillus subtilis*. Para lograr

la producción de cantidades suficientes de hialuronano, además de la expresión heteróloga de una hialuronano sintasa, también se requiere 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 medio máximo alcanzado fue de aproximadamente  $4,2 \times 10^6$ . Sin embargo, este peso molecular medio solo se alcanzó para la cepa de *Bacillus* recombinante donde 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 integró en el genoma de *Bacillus subtilis* bajo el control del promotor *amyQ*, donde, al mismo tiempo, el gen *cxpY* endógeno de *Bacillus subtilis* (que codifica una oxidasa del citocromo P450) fue inactivado.

El documento WO 05 012529 describe la preparación de plantas de tabaco transgénicas que se transformaron usando moléculas de ácido nucleico que codificaban hialuronano sintasas de virus que infectan el género *Chlorella*. En el documento WO 05 012529, se hizo uso, por una parte, de secuencias de ácidos nucleicos que codifican la hialuronano sintasa de la cepa de virus de *Chlorella* CVH11 y, por otra parte, la cepa de virus de *Chlorella* CVKA1 para transformar plantas de tabaco. La síntesis de hialuronano solo se pudo demostrar para una planta transformada con un ácido nucleico que codificaba una hialuronano sintasa aislada de la cepa de virus de *Chlorella* CVKA1. Para las plantas de tabaco transformadas con una secuencia de ácido nucleico que codificaba una hialuronano sintasa aislada de la cepa de virus de *Chlorella* CVH11, no fue posible detectar la síntesis de hialuronano en las plantas transgénicas correspondientes. La cantidad de hialuronano sintetizada por la única planta de tabaco transgénica productora de hialuronano en el documento WO 05 012529 se indica como de aproximadamente  $4,2 \mu\text{g}$  de hialuronano por ml de volumen medido que, teniendo en cuenta la descripción para llevar a cabo el experimento en cuestión, corresponde aproximadamente a una cantidad de, como máximo,  $12 \mu\text{g}$  de hialuronano producida por gramo de peso fresco de material vegetal.

La hialuronano sintasa cataliza la síntesis de hialuronano a partir de los materiales de partida UDP-*N*-acetilglucosamina y ácido UDP-glucurónico. Ambos materiales de partida mencionados están presentes en las células vegetales.

Para la síntesis de la UDP-*N*-acetilglucosamina en las células vegetales, el documento WO 98 35047 describe una ruta metabólica donde la glucosamina es convertida por una serie de sucesivas etapas de reacción catalizadas enzimáticamente con formación de los metabolitos *N*-acetilglucosamina, *N*-acetilglucosamina-6-fosfato, *N*-acetilglucosamina-1-fosfato en UDP-*N*-acetilglucosamina. Una ruta metabólica alternativa comprende una reacción de la fructosa-6-fosfato y la glutamina, dando glucosamina-6-fosfato que es convertida posteriormente por una serie de sucesivas etapas de reacción catalizadas enzimáticamente con formación de los metabolitos glucosamina-1-fosfato y *N*-acetilglucosamina-1-fosfato en UDP-*N*-acetilglucosamina. La conversión de la fructosa-6-fosfato y la glutamina en glucosamina-6-fosfato es catalizada por una proteína que tiene actividad de glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT) (Mayer *et al.*, 1968, *Plant Physiol.* 43, 1097-1107). El documento WO 00 11192 describe la sobreexpresión específica del 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 transgénicas con el fin de sintetizar un almidón catiónico en las plantas que tienen moléculas de 2-amino-anhidroglucosa. La ruta metabólica descrita que, de acuerdo con la descripción del documento WO 00 11192, debería dar lugar a 2-amino-anhidroglucosa que se incorpora en el almidón, comprende entre otras cosas la incorporación de UDP-glucosamina por sintasas de almidón y/o sintasas de glucógeno en el almidón. Se afirma que se podría detectar el aumento de cantidades de UDP-glucosamina en la harina de endospermo de las plantas de maíz transgénicas en cuestión que sobreexpresan una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT traducionalmente condensada con un péptido señal de plástidos. Cuando se expresó la proteína que tiene actividad (enzimática) de una GFAT sin péptido señal, fue posible detectar un aumento de la cantidad de glucosamina-1-fosfato en las harinas correspondientes de tejido del endospermo de maíz. No fue posible detectar almidón catiónico en las plantas transgénicas.

La producción de hialuronano por fermentación de cepas bacterianas está asociada con costes elevados, ya que las bacterias tienen que ser fermentadas en recipientes estériles sellados en caras condiciones de cultivo controladas (véase, por ejemplo, el documento US 4.897.349). Además, la cantidad de hialuronano que se puede producir por fermentación de cepas bacterianas está limitada por las instalaciones de producción presentes en cada caso. En este caso, también se ha de tener en cuenta que, como consecuencia de las leyes físicas, no se pueden construir fermentadores para volúmenes de cultivo excesivamente elevados. Cabe mencionar, particularmente en este caso, una mezcla homogénea de las sustancias alimentadas desde el exterior (por ejemplo, fuentes de nutrientes esenciales para las bacterias, reactivos para regular el pH, oxígeno) con el medio de cultivo requerido para la producción eficaz, que, en grandes fermentadores, solo se puede garantizar con gran gasto técnico, en todo caso.

La purificación de hialuronano de organismos animales es complicada debido a la presencia, en los tejidos animales, de otros mucopolisacáridos y proteínas que se unen específicamente al hialuronano. En los pacientes, el uso de preparados medicinales que contienen hialuronano contaminados por proteínas animales puede dar lugar a reacciones inmunológicas no deseadas del organismo (US 4.141.973), en particular si el paciente es alérgico a las proteínas animales (por ejemplo, la clara de huevo de pollo). Además, las cantidades (los rendimientos) de hialuronano que se pueden obtener a partir de tejidos animales en calidad y pureza satisfactorias son bajas (cresta de gallo: 0,079 % p/p, EP 0144019, US 4.782.046), lo que requiere el procesamiento de grandes cantidades de

tejidos animales. En efecto, un problema adicional en el aislamiento del hialuronano a partir de tejidos animales consiste en que el peso molecular del hialuronano durante la purificación se reduce, dado que los tejidos animales también contienen una enzima degradante del hialuronano (hialuronidasa).

Además de las hialuronidasas y las exotoxinas mencionadas, las cepas de *Streptococcus* también producen endotoxinas que, cuando están presentes en productos farmacológicos, presentan riesgos para la salud del paciente. En un estudio científico, se demostró que incluso los productos medicinales que contienen hialuronano del mercado contienen cantidades detectables de endotoxinas bacterianas (Dick *et al.*, 2003, *Eur J Ophthalmol.* 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 *et al.* 1998, *Chemical Reviews* 98(8), 2663-2684). El documento US 20030134393 describe el uso de una cepa de *Streptococcus* para la producción de hialuronano que sintetiza una cápsula de hialuronano particularmente pronunciada (superencapsulada). El hialuronano aislado después de la fermentación tenía un peso molecular de  $9,1 \times 10^6$ . Sin embargo, el rendimiento solo fue de 350 mg por litro.

Algunas de las desventajas de la producción de hialuronano por fermentación bacteriana o por aislamiento a partir de tejidos animales se pueden evitar mediante la producción de hialuronano usando plantas transgénicas. Sin embargo, las cantidades de hialuronano alcanzadas actualmente que se pueden producir usando plantas transgénicas requerirían un superficie relativamente elevada de cultivo para producir cantidades relativamente altas de hialuronano. Además, el aislamiento o la purificación de hialuronano a partir de plantas que tienen un contenido de hialuronano inferior son considerablemente más complicados y costosos que el aislamiento o la purificación a partir de plantas que tienen un contenido de hialuronano superior.

Aunque el hialuronano tiene propiedades poco habituales, debido a su escasez y alto precio, se usa rara vez, si es que se usa, para aplicaciones industriales.

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

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

Así pues, la presente invención se refiere a células vegetales modificadas genéticamente o plantas modificadas genéticamente que tienen una molécula de ácido nucleico, integrada de manera estable en su genoma, que codifica una hialuronano sintasa, caracterizadas porque dichas células vegetales o dichas plantas tienen además una mayor actividad de una proteína que tiene una actividad glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT) (enzimática) en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente o plantas de tipo natural no modificadas genéticamente.

En el presente documento, la modificación genética de las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención puede ser cualquier modificación genética que produzca una integración estable de una molécula de ácido nucleico que codifique una hialuronano sintasa en una célula vegetal o una planta y que aumente la actividad de una proteína que tenga la actividad (enzimática) de una GFAT en las células vegetales modificadas genéticamente o plantas modificadas genéticamente, en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente o plantas de tipo natural no modificadas genéticamente.

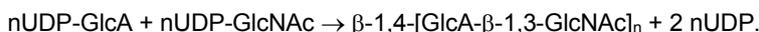
En el contexto de la presente invención, la expresión "célula vegetal de tipo natural" se ha de entender como las células vegetales que sirvieron como material de partida para la preparación de las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, es decir, su información genética, aparte de las modificaciones genéticas introducidas y que producen una integración estable de una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa y el aumento de la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT, corresponde a una célula vegetal modificada genéticamente de acuerdo con la invención.

En el contexto de la presente invención, la expresión "planta de tipo natural" se ha de entender como plantas que sirvieron como material de partida para la preparación de las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, es decir, su información genética, aparte de las modificaciones genéticas introducidas, y que producen una integración estable de una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa y el aumento de la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT, corresponde a la planta modificada genéticamente de acuerdo con la invención.

En el contexto de la presente invención, el término "correspondiente" significa que, cuando se compara una pluralidad de objetos, los objetos en cuestión que se comparan entre sí se han mantenido en las mismas condiciones. En el contexto de la presente invención, el término "correspondiente" en el contexto de las células vegetales de tipo natural o las plantas de tipo natural significa que las células vegetales o plantas comparadas entre sí, se cultivaron en las mismas condiciones de cultivo, y que tienen la misma edad (de cultivo).

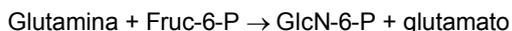
En el contexto de la presente invención, la expresión "hialuronano sintasa" (EC 2.4.1.212) se ha de entender como

una proteína que sintetiza hialuronano a partir de los sustratos de UDP-ácido glucurónico (UDP-GICA) y *N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). La síntesis de hialuronano es catalizada de acuerdo con los siguientes esquemas de reacción:



5 Se han descrito las moléculas de ácido nucleico y las secuencias de proteínas correspondientes que codifican hialuronano sintasas, entre otros, para los siguientes organismos: conejo (*Oryctolagus cuniculus*) ocHas2 (EMBL AB055978.1, US 20030235893), ocHas3 (EMBL AB055979.1, US 20030235893); babuino (*Papio anubis*) paHas1 (EMBL AY463695.1); rana (*Xenopus laevis*) xlHas1 (EMBL M22249.1, US 20030235893), xlHas2 (DG42) (EMBL AF168465.1), xlHas3 (EMBL AY302252.1); ser humano (*Homo sapiens*) hsHAS1 (EMBL D84424.1, US 20030235893), hsHAS2 (EMBL U54804.1, US 55 20030235893), hsHAS3 (EMBL AF232.772.1, US 20030235893); ratón (*Mus musculus*), mmHas1 (EMBL D82964.1, US 20030235893), mmHAS2 (EMBL U52524.2, US 20030235893), mmHas3 (EMBL U86408.2, US 20030235893); ganado (*Bos taurus*) btHas2 (EMBL AJ004951.1, US 20030235893); pollo (*Gallus gallus*) ggHas2 (EMBL AF106940.1, US 20030235893); rata (*Rattus norvegicus*) rnHas 1 (EMBL AB097568.1, Itano *et al.*, 2004, *J. Biol. Chem.* 279(18) 18679-18678), rnHas2 (EMBL AF008201.1); rnHas 3 (NCBI NM\_172319.1, Itano *et al.*, 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 (EMBL AB159675), pez cebra (*Danio rerio*) brHas1 (EMBL AY437407), brHas2 (EMBL AF190742.1) brHas3 (EMBL AF190743.1); pmHas de *Pasteurella multocida* (EMBL AF036004.2); spHas de *Streptococcus pyogenes* (EMBL, L20853.1, L21187.1, US 6,455,304, US 20030235893); seHas de *Streptococcus equis* (EMBL AF347022.1, AY173078.1), suHasA de *Streptococcus uberis* (EMBL AJ242946.2, US 20030235893), seqHas de *Streptococcus equisimilis* (EMBL AF023876.1, US 20030235893); ssHAS de *Sulfolobus solfataricus* (US 20030235893), stHas de *Sulfolobus tokodaii* (AP000988.1), Virus 1 de *Chlorella* de *Paramecium bursaria*, cvHAS (EMBL U42580.3, PB42580, US 20030235893).

25 En el contexto de la presente invención, la expresión "glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT)" (EC 2.6.1.16), también denominada en la literatura especializada glucosamina sintasa, se ha de entender como una proteína que sintetiza, a partir de los sustratos glutamina y fructosa-6-fosfato (Fruc-6-P) glucosamina-6-fosfato (GlcN-6-P). Esta catálisis procede de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:



30 En particular, en los organismos animales, fue posible demostrar dos isoformas diferentes de proteínas que tenían la actividad (enzimática) de un GFAT (denominadas GFAT-1 y GFAT-2, respectivamente, en la literatura). Hu *et al.* (2004), *J. Biol. Chem.* 279(29), 29988-29993 describen las diferencias de las respectivas proteínas de ratón; además de las diferencias en la expresión específica de tejido de las proteínas en cuestión que tienen la actividad (enzimática) de una glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa 1 (GFAT-1) y una glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa 2 (GFAT-2), fue posible demostrar que ambas isoformas están reguladas por la fosforilación realizada por una proteína quinasa dependiente de cAMP. La actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT-1 se inhibe por la fosforilación de un resto de serina conservado (serina 205 en la GFAT-1 del ratón, N° de acceso del 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 es aumentada por la fosforilación de un resto de serina conservado (serina 202 en la GFAT-2 del ratón, N° de acceso del GenBank: NM\_013529) de la secuencia de aminoácidos en cuestión. Tanto las proteínas que tienen la actividad de una GFAT-1 como las proteínas que tienen la actividad de una GFAT-2 son inhibidas de una forma 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 parte de la UDP-*N*-acetilglucosamina es inferior (reducción máxima de la actividad por parte de la UDP-*N*-acetilglucosamina del aproximadamente 15 %) en comparación con una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 (reducción máxima de la actividad por parte de la UDP-*N*-acetilglucosamina del aproximadamente 51 % o 80 %). Hay indicios de que la inhibición de una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 en los organismos animales se basa en el hecho de que a concentraciones elevadas de UDP-*N*-acetilglucosamina, hay una glucosilación por *O*-glucosa-*N*-acetilglucosamina de las proteínas en cuestión. Todavía no se sabe del todo si también se produce en las células vegetales una regulación de la actividad de las proteínas mediante *O*-glucosilación (Huber y Hardin, 2004, *Current Opinion in Plant Biotechnology* 7, 318-322).

50 En el contexto de la presente invención, la expresión "glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa-1 (GFAT-1)" se debe entender como una proteína que tiene la actividad de una GFAT y cuya actividad es inhibida por la fosforilación realizada por una proteína quinasa dependiente de cAMP.

55 En el contexto de la presente invención, la expresión "glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa-2 (GFAT-2)" se debe entender como una proteína que tiene la actividad de una GFAT y que es activada mediante la fosforilación realizada por una proteína quinasa dependiente de cAMP.

En el contexto de la presente invención, la expresión "glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT)" se usa como una expresión en sentido amplio que incluye todas las proteínas que tienen la actividad de una GFAT. Por consiguiente, también comprende proteínas denominadas en la literatura como "glutamina:fructosa-6-fosfato

amidotransferasa-1 (GFAT-1)" o como "glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa-2 (GFAT-2)", pero sin limitación.

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

Es posible determinar un aumento de la expresión, por ejemplo, midiendo la cantidad de transcripciones que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT, por ejemplo, mediante análisis de transferencia Northern o RT-PCR. En el presente documento, un aumento significa preferentemente un aumento de la cantidad de transcripciones en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente o plantas de tipo natural no modificadas genéticamente de al menos un 50 %, en particular de al menos un 70 %, preferentemente de al menos un 85 %, y de manera particularmente preferida de al menos un 100 %. Un aumento de la cantidad de transcripciones que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT también significa que las plantas o células vegetales que no tienen cantidades detectables de transcripciones que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT tienen, tras la modificación genética de acuerdo con la invención, cantidades detectables de transcripciones que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT.

Es posible determinar un aumento de la cantidad de proteína que tiene la actividad de una GFAT que produce un aumento de la actividad de estas proteínas en las células vegetales en cuestión, por ejemplo, mediante procedimientos inmunológicos tales como análisis de transferencia Western, ELISA (inmunoensayo de sorbencia ligado a una enzima) o RIA (radioinmunoensayo). Los procedimientos de preparación de anticuerpos que reaccionan específicamente con una determinada proteína, es decir, que se unen específicamente a dicha proteína, son conocidos por los expertos en la materia (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 bajo pedido. En el presente documento, un aumento de la cantidad de proteína significa preferentemente un aumento de la cantidad de proteína que tiene una actividad de una GFAT en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente o plantas de tipo natural no modificadas genéticamente de al menos un 50 %, en particular, de al menos un 70 %, preferentemente de al menos un 85 %, y de manera particularmente preferida, de al menos un 100 %. Un aumento de la cantidad de proteína que tiene una actividad de una GFAT también significa que las plantas o células vegetales que no tienen cantidad detectable de una proteína que tiene la actividad de una GFAT tienen, tras la modificación genética de acuerdo con la invención, una cantidad detectable de una proteína que tiene la actividad de una GFAT.

Es posible determinar el aumento de la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT en extractos vegetales mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia como se describe, por ejemplo, en Samac *et al.* (2004, "Applied Biochemistry and Biotechnology" 113-116, Humana Press, Editor Ashok Mulehandani, 1167-1182, ISSN 0273-2289). En el punto 5 del apartado de Procedimientos generales se ofrece un procedimiento preferido de determinación de la cantidad de la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT.

Un aumento de la cantidad de actividad (enzimática) de proteínas que tienen la actividad de una GFAT significa preferentemente un aumento de la actividad de dichas proteínas de lo menos un 50 %, preferentemente de al menos un 70 %, de manera especialmente preferida de al menos un 85 % y de manera particularmente preferida de al menos un 100 % en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente o plantas de tipo natural no modificadas genéticamente. Un aumento de la cantidad de actividad enzimática de proteínas que tienen la actividad de una GFAT también significa que las plantas o células vegetales que no tienen cantidad detectable de una proteína que tiene la actividad de una GFAT tienen, tras la modificación genética de acuerdo con la invención, una cantidad detectable de una proteína que tiene la actividad de una GFAT.

En el contexto de la presente invención, el término "genoma" se debe entender en el sentido de todo el material genético presente en una célula vegetal. El experto en la materia sabe que, además del núcleo, otros compartimentos (por ejemplo, plástidos, mitocondrias) también contienen material genético.

En el contexto de la presente invención, la expresión "molécula de ácido nucleico integrada de forma estable" se debe entender en el sentido de 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 de ácidos nucleicos del huésped que bordean el sitio de integración, de manera que el sitio de integración de la cadena de ADN replicada está rodeado por las mismas secuencias de ácidos nucleicos que en la hebra de lectura que sirve como una matriz para la replicación.

Hay un gran número de técnicas para integrar de manera estable las moléculas de ácido nucleico a una célula vegetal huésped. Estas técnicas incluyen la transformación de células vegetales con T-ADN usando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como medio de transformación, la fusión de protoplastos, la inyección, la

electroporación de ADN, la introducción de ADN mediante la metodología biolística y también otras opciones (revisión en "Transgenic Plants", Leandro ed., Humana Press 2004, ISBN 1-59259-827-7). El uso de la transformación mediada por *Agrobacterium* de células vegetales ha sido objeto de estudio en profundidad y se ha descrito de forma exhaustiva en el documento EP 120516; Hoekema, en: "The Binary Plant Vector System" Offsetdrukkerij Kanters B. V. Alblaserdam (1985), Capítulo V; Fraley *et al.*, *Crit. Rev. Plant Sci.* 4, 1-46 y en An *et al.* EMBO J. 4, (1985), 277-287. Para la transformación de patatas véase, por ejemplo, Rocha-Sosa *et al.*, EMBO J. 8, (1989), 29-33; para la transformación de plantas de tomate véase, por ejemplo, el documento US 5.565.347.

También se ha descrito la transformación de plantas monocotiledóneas usando vectores basados en la transformación con *Agrobacterium* (Chan *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 22, (1993), 491-506; Hiei *et al.*, *Plant J.* 6, (1994) 271-282; Deng *et al.*, *Science in China* 33, (1990), 28-34; Wilmink *et al.*, *Plant Cell Reports* 11, (1992), 76-80; May *et al.*, *Bio/Technology* 13, (1995), 486-492; Conner y Domisse, *Int. J. Plant Sci.* 153 (1992), 550-555; Ritchie *et al.*, *Transgenic Res.* 2, (1993), 252-265). Un sistema alternativo de transformación de plantas monocotiledóneas es la transformación usando la metodología biolística (Wan y Lemaux, *Plant Physiol.* 104, (1994), 37-48; Vasil *et al.*, *Bio/Technology* 11 (1993), 1553-1558; Ritala *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 24, (1994), 317-325; Spencer *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 79, (1990), 625-631), la transformación de protoplastos, la electroporación de células parcialmente permeabilizadas, la introducción de ADN usando fibras de vidrio. En particular, la transformación del maíz se ha descrito varias veces en la bibliografía (cf., por ejemplo, el documento WO95/06128, EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm *et al.*, *Biotechnology* 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm *et al.*, *Plant Cell* 2, (1990), 603-618; Koziel *et al.*, *Biotechnology* 11 (1993), 194-200; Moroc *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 80, (1990), 721-726). También se ha descrito la transformación de otras gramíneas tales como, por ejemplo, pastos altos (*Panicum virgatum*) (Richards *et al.*, 2001, *Plant Cell Reporters* 20, 48-54). También se ha descrito la transformación satisfactoria de otras especies de cereales, por ejemplo de la cebada (Wan y Lemaux, s.o.; Ritala *et al.*, s.o.; Krens *et al.*, *Nature* 296, (1982), 72-74) y del trigo (Nehra *et al.*, *Plant J.* 5, (1994), 285-297; Becker *et al.*, 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 modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención ofrecen la ventaja de que producen mayores cantidades de hialuronano que las plantas que solamente tienen la actividad de una hialuronano sintasa. Esto permite la producción de hialuronano con un bajo coste ya que el aislamiento del hialuronano de plantas que tienen un contenido de hialuronano superior es menos complicado y más rentable. Además, en comparación con las plantas descritas en la técnica anterior, se requieren menores superficies de cultivo para producir hialuronano usando las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención. Esto hace posible proporcionar hialuronano en cantidades suficientes, incluso para aplicaciones industriales en las que actualmente no se usa debido a su escasez y alto precio. Los organismos vegetales infectados por virus del género *Chlorella* son inadecuados para producir cantidades relativamente altas de hialuronano. En la producción de hialuronano, las algas infectadas por virus tienen la desventaja de que los genes necesarios para la síntesis del hialuronano no están integrados de manera estable en su genoma (Van Etten y Meints, 1999, *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 447-494), de modo que, para la producción de hialuronano, se ha de repetir la infección por el virus. Por consiguiente, no es posible aislar las células de *Chlorella* individuales que sintetizan de manera continua la calidad y cantidad deseadas de hialuronano. Además, en las algas del género *Chlorella* infectadas por virus, el hialuronano solamente se produce durante un período limitado de tiempo, y como resultado de la lisis causada por el virus, las algas mueren solo aproximadamente 8 horas después de la infección (Van Etten *et al.*, 2002, *Arch Virol* 147, 1479-1516). Por el contrario, la presente invención ofrece la ventaja de que las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención y las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención se pueden propagar de manera ilimitada vegetativa o sexualmente y que producen hialuronano de manera continua. 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 baja de hialuronano. Por el contrario, la presente invención ofrece la ventaja de que las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención y las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención sintetizan cantidades considerablemente más altas de hialuronano.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención que sintetizan hialuronano. Preferentemente, las células vegetales de acuerdo con la invención o las plantas de acuerdo con la invención sintetizan al menos 500 µg de hialuronano por gramo de peso fresco, preferentemente al menos 1.500 µg de hialuronano por gramo de peso fresco, de manera particularmente preferida al menos 3.500 µg de hialuronano por gramo de peso fresco, de manera especialmente preferida al menos 4.000 µg de hialuronano por gramo de peso fresco y lo más preferentemente al menos 5.500 µg de hialuronano por gramo de peso fresco. Preferentemente, las células vegetales de acuerdo con la invención o las plantas de acuerdo con la invención sintetizan como máximo 25.000 µg de hialuronano por gramo de peso fresco, particularmente preferente como máximo 20.000 µg de hialuronano por gramo de peso fresco, preferentemente como máximo 15.000 µg de hialuronano por gramo de peso fresco, de manera especialmente preferida como máximo 10.000 µg de hialuronano por gramo de peso fresco y lo más preferentemente como máximo 6.500 µg de hialuronano por gramo de peso fresco.

Se ha observado que, durante el tiempo de desarrollo, el hialuronano se acumula en el tejido vegetal. Por

consiguiente, se ha de determinar la cantidad de hialuronano con respecto al peso fresco o con respecto al peso seco en las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o en las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, prefiriéndose particularmente durante la cosecha o (uno o dos) días antes de la recolección de las células vegetales en cuestión o de las plantas en cuestión. En el presente documento, se hace uso, en particular, de material vegetal (por ejemplo, tubérculos, semillas, hojas) con respecto a la cantidad de hialuronano que se vaya a usar para su posterior procesamiento.

Las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención que sintetizan hialuronano se pueden identificar mediante el aislamiento del hialuronano que es sintetizado por las mismas y la demostración de su estructura. Dado que el tejido de la planta tiene la ventaja de que no contiene hialuronidasas, se puede usar un procedimiento de aislamiento simple y rápido para confirmar la presencia de hialuronano en las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención. Con este fin, se añade agua al tejido vegetal que se va a examinar y, a continuación, se tritura mecánicamente el tejido vegetal (con la ayuda de, por ejemplo, un molino de bolas, un molino de batidor, un mezclador Waring, un extractor de zumo, etc.). Si es necesario, luego se puede añadir más agua a la suspensión, y después se eliminan los restos celulares y los componentes insolubles en agua por centrifugación o tamizado. Después, se puede demostrar la presencia de hialuronano en el sobrenadante obtenido tras la centrifugación usando, por ejemplo, una proteína que se una específicamente al hialuronano. Un procedimiento de detección de hialuronano con la ayuda de una proteína que se una específicamente al hialuronano se describe, por ejemplo, en el documento US 5.019.498. Los kit de ensayo (por ejemplo, el kit de ensayo de ácido hialurónico (HA) de Corgenix, Inc., Colorado, EE.UU., N° de prod. 029-001); véase también el punto 4 del apartado de Procedimientos generales). En paralelo, es posible digerir inicialmente una parte alícuota del sobrenadante de centrifugación obtenido con una hialuronidasa y luego confirmar la presencia de hialuronano con la ayuda de una proteína que se una específicamente al hialuronano, como se describe anteriormente. Mediante la acción de la hialuronidasa en el lote paralelo, el hialuronano presente en la misma se degrada, de modo que tras la digestión completa ya no es posible detectar cantidades significativas de hialuronano. Además, también se puede confirmar la presencia de hialuronano en el sobrenadante de la centrifugación usando otros procedimientos de análisis tales como, por ejemplo, IR, RMN o espectroscopia de masas.

La sobreexpresión, en el maíz, de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT condensada traduccionalmente con un péptido señal plastídico produce un aumento del contenido de UDP-glucosamina, y la sobreexpresión citosólica, en el maíz, de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT produce un aumento del contenido de glucosamina 1-fosfato en el tejido endospermico triturado. Sin embargo, la UDP-glucosamina y la glucosamina 1-fosfato no son sustratos para la síntesis de hialuronano por la hialuronano sintasa. Además, se sabe que la glucosamina tiene un efecto citotóxico sobre las células vegetales (Roberts *et al.*, 1971, *Plant Physiol.* 48, 36-42) y que, si hay concentraciones relativamente altas en las células vegetales, se convierte en glucosamina 6-fosfato. Asimismo, la glucosamina-6-fosfato es tóxica para las células vegetales. (WO 98 35047, US 6.444.878). Además, se sabe que las proteínas que tienen la actividad de una GFAT pueden ser reguladas de una manera inhibitoria por los metabolitos que se forman en la ruta metabólica posterior para la síntesis de UDP-N-acetil-glucosamina. Las proteínas que tienen la actividad de una GFAT, aisladas de eucariotas (tanto con organismos animales como vegetales) son inhibidas, por ejemplo, por la UDP-N-acetil-glucosamina, que es uno de los dos sustratos para la hialuronano sintasa (Kornfeld, 1967, *J. Biol. Chem.* 242(13), 3135-3141; Graack *et al.*, 2001, *Biochem. J.* 360, 401-412; Mayer *et al.*, 1968, *Plant Physiol.* 43, 1097-1107). Las proteínas bacterianas que tienen la actividad de una GFAT son inhibidas por la glucosamina-6-fosfato, un producto de reacción directa de la reacción catalizada por GFAT ((Deng *et al.*, 2005, *Metabolic Engineering* 7, 201-214). No hay indicios en la literatura de lo que puede limitar la cantidad de hialuronano sintetizado en las células vegetales. Por consiguiente, sorprendentemente, se ha encontrado que las células vegetales modificadas genéticamente o las plantas modificadas genéticamente que tienen una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa y que tienen una actividad de GFAT más aumentada en comparación con las células vegetales modificadas genéticamente o las plantas modificadas genéticamente que (solo) tienen la actividad de hialuronano sintasa producen cantidades significativamente altas de hialuronano.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o a plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, caracterizadas porque producen una mayor cantidad de hialuronano en comparación con las células vegetales modificadas genéticamente o en comparación con las plantas modificadas genéticamente que (solo) tienen la actividad de una hialuronano sintasa o en comparación con las células vegetales modificadas genéticamente o en comparación con las plantas modificadas genéticamente que tienen la actividad de un hialuronano sintasa y no una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad de una GFAT.

En el contexto de la presente invención, la expresión "célula vegetal o planta que (solo) tiene la actividad de una hialuronano sintasa" se ha de entender en el sentido de una célula vegetal modificada genéticamente o de una planta modificada genéticamente 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 de tipo natural no modificadas genéticamente o las plantas de tipo natural no modificadas genéticamente correspondientes. En particular, las "células vegetales o plantas que (solo) tienen la actividad de una hialuronano sintasa" se caracterizan porque sintetizan hialuronano y no tienen modificaciones genéticas adicionales distintas de la introducción de una

molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa en células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente o plantas de tipo natural no modificadas genéticamente. Preferentemente, dichas plantas no tienen una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad de una GFAT.

5 La cantidad de hialuronano producida por las células vegetales o plantas se puede determinar con la ayuda de los procedimientos que ya se han descrito anteriormente, por ejemplo, usando un kit de ensayo comercial (por ejemplo, el kit de ensayo de ácido hialurónico (HA) de Corgenix, Inc., Colorado, EE.UU., N° de producto 029-001). En el punto 4 del apartado de Procedimientos generales, 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.

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

En el contexto de la presente invención, la expresión "planta terrestre verde (embriofita)" ha de entenderse como se define en Strasburger, "Lehrbuch der Botanik" [Libro de texto de botánica], XXXIV ed., Spektrum Akad. Verl., 1999, (ISBN 3-8274-0779-6).

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

20 Las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención pueden ser, en principio, células vegetales y plantas, respectivamente, de cualquier especie de planta, es decir, plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Se trata preferentemente de plantas de cultivo, es decir, plantas cultivadas por el ser humano con el fin de alimentar a seres humanos y animales o para la producción de biomasa y/o la preparación de sustancias para fines técnicos, industriales (por ejemplo maíz, arroz, trigo, alfalfa, centeno, avena, cebada, yuca, patata, tomate, pasto alto  
25 (*Panicum virgatum*), sagú, frijol mungo, pas, sorgo, zanahoria, berenjena, rábano, colza, soja, cacahuate, pepino, calabaza, melón, puerro, ajo, coles, espinaca, patata dulce, espárrago, calabacín, lechuga, alcachofa, maíz dulce, chirivía, escorzonera, alcachofa de Jerusalén, plátano, remolacha azucarera, caña de azúcar, remolacha, brócoli, repollo, cebolla, remolacha amarilla, diente de león, fresa, manzana, albaricoque, ciruela, durazno, vid, coliflor, apio, pimienta, colinabo, ruibarbo). Se prefieren particularmente las plantas de arroz, tomate o patata.

30 En una realización preferida, la presente invención se refiere a células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o plantas modificadas genéticamente 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 viral. La molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa codifica preferentemente una hialuronano sintasa de un virus que infecta algas. Con respecto a un virus que infecta algas, la molécula de ácido nucleico que codifica una  
35 hialuronano sintasa codifica preferentemente una hialuronano sintasa de un virus que infecta al género *Chlorella*, de manera particularmente preferida una hialuronano sintasa de un Virus 1 de *Chlorella* de *Paramecium bursaria* y de manera especialmente preferida una hialuronano sintasa de un virus de *Chlorella* de *Paramecium bursaria* de una cepa H1.

40 En una realización preferida adicional, la presente invención se refiere a células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención en las que la molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa se caracteriza porque los codones de la molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa están modificados en comparación con los codones de la molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa del organismo del que procede la hialuronano sintasa. Con particular preferencia, los codones de la hialuronano sintasa se han modificado de manera que se  
45 adaptan a la frecuencia de uso de los codones de la célula vegetal o la planta en cuyo genoma se integran o se van a integrar.

Debido a la degeneración del código genético, los aminoácidos pueden ser codificados por uno o más codones. En los distintos organismos, los codones que codifican un aminoácido se usan en diferentes frecuencias. La adaptación del codón de una secuencia de ácido nucleico codificante a la frecuencia de uso en la célula vegetal o en la planta  
50 en cuyo genoma se va a integrar la secuencia que debe expresarse puede contribuir a una mayor cantidad de proteína traducida y/o a la estabilidad del ARNm en cuestión en las células vegetales o plantas en particular. La frecuencia de uso de los codones en las células vegetales o las plantas en cuestión puede ser determinada por el experto en la materia mediante el examen de la mayor cantidad de secuencias de ácidos nucleicos codificantes del organismo en cuestión que sea posible para la frecuencia con que ciertos codones se usan para la codificación de un determinado aminoácido. La frecuencia de uso de los codones de ciertos organismos es conocida por el experto en la materia, y se puede determinar de una manera sencilla y rápida usando programas informáticos. Los programas informáticos adecuados son de acceso público y gratuitos entre otros a través de Internet (por ejemplo, <http://gcua.schoedl.de/>; <http://www.kazusa.or.jp/codon/>; <http://www.entelechon.com/eng/cutanalysis.html>). La adaptación de los codones de una secuencia de ácido nucleico codificante a la frecuencia de uso en la célula  
55

vegetal o en la planta en cuyo genoma se va a integrar la secuencia que debe expresarse se puede llevar a cabo mediante mutagénesis *in vitro* o, preferentemente, mediante síntesis *de novo* de la secuencia del gen. Los procedimientos para la síntesis *de novo* de secuencias de ácidos nucleicos son conocidos por el experto en la materia. Se puede llevar a cabo una síntesis *de novo*, por ejemplo, sintetizando inicialmente oligonucleótidos de ácidos nucleicos individuales, hibridándolos con los oligonucleótidos complementarios de los mismos, de modo que formen una doble cadena de ADN, y después ligando los oligonucleótidos de doble hebra individuales de manera que se obtenga la secuencia de ácido nucleico deseada. La síntesis *de novo* de secuencias de ácidos nucleicos que incluyen la adaptación de la frecuencia con la que los codones se usan para un determinado organismo diana también se puede adquirir en empresas que ofrecen este servicio (por ejemplo, Entelechon GmbH, Regensburg, Alemania).

La molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa se caracteriza preferentemente porque codifica una hialuronano sintasa cuya secuencia de aminoácidos es al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, con preferencia al menos un 90 %, de manera especialmente preferida al menos un 95 % y lo más preferentemente al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2. En una realización particularmente preferida, la molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa se caracteriza porque codifica una hialuronano sintasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2.

En una realización adicional, la molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa es al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, con preferencia al menos un 90 %, de manera especialmente preferida al menos un 95 % y lo más preferentemente al menos un 98 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 3. En una realización particularmente preferida, la molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa se caracteriza porque tiene la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 3.

El 25 de agosto de 2004, el plásmido IC 341-222, que comprende una molécula de ácido nucleico sintética que codifica una hialuronano sintasa del virus de *Paramecium bursaria* del género *Chlorella* fue depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Brunswick, Alemania, bajo el número DSM16664, de acuerdo con el Tratado de Budapest. La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2 se puede derivar de la región que codifica la secuencia de ácido nucleico integrada en el plásmido IC 341-222 y codifica una hialuronano sintasa del virus de *Paramecium bursaria* del género *Chlorella*.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención en las que la molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa se caracteriza porque codifica una proteína cuya secuencia de aminoácidos se puede derivar de la región que codifica la secuencia de ácido nucleico insertada en el plásmido DSM16664 o que codifica una proteína cuya secuencia de aminoácidos es al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, con preferencia al menos un 90 %, de manera especialmente preferida al menos un 95 % y lo más preferentemente al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se puede derivar de la región que codifica la secuencia de ácido nucleico insertada en el plásmido DSM16664.

La presente invención también se refiere a células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención 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 un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, con preferencia al menos un 90 %, de manera especialmente preferida al menos un 95 % y lo más preferentemente al menos un 98 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico integrada en el plásmido DSM16664.

La presente invención se refiere además a células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o a plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención que se caracterizan porque tienen una molécula de ácido nucleico foránea integrada de manera estable en su genoma, aumentando dicha molécula de ácido nucleico foránea la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente o las plantas correspondientes de tipo natural no modificadas genéticamente.

En el contexto de la presente invención, la expresión "molécula de ácido nucleico foránea" se ha de entender en el sentido de una molécula que bien no se produce de manera natural en las células vegetales de tipo natural correspondientes o que no se produce de manera natural en la disposición espacial concreta de las células vegetales de tipo natural o que se encuentra en un sitio del genoma de la célula vegetal de tipo natural en el que no se produce de forma natural. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico foránea es una molécula recombinante que comprende diversos elementos cuya combinación o disposición espacial específica no se produce de manera natural en las células vegetales.

En el contexto de la presente invención, la expresión "molécula de ácido nucleico recombinante" se ha de entender en el sentido de una molécula de ácido nucleico que tiene diversas moléculas de ácido nucleico que no están presentes de forma natural en una combinación como la presente en una molécula de ácido nucleico recombinante. Por lo tanto, las moléculas de ácidos nucleicos recombinantes pueden tener, además de moléculas de ácido

nucleico que codifican una hialuronano sintasa y/o una proteína que tiene la actividad de una GFAT, secuencias de ácidos nucleicos que no estén presentes de forma natural en combinación con las moléculas de ácido nucleico mencionadas. Las secuencias de ácido nucleico adicionales mencionadas que están presentes en una molécula de ácido nucleico recombinante en combinación con una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa o una proteína que tiene la actividad de una GFAT pueden ser cualquier secuencia. Por ejemplo, pueden ser secuencias de ácido nucleico de plantas genómicas. Las secuencias de ácidos nucleicos adicionales son preferentemente secuencias reguladoras (promotores, señales de terminación, potenciadores), prefiriéndose particularmente las secuencias reguladoras que son activas en el tejido vegetal, prefiriéndose especialmente las secuencias reguladoras específicas del tejido que son activas en el tejido vegetal. Los procedimientos de generación de moléculas de ácido nucleico recombinantes son conocidos por el experto en la materia, y comprenden procedimientos de ingeniería genética tales como, por ejemplo, la vinculación de las moléculas de ácido nucleico mediante ligadura, la recombinación genética o la síntesis *de novo* de moléculas de ácido nucleico (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", III edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel *et al.*, "Short Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons; V Edición (2002), ISBN: 0471250929).

Las células vegetales modificadas genéticamente y las plantas modificadas genéticamente que tienen una molécula de ácido nucleico foránea integrada de forma estable en su genoma o una pluralidad de moléculas de ácido nucleico foráneas 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 en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente o plantas de tipo natural no modificadas genéticamente se pueden distinguir de dichas células vegetales de tipo natural y dichas plantas de tipo natural, respectivamente, entre otras cosas, por el hecho de que comprenden una molécula de ácido nucleico foránea que no se produce de forma natural en las células vegetales de tipo natural y plantas de tipo natural, respectivamente, o en que dicha molécula se integra en un sitio del genoma de la célula vegetal modificada genéticamente de acuerdo con la invención o del genoma de la planta modificada genéticamente de acuerdo con la invención en el que no se producen en las células vegetales de tipo natural y plantas de tipo natural, respectivamente, es decir, en un ambiente genómico diferente. Además, dichas células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención y plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención se pueden distinguir de las células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente y de las plantas de tipo natural no modificadas genéticamente, respectivamente, en que comprenden al menos una copia de la molécula de ácido nucleico foránea integrada de forma estable en su genoma, si procede, además de copias de dicha molécula presente de forma natural en las células vegetales de tipo natural o plantas de tipo natural. Si la/s molécula/s de ácido nucleico foránea/s introducida/s en las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o en la planta modificada genéticamente de acuerdo con la invención son copias adicionales de moléculas ya presentes de forma natural en las células vegetales de tipo natural o las plantas de tipo natural, las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención y las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención se pueden distinguir de las células vegetales de tipo natural y de las plantas de tipo natural, respectivamente, en particular, por el hecho de que esta/s copia/s adicional/es se encuentra/n en sitios del genoma en los que está/n presente/s en las células vegetales de tipo natural y las plantas de tipo natural, respectivamente. La integración estable de una molécula de ácido nucleico en el genoma de una célula vegetal o una planta se puede demostrar 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 en 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 parental. 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 se puede demostrar usando procedimientos conocidos por el experto en la materia, entre otros, con ayuda del análisis de transferencia Southern del análisis RFLP (polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción) (Nam *et al.*, 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 en la longitud de los fragmentos amplificados (polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados, AFLP) (Castiglioni *et al.*, 1998, "Genetics" 149, 2039-2056; Meksem *et al.*, 2001, "Molecular Genetics and Genomics" 265, 207-214; Meyer *et al.*, 1998, "Molecular and General Genetics" 259, 150-160) o usando fragmentos amplificados escindidos usando endonucleasas de restricción (secuencias polimórficas amplificadas escindidas, CAPS) (Konieczny y Ausubel, 1993, "The Plant Journal" 4, 403-410; Jarvis *et al.*, 1994, "Plant Molecular Biology" 24, 685-687; Bachem *et al.*, 1996, "The Plant Journal" 9(5), 745-753).

En principio, la molécula de ácido nucleico foránea puede ser cualquier molécula de ácido nucleico que aumente, en la célula vegetal o la planta, la actividad de una proteína que tenga la actividad de una GFAT.

En el contexto de la presente invención, las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención y las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención también se pueden preparar mediante el uso de mutagénesis de inserción (revisión: Thomeycroft *et al.*, 2001, "Journal of experimental Botany" 52 (361), 1593-1601). En el contexto de la presente invención, la mutagénesis de inserción se ha de entender en el sentido de, en particular, la inserción de transposones o ADN de transferencia (ADN-T) en un gen o en las proximidades de un gen que codifique una proteína que tenga la actividad de una GFAT, aumentando así la actividad de una proteína que tenga la actividad de una GFAT en la célula en cuestión. Los transposones pueden

ser bien transposones que se dan de forma natural en la célula (transposones endógenos) o aquellos que no están presentes de forma natural en dicha célula, sino que se introdujeron en la célula mediante ingeniería genética tal como, por ejemplo, la transformación de la célula (transposones heterólogos). La modificación de la expresión de genes por transposones es conocida por el experto en la materia. En Ramachandran y Sundaresan (2001, "Plant Physiology and Biochemistry", 39, 234-252), se ofrece una revisión del uso de transposones endógenos y heterólogos como herramientas en la Biotecnología vegetal. La mutagénesis de inserción de ADN-T se basa en el hecho de que ciertas secciones (ADN-T) de plásmidos de *Agrobacterium* se pueden integrar en el genoma de células vegetales. El sitio de integración en el cromosoma de la planta no está predeterminado, pudiendo ser la integración en cualquier ubicación. Si el ADN-T se integra en una sección o en la proximidad de una sección del cromosoma que representa una función de genes, esto puede generar un aumento de la expresión génica y, por lo tanto, también un cambio en la actividad de la proteína codificada por el gen en cuestión. Las secuencias insertadas en el genoma (en particular, los transposones o el ADN-T) se caracterizan porque comprenden secuencias que dan lugar a la activación de las secuencias reguladoras de un gen que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT ("marcaje de activación"). Preferentemente, las secuencias insertadas en el genoma (en particular, los transposones o el ADN-T) se caracterizan porque se integran en las proximidades de moléculas de ácido nucleico endógeno del genoma de la célula vegetal o de la planta que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT.

Las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención y las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención se pueden generar, por ejemplo, usando el procedimiento de marcaje de activación (véase, por ejemplo, Walden *et al.*, *Plant J.* (1991), 281-288; Walden *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 26 (1994), 1521-1528). Este procedimiento se basa en la activación de promotores endógenos por secuencias potenciadoras tales como, por ejemplo, el potenciador del promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor o el promotor de la octopina sintasa.

En el contexto de la presente invención, la expresión "marcaje de activación de ADN-T" se ha de entender en el sentido de un fragmento de ADN-T que comprende secuencias potenciadoras y que, mediante la integración en el genoma de una célula vegetal, aumenta la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT.

En el contexto de la presente invención, la expresión "marcaje de activación de transposón" se ha de entender en el sentido de un transposón que comprende secuencias potenciadoras y que, mediante la integración en el genoma de una célula vegetal, aumenta la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o a plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, que se caracterizan porque al menos una molécula de ácido nucleico foránea codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT.

Una realización particularmente preferida de la presente invención se refiere a células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o a plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, que se caracterizan porque una molécula de ácido nucleico foránea codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT.

De acuerdo con la invención, la molécula de ácido nucleico foránea que codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT puede proceder de cualquier organismo. Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico procede de bacterias, hongos, animales, plantas o virus, de manera particularmente preferida de mamíferos, plantas o bacterias, y de manera especialmente preferida del ratón o de *Escherichia coli*. Con respecto a los virus, la molécula de ácido nucleico foránea que codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT procede preferentemente de un virus que infecta algas, con preferencia de un virus que infecta algas del género *Chlorella*, de forma especialmente preferida de un virus de *Paramecium bursaria* de *Chlorella* y de forma especialmente preferida de un virus de *Paramecium bursaria* de *Chlorella* de una cepa H1. En lugar de la molécula de ácido nucleico natural que codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT, también es posible la introducción de una molécula de ácido nucleico generada por mutagénesis en las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, donde dicha molécula de ácido nucleico foránea mutagenizada se caracteriza porque codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT con la inhibición reducida 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 *et al.* (2005, *Metabolic Engineering* 7, 201-214; WO 04 003175). Por ejemplo, en Hu *et al.* (2004, *J. Biol. Chem.* 279 (29), 29988-29993), se describen los mutantes de una proteína que tiene la actividad de una GFAT del ratón.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT son conocidas por el experto en la materia, y se describen en la literatura. Por lo tanto, se describen moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT de virus, por ejemplo, para el virus k2 de *Chlorella* (Nº de acceso de EMBL AB107976.1), de bacterias, por ejemplo, para *Escherichia coli* (Dutka-Malen, 1988, *Biochimie* 70 (2), 287-290; Nº de acceso de EMBL L10328.1), de hongos, por ejemplo, para *Saccharomyces cerevisiae* (Nº de

- acceso de EMBL AF334737.1, Watzel *et al.*, 1989, *J. Biol. Chem.* 264, 8753-8758), *Aspergillus niger* (Nº de acceso de EMBL AY594332.1), *Candida albicans* (Nº de acceso de EMBL X94753.1), de insectos, por ejemplo, para *Aedes aegypti* (Kato *et al.*, 2002, *Insect. Biol.* 11 (3), 207,216; Nº de acceso de EMBL AF399922.1), *Drosophila melanogaster* (GFAT-1: Nº de acceso de EMBL Y18627.1, GFAT-2: Nº de acceso de EMBL NM\_143360.2), de algas para *Volvariella volvacea* (Nº de acceso de EMBL AY661466.1), de vertebrados, por ejemplo, para *Homo sapiens* (GFAT-1: Nº de acceso de EMBL AF334737.1; GFAT-2: Nº de acceso de NCBI BC000012.2, Oki *et al.*, 1999, *Genomics* 57 (2),227-34), *Mus musculus* (GFAT-1: Nº de acceso de EMBL AF334736.1; GFAT-2: Nº de acceso de EMBL AB016780.1) o de plantas, por ejemplo, para *Arabidopsis thaliana* (Nº de acceso de EMBL AP001297.1; Nº de acceso de cads NCBI BAB03027.1)
- 5 En una realización preferida, la presente invención se refiere a células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención y a plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención en las que la molécula de ácido nucleico foránea que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT se selecciona del grupo que consiste en:
- 15 a) moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos dada en SEC ID Nº 5 o una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos dada en SEC ID Nº 7 o una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos dada en SEC ID Nº 9;
- 20 b) moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína cuya secuencia es al menos un 60 %, preferentemente al menos un 80 %, con preferencia al menos un 90 %, de manera especialmente preferida al menos un 95 % y lo más preferentemente al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos dada en SEC ID Nº 5, en SEC ID Nº 7 o en SEC ID Nº 9;
- 25 c) moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID Nº 4 o una secuencia complementaria a la misma, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID Nº 6 o una secuencia complementaria a la misma, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID Nº 8 o una secuencia complementaria a la misma o la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID Nº 10 o una secuencia complementaria a la misma;
- 30 d) moléculas de ácido nucleico que son al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, con preferencia al menos un 90 %, de manera especialmente preferida al menos un 95 % y lo más preferentemente al menos un 98 % idénticas a las secuencias de ácido nucleico descritas en a) o c);
- e) moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas con al menos una hebra de las secuencias de ácido nucleico descritas en a) o c);
- 35 f) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos difiere de la secuencia de las moléculas de ácido nucleico mencionadas en a) o c) debido a la degeneración del código genético; y
- g) moléculas de ácido nucleico que son fragmentos, variantes alélicas y/o derivados de las moléculas de ácido nucleico mencionadas en a), b), c), d), e) o f).
- 40 En el contexto de la presente invención, el término "hibridación" significa una hibridación en condiciones de hibridación convencionales, preferentemente en condiciones rigurosas, como se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", II ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Con particular preferencia, "hibridación" significa una hibridación en las siguientes condiciones: 2 x SSC; 10 x solución de Denhardt (Fikoll 400 + PEG + BSA; proporción 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 µg/ml de ARNt; o tampón de fosfato de sodio 25 M, pH 7,2; EDTA 1 mM; SDS al 7 %. Temperatura de hibridación: T = 65 a 68 °C.
- Tampón de lavado: 0,1 x SSC; SDS al 0,1 %.  
Temperatura de lavado: T = 65 a 68 °C.
- 45 Las moléculas de ácido nucleico que se hibridan con las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT pueden proceder de cualquier organismo. Por consiguiente, pueden proceder de bacterias, hongos, animales, plantas o virus. Las moléculas de ácido nucleico que se hibridan con moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína que tiene la actividad de una GFAT proceden de manera particularmente preferida de mamíferos, plantas o bacterias, y de manera especialmente preferida del ratón o *Escherichia coli*. Las moléculas de ácido nucleico que se hibridan con moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 o una GFAT-2 proceden preferentemente de un organismo eucariota, en particular proceden preferentemente de un organismo animal, de manera especialmente preferida del ratón. Las moléculas de ácido nucleico que se hibridan con las moléculas mencionadas se pueden aislar, por ejemplo, de bibliotecas de ADNc o genómicas. Dichas moléculas de ácido nucleico se pueden identificar y aislar usando las moléculas de ácido nucleico mencionadas o partes de estas moléculas o los complementos inversos de estas moléculas, por ejemplo, por hibridación de acuerdo con procedimientos convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", II ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) o por amplificación usando PCR. Como muestra de hibridación para aislar una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de un GFAT o la actividad de una GFAT-1 o la actividad de una GFAT-2, es posible usar, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico que tienen exactamente o esencialmente la secuencia de nucleótidos dada en SEC ID Nº 4 o en SEC ID Nº 6 o en SEC ID Nº 8 o en SEC ID Nº 10, o partes de estas secuencias. Los fragmentos usados como muestras de hibridación también pueden ser fragmentos sintéticos u oligonucleótidos preparados usando las técnicas de síntesis habituales, cuya secuencia es esencialmente idéntica a

la molécula de ácido nucleico descrita en el contexto de la presente invención. Una vez identificados y aislados los genes que se hibridan con las secuencias de ácido nucleico descritas en el contexto de la presente invención, se ha de determinar la secuencia y se han de analizar las propiedades de las proteínas codificadas por esta secuencia para determinar si son proteínas que tienen la actividad de una GFAT. Los procedimientos de cómo determinar si una proteína tiene la actividad de una proteína que tiene la actividad de una GFAT (por ejemplo, Mayer *et al.*, 1968, *Plant Physiol.* 43, 1097-1107; Deng *et al.*, 2005, *Metabolic Engineering* 7, 201-214), una GFAT-1 o una GFAT-2 (por ejemplo, Hu *et al.*, 2004, *J. Biol. Chem.* 279 (29), 29988-29993) son conocidos por los expertos en la materia y se describen, entre otros, en la bibliografía mencionada. Las moléculas que se hibridan con las moléculas de ácido nucleico descritas en el contexto de la presente invención comprenden, en particular, fragmentos, derivados y variantes alélicas de las moléculas de ácido nucleico 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 ácido nucleico descritas anteriormente y son altamente idénticas a estas secuencias. Las diferencias con las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente se pueden deber, por ejemplo, a la eliminación (en particular, eliminaciones en 5' o 2', que conducen a eliminaciones N- y/o C-terminales de la correspondiente proteína), adición, sustitución, inserción o recombinación.

En el contexto de la presente invención, el término "identidad" significa una identidad de secuencia en toda la longitud de la región que codifica una molécula de ácido nucleico o toda la longitud de una secuencia de aminoácidos que codifica una proteína de al menos un 60 %, en particular una identidad de al menos un 70 %, preferentemente de al menos un 80 %, de manera particularmente preferida de al menos un 90 % y de manera especialmente preferida de al menos un 95 % y lo más preferentemente de al menos un 98 %. En el contexto de la presente invención, el término "identidad" se ha de entender en el sentido del número de aminoácidos/nucleótidos idénticos (identidad) con otras proteínas/ácidos nucleicos, expresados en porcentaje. Preferentemente, la identidad con respecto a una proteína que tiene la actividad de una GFAT se determina mediante la comparación con la secuencia de aminoácidos dada en SEC ID N° 5 o SEC ID N° 7 o SEC ID N° 9, y la identidad con respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT se determina mediante la comparación con la secuencia de ácido nucleico dada en SEC ID N° 4 o SEC ID N° 6 o SEC ID N° 8 o SEC ID N° 10 con otras proteínas/ácidos nucleicos con ayuda de programas informáticos. Si las secuencias que se comparan entre sí son de diferentes longitudes, la identidad se debe determinar mediante la determinación de la identidad en porcentaje del número de aminoácidos que la secuencia más corta comparte con la secuencia más larga. Preferentemente, la identidad se determina usando el programa informático conocido y a disposición del público en general ClustalW (Thompson *et al.*, "Nucleic Acids Research" 22 (1994), 4673-4680). ClustalW es puesto a disposición del público en general por Julie Thompson ([Thompson@EMBL-Heidelberg.DE](mailto:Thompson@EMBL-Heidelberg.DE)) y Toby Gibson ([Gibson@EMBL-Heidelberg.DE](mailto:Gibson@EMBL-Heidelberg.DE)), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Alemania. ClustalW también se puede descargar en diversas páginas de Internet, entre otras, de IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, Francia; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/>) y de EBI (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>) y todas las páginas de Internet especulares del EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, RU). Preferentemente, 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. En este caso, los parámetros se tienen que establecer de la siguiente manera: KTUPLE = 1, TOPDIAG = 5, PAIRGAP = 3, GAPOPEN = 10, GAPEXTEND = 0,05, GAPDIST = 8, MAXDIV = 40, MATRIX = GONNET, ENDGAPS(OFF), NOGAP, NOHGAP. Preferentemente, se hace uso del programa informático ClustalW de la versión 1.8 para determinar la identidad, por ejemplo, entre la secuencia de nucleótidos de las moléculas de ácido nucleico descritas en el contexto de la presente invención y la secuencia de nucleótidos de otras moléculas de ácido nucleico. En este caso, los parámetros se tienen que establecer de la siguiente manera:

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

Identidad significa además que existe una equivalencia funcional y/o estructural entre las moléculas de ácido nucleico en cuestión o las proteínas codificadas por las mismas. Las moléculas de ácido nucleico 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 variaciones de origen natural, por ejemplo, secuencias de otras especies o mutaciones, pudiendo haber ocurrido estas mutaciones de un modo natural o ser introducidas por mutagénesis dirigida. Además, las variaciones pueden ser secuencias producidas sintéticamente. Las variantes alélicas pueden ser bien variantes naturales o variantes producidas sintéticamente o variantes generadas mediante técnicas de ADN recombinante. Una forma especial de derivados son, por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico que difieren de las moléculas de ácido nucleico descritas en el contexto de la presente invención debido a la degeneración del código genético.

Los diversos derivados de las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT tienen ciertas características comunes. Estas pueden ser, por ejemplo, actividad biológica, especificidad de sustrato, peso molecular, reactividad inmunológica, configuración, etc., y también propiedades físicas tales como, por ejemplo, las propiedades de movilidad en electroforesis sobre gel, comportamiento cromatográfico, coeficientes de sedimentación, solubilidad, propiedades espectroscópicas, estabilidad, pH óptimo, temperatura óptima, etc. Las propiedades preferidas de proteínas que tienen la actividad de una GFAT son conocidas por el experto en la

materia, ya se han mencionado anteriormente y son de aplicación en el presente documento de una manera análoga.

En una realización preferida adicional, la presente invención se refiere a células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o a plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención en las que las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT se caracterizan porque los codones de dichas moléculas de ácido nucleico son diferentes de los codones de las moléculas de ácido nucleico que codifican dicha proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT del organismo parental. De manera particularmente preferida, los codones de las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT se cambian, adaptándose, por tanto, a la frecuencia de uso de los codones de la célula vegetal o la planta en cuyo genoma se integran o se van a integrar.

La presente invención proporciona además células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención caracterizadas porque las moléculas de ácido nucleico foráneas integradas de forma estable en el genoma de la célula vegetal o de la planta que codifica una hialuronano sintasa y/o que codifica una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT están ligadas a elementos reguladores que inician la transcripción en células vegetales (promotores). Estas pueden ser promotores homólogos o heterólogos. Los promotores pueden ser constitutivos, específicos del tejido, específicos del desarrollo o regulados por factores externos (por ejemplo, tras la aplicación de sustancias químicas, por la acción de factores abióticos tales como el calor y/o el frío, corrientes de aire, enfermedad, etc.). En el presente documento, las moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronano sintasa o una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT, cuyas moléculas de ácido nucleico están integradas en el genoma de una célula vegetal modificada genéticamente de acuerdo con la invención o de una planta genéticamente modificada de acuerdo con la invención, se pueden ligar, en cada caso, al mismo promotor o las secuencias individuales se pueden ligar a promotores diferentes.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o a plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención en las que al menos una molécula de ácido nucleico foránea, de manera particularmente preferida al menos dos moléculas de ácido nucleico foráneas, de manera especialmente preferida tres moléculas de ácido nucleico foráneas seleccionadas del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronano sintasa o una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT está/n ligadas a un promotor específico del tejido. Los promotores específicos del tejido preferidos son promotores que inician la transcripción específicamente en células de tubérculos, frutos o semillas u hojas de plantas.

Para expresar moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronano sintasa o una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT, estas se ligan preferentemente a secuencias de ADN reguladoras que garantizan la transcripción en células vegetales. Se trata, en particular, de promotores. En general, cualquier promotor activo en células vegetales es adecuado para la expresión. En el presente documento, el promotor se puede seleccionar de manera que la expresión sea constitutiva o solo en un determinado tejido, en un determinado momento del desarrollo de la planta o en un punto temporal determinado por factores externos. Tanto en lo que respecta a la planta como en lo que respecta a la molécula de ácido nucleico que se va a expresar, el promotor puede ser homólogo o heterólogo. Los promotores adecuados son, por ejemplo, el promotor de 35S RNS del virus del mosaico de la coliflor o el promotor de ubiquitina del maíz o el YLCV de *Cestrum* (virus del enrollamiento foliar amarillo WO 01 73087; Stavolone *et al.*, 2003, *Plant Mol. Biol.* 53, 703-713) para una expresión constitutiva, el promotor del gen patatín B33, (Rocha-Sosa *et al.*, *EMBO J.* 8(1989), 23-29) para una expresión específica del tubérculo de la patata o un promotor específico del fruto del tomate tal como, por ejemplo, el promotor de poligalacturonasa del tomate (Montgomery *et al.*, 1993, *Plant Cell* 5, 1049-1062) o el promotor E8 del tomate (Metha *et al.*, 2002, *Nature Biotechnol.* 20(6), 613-618) el promotor de ACC oxidasa del melocotón (Moon y Callahan, 2004, *J. Experimental Botany* 55 (402), 1519-1528) o un promotor que garantiza la expresión únicamente en tejidos fotosintéticamente activos, por ejemplo, el promotor ST-LS1 (Stockhaus *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus *et al.*, *EMBO J.* 8 (1989), 2445-2451) o para una expresión específica del endospermo, el promotor HMWG del trigo, el promotor USP, el promotor de faseolina, los promotores de los genes de zeína del maíz (Pedersen *et al.*, *Cell* 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 15 (1990), 81-93), el promotor de glutelina (Leisy *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 14 (1990), 41-50; Zheng *et al.*, *Plant J.* 4 (1993), 357-366; Yoshihara *et al.*, *FEBS Lett.* 383 (1996), 213-218), el promotor shrunken-1 (Werr *et al.*, *EMBO J.* 4 (1985), 1373-1380), un promotor de globulina (Nakase *et al.*, 1996, *Gene* 170(2), 223-226) o un promotor de prolamina (Qu y Takaiwa, 2004, *Plant Biotechnology Journal* 2(2), 113-125). Sin embargo, también se pueden usar promotores que solo sean activados en un punto temporal determinado por factores externos (véase, por ejemplo, el documento WO 9307279). Pueden ser de particular interés en el presente documento los promotores de proteínas de choque térmico que permiten una inducción simple. Además, se pueden usar promotores específicos de semillas tales como, por ejemplo, el promotor USP de *Vicia faba*, que garantiza una expresión específica de la semilla en *Vicia faba* y otras plantas (Fiedler *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 22 (1993), 669-679; Baumlein *et al.*, *Mol. Gen.* 225 (1991), 459-467). El uso de promotores presentes en el genoma de los virus que infectan a las algas son también adecuados para la expresión de secuencias de ácidos nucleicos en plantas (Mitra *et al.*, 1994, *Biochem. Biophys Res Commun* 204(1), 187-194; Mitra y Higgins, 1994, *Plant Mol Biol* 26(1), 85-93; Van Etten *et al.*, 2002, *Arch Virol* 147, 1479-1516).

En el contexto de la presente invención, la expresión "específico del tejido" se ha de entender en el sentido de la limitación sustancial de una manifestación (por ejemplo, el inicio de la transcripción) a un determinado tejido.

En el contexto de la presente invención, la expresión "célula de tubérculo, fruto o semilla" se ha de entender en el sentido de todas las células presentes en un tubérculo, una fruta o una semilla.

5 En el contexto de la presente invención, la expresión "promotor homólogo" se ha de entender en el sentido de un promotor que está presente de forma natural en células vegetales o plantas usadas para la preparación de células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención (homólogo con respecto a la célula vegetal o la planta) o en el sentido de un promotor que regula la regulación de la expresión de un gen en el organismo a partir del cual se aisló la secuencia (homólogo con respecto a la molécula de ácido nucleico que se va a expresar).

10 En el contexto de la presente invención, la expresión "promotor heterólogo" se ha de entender en el sentido de un promotor que no está presente de forma natural en células vegetales o plantas que se usan para la preparación de células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención (heterólogo con respecto a la célula vegetal o planta) o en el sentido de un promotor que, en el organismo a partir del cual se aisló una secuencia de ácido nucleico que se va a expresar, no está presente de forma natural para la regulación de la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico (heterólogo con respecto a la molécula de ácido nucleico que se va a expresar).

15 También puede haber una secuencia de terminación (señal de poliadenilación) que sirva para añadir una cola poli-A a la transcripción. Se cree que la cola poli-A actúa en la estabilización de las transcripciones. Dichos elementos se describen en la bibliografía (cf. Gielen *et al.*, *EMBO J.* 8 (1989), 23-29) y se pueden intercambiar si se desea.

20 También es posible que haya secuencias de intrones entre el promotor y la región codificante. Dichas secuencias de intrones pueden conducir a la estabilidad de la expresión y a un aumento de la expresión en plantas (Callis *et al.*, 1987, *Genes Devel.* 25 1, 1183-1200; Luehrsen y Walbot, 1991, *Mol. Gen. Genet.* 225, 81-93; Rethmeier *et al.*, 1997; *Plant Journal* 12(4), 895-899; Rose y Beliakoff, 2000, *Plant Physiol.* 122 (2), 535-542; Vasil *et al.*, 1989. *Plant Physiol.* 91, 1575-1579; XU *et al.*, 2003, *Science in China Series C* Vol.46 N° 6, 561-569). Las secuencias de intrones adecuadas son, por ejemplo, el primer intrón del gen sh1 del maíz, el primer intrón del gen de la poli-ubiquitina 1 del maíz, el primer intrón del gen EPSPS del arroz o uno de los dos primeros intrones del gen PAT1 de *Arabidopsis*.

25 La presente invención también se refiere a plantas que comprenden células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención. Dichas plantas se pueden producir por la regeneración de las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención.

La presente invención también se refiere a partes procesables o consumibles de plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención que comprenden células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención.

30 En el contexto de la presente invención, la expresión "partes procesables" se ha de entender en el sentido de partes de plantas que se usan para la preparación de productos alimenticios o piensos, que se usan como una fuente de materias primas para los 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.

35 En el contexto de la presente invención, la expresión "partes consumibles" se ha de entender en el sentido de partes de plantas que sirven de alimento para el ser humano o que se usan como alimento para animales.

La presente invención también se refiere a un material de propagación de plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención que comprende una célula vegetal modificada genéticamente de acuerdo con la invención.

40 En el presente documento, la expresión "material de propagación" comprende aquellos componentes de la planta que son adecuados para la generación de la progenie a través de la vía vegetativa o generativa. Son adecuados para la propagación vegetativa, por ejemplo, los esquejes, los cultivos de callos, los rizomas o los tubérculos. Otro material de propagación incluye, por ejemplo, frutos, semillas, plántulas, protoplastos, cultivos celulares, etc. Preferentemente, el material de propagación adopta la forma de tubérculos, frutos o semillas.

45 En una realización adicional, la presente invención se refiere a partes de plantas cosechables de plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención tales como frutos, almacenamiento y otras raíces, flores, yemas, brotes, hojas o tallos, preferentemente semillas, frutos o tubérculos, comprendiendo estas partes cosechable células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención.

50 Preferentemente, la presente invención se refiere a 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.

55

En el contexto de la presente invención, la expresión "planta de patata" o "patata" se ha de entender en el sentido de especies de plantas del género *Solanum*, particularmente especies productoras de tubérculos del género *Solanum* y, en particular *Solanum tuberosum*.

5 En el contexto de la presente invención, la expresión "planta de tomate" o "tomate" se ha de entender en el sentido de especies de plantas del género *Lycopersicon*, en particular, *Lycopersicon esculentum*.

La ventaja adicional de la presente invención es que las partes cosechables, el material de propagación, las partes procesables o las partes consumibles de las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención comprenden más hialuronano que las plantas transgénicas que sintetizan hialuronano descritas en la literatura. Por consiguiente, las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención no solo son particularmente  
10 adecuadas para su uso como materia prima de la que se pueda aislar hialuronano, sino que también se pueden usar directamente como alimento/pienso o para la preparación de productos alimenticios/piensos que tengan un carácter profiláctico o terapéutico (por ejemplo, para la profilaxis de la osteoartritis, US 6.607.745). Dado que las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención tienen un contenido de hialuronano más elevado que las plantas descritas en la literatura, la preparación de dicho producto alimenticio/pienso requiere cantidades inferiores  
15 de partes cosechables, material de propagación, partes procesables o partes consumibles de las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención. Si se consumen partes consumibles de plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, por ejemplo, directamente en forma de un denominado "producto nutracéutico", es posible lograr un efecto positivo incluso mediante la ingestión de cantidades relativamente bajas de sustancia. Esto puede ser de particular importancia, entre otras cosas, en la producción de  
20 piensos para animales, ya que los alimentos para animales que tienen un contenido demasiado alto de componentes vegetales no son adecuados como piensos para diversas especies animales. En virtud de la alta capacidad del hialuronano para unirse al agua, las partes cosechables, el material de propagación, las partes procesables o las partes consumibles de las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención tienen además la ventaja de que se requieren menos espesantes en la producción de productos alimenticios/piensos solidificados. Así pues,  
25 por ejemplo, la producción de jalea requiere menos azúcar, lo que se asocia con un efecto positivo adicional sobre la salud. En la producción de alimentos/piensos que requieren la deshidratación del material vegetal crudo, la ventaja de usar partes cosechables, material de propagación, partes procesables o partes consumibles de las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención consiste en el hecho de que se tiene que eliminar menos agua del material vegetal en cuestión, lo que genera menores costes de producción y, debido a los procedimientos de preparación más suaves (por ejemplo, entrada de calor inferior y/o más breve), un alto valor nutritivo del producto alimenticio/pienso en cuestión. Así pues, por ejemplo, en la producción de la salsa de tomate, se ha de introducir menos energía para obtener la consistencia deseada.

La presente invención proporciona además un procedimiento de preparación de una planta que sintetiza hialuronano, que comprende:

35 a) modificar genéticamente una célula vegetal, comprendiendo la modificación genética las siguientes etapas i a ii:

- i) la introducción de una molécula de ácido nucleico foránea que codifica una hialuronano sintasa en la célula vegetal;
- 40 ii) la introducción de una modificación genética en la célula vegetal, dando lugar la modificación genética a un aumento de la actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente;

en el que las etapas i a ii se pueden llevar a cabo en cualquier orden, de forma individual, o se puede llevar a cabo cualquier combinación de las etapas i a ii de forma simultánea;

- b) regenerar una planta a partir de células vegetales de la etapa a);
- 45 c) generar, si es apropiado, otras plantas usando las plantas de acuerdo con la etapa b), siendo, si es apropiado, las células vegetales aisladas de plantas de acuerdo con la etapa b), y repitiéndose las etapas a) a c) del procedimiento hasta que se genere una planta que tenga una molécula de ácido nucleico foránea que codifique una hialuronano sintasa y que tenga una actividad aumentada de una proteína que tenga la actividad (enzimática) de una GFAT en comparación con las células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente correspondientes.
- 50

Preferentemente, la presente invención se refiere a procedimientos de preparación de una planta que sintetiza hialuronano, que comprenden:

55 a) modificar genéticamente una célula vegetal, comprendiendo la modificación genética las siguientes etapas i a ii en cualquier orden, o pudiéndose llevar a cabo cualquier combinación de las etapas i a ii de manera individual o simultánea:

- i) la introducción de una molécula de ácido nucleico foránea que codifica una hialuronano sintasa en la célula vegetal;
- ii) la introducción de una modificación genética en la célula vegetal, dando lugar la modificación genética a un

aumento de la actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente;

b) regenerar una planta a partir de células vegetales que comprenden la modificación genética de acuerdo con las etapas:

- 5 i) a) i  
ii) a) ii  
iii) a) i y a) ii;

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

- 10 i) b) i una modificación genética de acuerdo con la etapa a) ii;  
ii) b) ii una modificación genética de acuerdo con la etapa a) i;  
y regenerar una planta;

d) generar, si es apropiado, más plantas con ayuda de las plantas obtenidas de acuerdo con cualquiera de las etapas b) iii o c) i o c) ii.

15 Las modificaciones genéticas introducidas de acuerdo con la etapa a) en la célula vegetal, en principio, pueden ser cualquier tipo de modificación que produzca un aumento de la actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT.

20 La regeneración de las plantas de acuerdo con la etapa b) y, si es apropiado, con la etapa c) de los procedimientos de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo usando procedimientos conocidos para el experto en la materia (descritos, por ejemplo, en "Plant Cell Culture Protocols", 1999, editado por R. D. Hall, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2).

25 La generación de nuevas plantas (dependiendo del procedimiento de acuerdo con la etapa c) o la etapa d)) de los procedimientos de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo, por ejemplo, por propagación vegetativa (por ejemplo, mediante esquejes, tubérculos o por cultivo de callos y la regeneración de plantas intactas) o por propagación generativa. En este contexto, generalmente, la propagación generativa tiene lugar en condiciones controladas, es decir, se hibridan plantas seleccionadas con características específicas entre sí y se multiplican. La generación tiene lugar preferentemente de manera que las plantas adicionales (dependiendo del procedimiento generado de acuerdo con la etapa c) o la etapa d)) comprenden las modificaciones introducidas en las etapas anteriores.

30 En los procedimientos de acuerdo con la invención de preparación de plantas que sintetizan hialuronano, las modificaciones genéticas para la generación de las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención se pueden llevar a cabo simultáneamente o en etapas sucesivas. En el presente documento, es irrelevante si se usa el mismo procedimiento que para la modificación genética que introduce una molécula de ácido nucleico foránea que codifica una hialuronano sintasa en la célula vegetal para modificaciones genéticas sucesivas que den lugar a un aumento de la actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT.

35 En una realización adicional de los procedimientos de acuerdo con la invención para la preparación de una planta que sintetiza hialuronano, la modificación genética consiste en la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico foránea en el genoma de la célula vegetal, dando lugar a la presencia o la expresión de la/s molécula/s de ácido nucleico foránea/s a un aumento de la actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT en la célula vegetal.

40 Como ya se ha descrito anteriormente para las moléculas de ácido nucleico foráneas introducidas para la modificación genética en la célula vegetal o la planta, lo que se introduce en la etapa a) de los procedimientos de acuerdo con la invención de preparación de una planta que sintetiza hialuronano puede ser una molécula de ácido nucleico individual o una pluralidad de moléculas de ácido nucleico. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico foráneas que codifican una hialuronano sintasa y/o que codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT pueden estar presentes juntas en una sola molécula de ácido nucleico, o pueden estar presentes en moléculas de ácido nucleico separadas. Si las moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronano sintasa y que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT están presentes en una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, estas moléculas de ácido nucleico se pueden introducir simultáneamente o en etapas sucesivas en una célula vegetal.

50 Además, para introducir una molécula de ácido nucleico foránea en la práctica de los procedimientos de acuerdo con la invención de preparación de una planta que sintetiza hialuronano, es posible usar, en lugar de una célula vegetal de tipo natural o una planta de tipo natural, células mutantes o mutantes que se distinguen en que ya tienen un aumento de la actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de un GFAT. Si la célula mutante o el mutante ya tiene un aumento de la actividad de una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo natural o plantas de tipo natural, para llevar a cabo un procedimiento de acuerdo con la invención de producción de una planta que sintetice hialuronano basta con

55

introducir en dicha célula mutante o en dicho mutante una molécula de ácido nucleico foránea que codifique una hialuronano sintasa. Todo lo dicho anteriormente en relación con el uso de mutantes para la preparación de células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención se aplica de manera análoga en el presente documento.

5 En realizaciones preferidas, la presente invención se refiere a procedimientos de acuerdo con la invención de producción de una planta que sintetiza hialuronano, siendo la molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa de la etapa a) seleccionada del grupo que consiste en:

- a) moléculas de ácido nucleico caracterizadas porque codifican una hialuronano sintasa viral;
- 10 b) moléculas de ácido nucleico caracterizadas porque codifican una hialuronano sintasa de un virus que infecta a *Chlorella*;
- c) moléculas de ácido nucleico caracterizadas porque codifican una hialuronano sintasa de un Virus 1 de *Paramecium bursaria* de *Chlorella*;
- d) moléculas de ácido nucleico caracterizadas porque codifican una hialuronano sintasa de un Virus 1 de *Paramecium bursaria* de *Chlorella* de la cepa H1;
- 15 e) moléculas de ácido nucleico caracterizadas porque los codones de la molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa están modificados en comparación con los codones de la molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronano sintasa en el organismo parental de la hialuronano sintasa;
- f) moléculas de ácido nucleico caracterizadas porque los codones de la hialuronano sintasa han sido modificados para adaptarse a la frecuencia del uso de los codones de la célula vegetal o de la planta en cuyo genoma se van a integrar o están integrados;
- 20 g) moléculas de ácido nucleico caracterizadas porque codifican una hialuronano sintasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2 o que codifican una hialuronano sintasa cuya secuencia de aminoácidos es al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, de manera particularmente preferida al menos un 90 %, de manera especialmente preferida al menos un 95 % y lo más preferentemente al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO 2;
- 25 h) moléculas de ácido nucleico caracterizadas porque codifican una proteína cuya secuencia de aminoácidos se puede derivar de la región que codifica la secuencia de ácido nucleico insertada en el plásmido DSM16664 o que codifican una proteína cuya secuencia de aminoácidos es al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, en particular preferentemente al menos un 90 %, de manera especialmente preferida al menos un 95 % y lo más preferentemente al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se puede derivar de la región que codifica la secuencia de ácido nucleico insertada en el plásmido DSM16664;
- 30 i) moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 3, o que son al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, con preferencia al menos un 90 %, de manera especialmente preferida al menos un 95 % y lo más preferentemente al menos un 98 % idénticas a la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 3;
- 35 j) moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de ácido nucleico insertada en el plásmido DSM16664 o que son al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, con preferencia al menos un 90 %, de manera especialmente preferida al menos un 95 % y lo más preferentemente al menos un 98 % idénticas a la secuencia de ácido nucleico insertada en el plásmido DSM16664;
- 40 k) moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronano sintasa, donde las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la hialuronano sintasa están ligadas a elementos reguladores (promotor) que inician la transcripción en células vegetales; o
- l) moléculas de ácido nucleico de acuerdo con k), donde los promotores son promotores específicos del tejido, en particular preferentemente promotores que inician la iniciación de la transcripción específicamente en las células de tubérculo, fruto o semilla de la planta.
- 45

En realizaciones preferidas, la presente invención se refiere a procedimientos de acuerdo con la invención de producción de una planta que sintetiza hialuronano, siendo la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT seleccionada del grupo que consiste en:

- a) moléculas de ácido nucleico caracterizadas porque codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT procedente de bacterias, animales o plantas, preferentemente de *Escherichia coli* o de ratón;
- 50 b) moléculas de ácido nucleico caracterizadas porque codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT de un virus que infecta a *Chlorella*;
- c) moléculas de ácido nucleico caracterizadas porque codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT de un virus de *Paramecium bursaria* de *Chlorella*;
- 55 d) moléculas de ácido nucleico caracterizadas porque los codones de la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT están modificados en comparación con los codones de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína que tiene la actividad de una GFAT correspondiente en el organismo parental;
- e) moléculas de ácido nucleico caracterizadas porque los codones de una proteína que tiene la actividad de una GFAT han sido modificados para adaptarse a la frecuencia de uso de los codones de la célula vegetal o de la planta en cuyo genoma se van a integrar o están integrados;
- 60 f) moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 5 o una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 7 o una proteína

que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 9;

g) moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína cuya secuencia es al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, con preferencia al menos un 90 %, de manera especialmente preferida al menos un 95 % y lo más preferentemente al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 5 o en la SEC ID N° 7 o en la SEC ID N° 9;

h) moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 4 o una secuencia complementaria a la misma o la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 6 o una secuencia complementaria a la misma o la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 8 o una secuencia complementaria a la misma o la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 10 o una secuencia complementaria a la misma;

i) moléculas de ácido nucleico que son al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, con preferencia al menos un 90 %, de manera especialmente preferida al menos un 95 % y lo más preferentemente al menos un 98 % idénticas a las secuencias de ácido nucleico descritas en h);

j) moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas con al menos una hebra de las secuencias de ácido nucleico descritas en f) o h);

k) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos difiere de la secuencia de las moléculas de ácido nucleico mencionadas en f) o h) debido a la degeneración del código genético; y

l) moléculas de ácido nucleico que son fragmentos, variantes alélicas y/o derivados de las moléculas de ácido nucleico mencionadas en a), b), c), d), e), f) o h);

m) moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT, donde las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT están ligadas a elementos reguladores (promotor) que inician la transcripción en células vegetales; o

n) moléculas de ácido nucleico de acuerdo con m), donde los promotores son promotores específicos del tejido, en particular preferentemente promotores que inician la transcripción específicamente en células de tubérculo, hoja, fruto o semilla de la planta.

En una realización preferida adicional, los procedimientos de acuerdo con la invención de producción de una planta que sintetiza hialuronano se usan para la producción de las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención.

La presente invención también proporciona plantas que se pueden obtener mediante un procedimiento de acuerdo con la invención de producción de una planta que sintetiza hialuronano.

La presente invención se refiere además a un procedimiento de producción de hialuronano que comprende la etapa de extraer hialuronano de células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, de plantas modificadas genéticamente 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 que se pueden obtener mediante un procedimiento de acuerdo con la invención de producción de plantas que sintetizan hialuronano.

Preferentemente, dicho procedimiento también comprende la etapa de recoger las células vegetales modificadas genéticamente cultivadas de acuerdo con la invención, las plantas modificadas genéticamente 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 la extracción del hialuronano, y de manera particularmente preferida, además, la etapa de cultivar células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención antes de la cosecha.

En contraste con los tejidos de bacterias o animales, los tejidos de las plantas no tienen hialuronidasas y no contienen ninguna hialaderina. Por consiguiente, como ya se ha descrito anteriormente, la extracción de hialuronano de tejidos vegetales es posible usando procedimientos relativamente sencillos. Si es necesario, los extractos acuosos, descritos anteriormente, de células o tejidos vegetales que contienen hialuronano se pueden purificar usando además procedimientos conocidos por el experto en la materia tales como, por ejemplo, la precipitación repetida con etanol. En el punto 2 del apartado de Procedimientos generales, se describe un procedimiento preferido para la purificación del hialuronano.

Los procedimientos ya descritos de extracción de hialuronano a partir de células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención también son adecuados para el aislamiento del hialuronano a partir del 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 que se pueden obtener mediante un procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de plantas que sintetizan hialuronano.

La presente invención también proporciona el uso de las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, de las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, del material de propagación de acuerdo con la invención, de las partes de plantas cosechables de acuerdo con la invención, de las partes de la planta procesables de acuerdo con la invención o de las plantas que se pueden obtener mediante un

procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de hialuronano.

La presente invención se refiere además a composiciones que comprenden células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención. En el presente documento, es indiferente si las células vegetales están intactas o ya no están intactas, porque se hayan destruido, por ejemplo, mediante el procesamiento. Las composiciones son preferentemente productos alimenticios o piensos, productos farmacéuticos o cosméticos.

Preferentemente, la presente invención proporciona composiciones que comprenden componentes de las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, de plantas modificadas genéticamente 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 que se pueden obtener mediante un procedimiento de acuerdo con la invención y que comprenden moléculas de ácido nucleico recombinantes, donde las moléculas de ácido nucleico recombinantes se caracterizan porque comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronano sintasa y proteínas que tienen la actividad (enzimática) de una GFAT.

Una integración estable de moléculas de ácido nucleico foráneas en el genoma de una célula vegetal o de una planta produce las moléculas de ácido nucleico foráneas que están flanqueadas, tras la integración en el genoma de una célula vegetal o planta, por secuencias de ácido nucleico genómicas de la planta. Por consiguiente, en una realización preferida, las composiciones de acuerdo con la invención se caracterizan porque las moléculas de ácidos nucleicos recombinantes presentes en la composición de acuerdo con la invención están flanqueadas por secuencias de ácido nucleico genómicas de la planta. En el presente documento, las secuencias de ácido nucleico genómicas de la planta pueden ser cualquiera de las secuencias presentes de manera natural en el genoma de la célula vegetal o de la planta usadas para la preparación de la composición.

Las moléculas de ácidos nucleicos recombinantes presentes en las composiciones de acuerdo con la invención pueden ser una o varias moléculas de ácidos nucleicos recombinantes, de manera que las moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronano sintasa y proteínas que tienen la actividad (enzimática) de una GFAT están presentes en una molécula de ácido nucleico, o aquellas en las que las moléculas de ácido nucleico pueden estar presentes en moléculas de ácido nucleico recombinantes separadas. Las moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronano sintasa o que codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT pueden estar presentes juntas en una sola molécula de ácido nucleico recombinante, o dos de las moléculas de ácido nucleico mencionadas pueden estar presentes juntas en una sola 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 todas las moléculas de ácido nucleico mencionadas pueden estar presentes, en cada caso, en moléculas de ácidos nucleicos recombinantes individuales separadas. Dependiendo de cómo las moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronano sintasa o que codifican una proteína que tiene la actividad (enzimática) de una GFAT están presentes en una composición de acuerdo con la invención, pueden estar flanqueadas por secuencias idénticas o diferentes de ácido nucleico genómicas de la planta.

El hecho de que las composiciones de acuerdo con la invención comprenden moléculas de ácido nucleico recombinantes se puede demostrar usando procedimientos conocidos por el experto en la materia tales como, por ejemplo, procedimientos basados en la hibridación o, preferentemente, usando procedimientos basados en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Preferentemente, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden al menos un 0,005 %, con preferencia al menos un 0,01 %, de manera particularmente preferida al menos un 0,05 % y de manera especialmente preferida al menos un 0,1 % de hialuronano. Preferentemente, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden, como máximo, un 5 %, con preferencia, como máximo, un 2 %, de manera particularmente preferida, como máximo, un 1 % y de manera especialmente preferida al menos un 0,5 % de hialuronano.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, las plantas modificadas genéticamente 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, las partes de plantas consumibles de acuerdo con la invención o las plantas que se pueden obtener mediante un procedimiento de acuerdo con la invención se pueden usar para preparar un producto alimenticio o pienso. Sin embargo, el uso como materias primas para las aplicaciones industriales también es posible, sin la necesidad de aislar el hialuronano. Así pues, por ejemplo, las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o las partes de plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención se pueden aplicar a superficies bajo cultivo agrícola para lograr una mayor unión del agua del suelo. Además, las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención se pueden usar para la preparación de agentes de secado (por ejemplo, para su uso en el envío de artículos sensibles a la humedad) o como absorbentes de líquidos (por ejemplo, en pañales o para absorber líquidos acuosos derramados). Para dichas aplicaciones, es posible usar plantas modificadas genéticamente enteras de acuerdo con la invención, partes de plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención trituradas (por ejemplo, molidas) o partes de plantas de acuerdo con la invención, según sea necesario. Son particularmente adecuadas para las aplicaciones en las que se usan plantas o partes de plantas molidas las partes

de plantas que contienen hialuronano, pero solo una baja proporción de agua. Se trata preferentemente de granos de plantas de cereales (maíz, arroz, trigo, centeno, avena, cebada, sagú o sorgo). Dado que las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención y las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención tienen un contenido de hialuronano más elevado que las plantas transgénicas descritas en la literatura, en comparación con estas, se tiene que usar menos material para las aplicaciones industriales cuando se hace uso de las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención.

La presente invención también proporciona procedimientos de preparación de una composición de acuerdo con la invención, donde se usan las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, las plantas modificadas genéticamente 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, las partes consumibles de plantas de acuerdo con la invención o las plantas que se pueden obtener mediante un procedimiento de acuerdo con la invención de producción de una planta que sintetiza hialuronano. Los procedimientos de preparación de una composición de acuerdo con la invención son preferentemente los procedimientos de preparación de productos alimenticios o piensos, procedimientos de preparación de un producto farmacéutico o procedimientos de preparación de un producto cosmético.

Los procedimientos de preparación de un producto alimenticio o pienso son conocidos por el experto en la materia. Los procedimientos de uso de plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o partes de plantas de acuerdo con la invención en superficies industriales también son conocidos por el experto en la materia e incluyen, entre otros, trituración o molienda de plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o partes de plantas de acuerdo con la invención. Sin embargo, no se limitan exclusivamente a los mismos. Algunas de las ventajas resultantes del uso de las materias objeto de acuerdo con la invención para la preparación de alimentos/piensos o para su uso en superficies industriales ya se han descrito anteriormente.

Un procedimiento de acuerdo con la invención de preparación de una composición es de manera particularmente preferida un procedimiento de preparación de una composición que comprende hialuronano.

La presente invención proporciona igualmente composiciones que se pueden obtener mediante un procedimiento de preparación de una composición de acuerdo con la invención.

La presente invención también se refiere al uso de células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, material de propagación de acuerdo con la invención, partes de plantas cosechables de acuerdo con la invención, partes de plantas procesables de acuerdo con la invención, partes de plantas consumibles de acuerdo con la invención o plantas que se pueden obtener mediante un procedimiento de acuerdo con la invención de producción de una planta que sintetiza hialuronano para la preparación de una composición de acuerdo con la invención. Se da preferencia al uso de células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención, material de propagación de acuerdo con la invención, partes de plantas cosechables de acuerdo con la invención, partes de plantas procesables de acuerdo con la invención, partes de plantas consumibles de acuerdo con la invención o plantas que se pueden obtener mediante un procedimiento de acuerdo con la invención de producción de una planta que sintetiza hialuronano para la preparación de alimento o pienso, para la preparación de un producto farmacéutico o para la preparación de un producto cosmético.

#### 40 Descripción de las secuencias

SEC ID N° 1: Secuencia de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa del Virus 1 de *Paramecium bursaria* de *Chlorella*.

SEC ID N° 2: Secuencia de ácido nucleico de una hialuronano sintasa del Virus 1 de *Paramecium bursaria* de *Chlorella*. La secuencia de aminoácidos mostrada se puede derivar de SEC ID N° 1.

SEC ID N° 3: Secuencia de ácido nucleico sintética que codifica una hialuronano sintasa del Virus 1 de *Paramecium bursaria* de *Chlorella*. La síntesis de los codones de la secuencia mostrada se llevó a cabo de manera que se adaptara al uso de los codones en las células vegetales. La secuencia de ácido nucleico mostrada codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2.

SEC ID N° 4: Secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 del ratón.

SEC ID N° 5: Secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 del ratón. La secuencia de aminoácidos mostrada se puede derivar de SEC ID N° 4.

- SEC ID N° 6: Secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 del ratón.
- SEC ID N° 7: Secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 del ratón. La secuencia de aminoácidos mostrada se puede derivar de SEC ID N° 6.
- SEC ID N° 8: Secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT de *Escherichia coli*.
- SEC ID N° 9: Secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene la actividad de una GFAT de *Escherichia coli*. La secuencia de aminoácidos mostrada se puede derivar de SEC ID N° 8.
- SEC ID N° 10: Secuencia de ácido nucleico sintética que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT de *Escherichia coli*. La síntesis de los codones de la secuencia mostrada se llevó a cabo de manera que se adaptara al uso de codones en células vegetales. La secuencia de ácido nucleico mostrada codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 9.
- SEC ID N° 11: Oligonucleótido sintético usado en el Ejemplo 1.
- SEC ID N° 12: Oligonucleótido sintético usado en el Ejemplo 1.
- SEC ID N° 13: Oligonucleótido sintético usado como cebador de PCR en el Ejemplo 10.
- SEC ID N° 14: Oligonucleótido sintético usado como cebador de PCR en el Ejemplo 10.

Toda la literatura citada, incluyendo, pero sin limitación, los números de acceso de las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos se incorporan en la descripción a modo de referencia.

#### **Descripción de las figuras**

Fig. 1: Muestra una curva de calibración y la ecuación correspondiente de la línea de regresión usada para calcular el contenido de hialuronano del tejido vegetal. La curva de calibración se estableció con ayuda del kit de ensayo comercial (kit de ensayo de ácido hialurónico (HA) de Corgenix Inc., Colorado, EE.UU., N° de prod. 029-001) y las soluciones patrón suministradas con el mismo.

#### **5 Procedimientos generales**

A continuación, se describen los procedimientos que se pueden usar en relación con la presente invención. Estos procedimientos son realizaciones específicas. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos procedimientos. El experto en la materia sabe que la invención se puede llevar a cabo de la misma manera mediante la modificación de los procedimientos descritos y/o mediante el reemplazo de procedimientos individuales o partes de procedimientos por procedimientos alternativos o partes alternativas de procedimientos.

##### 1. Transformación de plantas de patata

Se transformaron plantas de patata con ayuda de *Agrobacterium*, como se describe en Rocha-Sosa *et al.* (*EMBO J.* 8, (1989), 23-29).

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

15 Para detectar la presencia de hialuronano y determinar el contenido de hialuronano en tejido vegetal, se trató material vegetal de la siguiente manera: se añadieron 200  $\mu$ l de agua (desmineralizada, conductividad  $\geq 18$  M $\Omega$ ) a aproximadamente 0,3 g de material, y se trituró la mezcla en un molino de bolas oscilatorias de laboratorio (MM200, de Retsch, Alemania, 30 segundos a 30 Hz). A continuación, se añadieron otros 800  $\mu$ l de agua (desmineralizada, conductividad  $\geq 18$  M $\Omega$ ), y se mezcló bien la mezcla (usando, por ejemplo, un mezclador Vortex). Se separaron los restos celulares y los componentes insolubles del sobrenadante por centrifugación a 16.000 xg durante 5 minutos.

##### 3. Purificación del hialuronano

25 Se pelaron aproximadamente 100 gramos de tubérculos, se cortaron en trozos de un tamaño de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> y, tras la adición de 100 ml de agua (desmineralizada, conductividad  $\geq 18$  M $\Omega$ ), se trituraron en un mezclador Waring a velocidad máxima durante unos 30 segundos. A continuación, se retiraron los restos celulares usando un tamiz de té. Se volvieron a suspender los restos celulares que se habían retirado en 300 ml de agua (desmineralizada, conductividad  $\geq 18$  M $\Omega$ ) y se retiraron de nuevo usando un tamiz de té. Se combinaron las dos suspensiones obtenidas (100 ml + 300 ml) y se centrifugaron a 13.000 xg durante 15 minutos. Se añadió NaCl al sobrenadante de centrifugación obtenido hasta que se alcanzó una concentración final del 1 %. Una vez que el NaCl

se hubo pasado a la disolución, se llevó a cabo la precipitación mediante la adición de dos veces el volumen de etanol, tras lo que se mezcló bien y se incubó a -20 °C durante una noche. Después, se centrifugó la mezcla a 13.000 xg durante 15 minutos. Se disolvió el precipitado sedimentado obtenido tras esta centrifugación en 100 ml de tampón (TrisHCl 50 mM, pH 8, CaCl<sub>2</sub> 1 mM) y, a continuación, se añadió proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml y se incubó la solución a 42 °C durante 2 horas. A esto, le siguieron 10 minutos de incubación a 95 °C. Una vez más, se añadió NaCl a esta solución hasta que se alcanzó una concentración final del 1 %. Una vez que el NaCl se hubo pasado a la disolución, se llevó a cabo otra precipitación mediante la adición de dos veces el volumen de etanol, se mezcló bien y se incubó a -20 °C durante aproximadamente 96 horas. A esto, le siguieron 15 minutos de centrifugación a 13.000 xg. Se disolvió el precipitado sedimentado obtenido tras esta centrifugación en 30 ml de agua (desmineralizada, conductividad ≥ 18 MΩ), y una vez más, se añadió NaCl a una concentración final del 1 %. Mediante la adición de dos veces el volumen de etanol, mezclando bien e incubando a -20 °C durante una noche, se llevó a cabo otra precipitación. Se disolvió el precipitado obtenido tras la posterior centrifugación a 13.000 xg durante 15 minutos en 20 ml de agua (desmineralizada, conductividad ≥ 18 MΩ). Se llevó a cabo una purificación adicional por filtración centrífuga. Con este fin, en cada caso, se aplicaron 5 ml de precipitado disuelto a un filtro de membrana (CentriconAmicon, ancho de poro de 10 .00 NMWL, N° de prod. UCF8 010 96), y se centrifugó la muestra a 2.200 xg hasta que solo quedaron aproximadamente 3 ml de la solución encima del filtro. Dos veces más, se añadieron entonces en cada caso 3 ml de agua (desmineralizada, conductividad ≥ 18 MΩ) a la solución sobre la membrana y, en cada caso, se volvió a centrifugar en condiciones idénticas hasta que, al final, solo quedaron aproximadamente 3 ml de la solución encima del filtro. Se extrajeron las soluciones todavía presentes sobre la membrana tras la filtración centrífuga, y se enjuagó la membrana varias veces (de tres a cinco veces) con aproximadamente 1,5 ml de agua (desmineralizada, conductividad ≥ 18 MΩ). Se combinaron todas las soluciones que todavía estaban presentes encima de la membrana y las soluciones obtenidas del enjuague, se añadió NaCl hasta una concentración final del 1 %, y una vez que el NaCl se hubo pasado a la disolución, se añadió el doble de volumen de etanol, se mezcló la muestra y se obtuvo un precipitado mediante el almacenamiento a -20 °C durante una noche. Se disolvió el precipitado obtenido tras la posterior centrifugación a 13.000 xg durante 15 minutos en 4 ml de agua (desmineralizada, conductividad ≥ 18 MΩ) y luego se liofilizó (24 horas bajo una presión de 0,037 kPa, aparato de liofilización Cristo Alfa 1-4 de Christ, Osterode, Alemania).

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

Se detectó hialuronano usando un kit de ensayo comercial (kit de ensayo de ácido hialurónico (HA) de Corgenix, Inc., Colorado, EE.UU., N° de prod. 029-001) de acuerdo con las instrucciones del fabricante que se incorporan en la presente descripción por referencia. El principio del ensayo se basa en la disponibilidad de una proteína que se une específicamente al hialuronano (HABP), y se lleva a cabo de manera similar a un ensayo ELISA, donde una reacción de color indica el contenido de hialuronano de la muestra examinada. Por consiguiente, para la determinación cuantitativa del hialuronano, las muestras por medir se han de emplear a una concentración que esté dentro de los límites establecidos (por ejemplo: la dilución de la muestra en cuestión o el uso de menos agua para la extracción de hialuronano del tejido vegetal, dependiendo de si se ha superado un límite o no se ha alcanzado). En lotes paralelos, se sometieron inicialmente partes alícuotas de las muestras por determinar a la digestión con hialuronidasa y luego se midieron usando el kit de ensayo comercial (kit de ensayo de ácido hialurónico (HA) de Corgenix, Inc., Colorado, EE.UU., N° de prod. 029-001). Se llevó a cabo la digestión con hialuronidasa usando 400 µl de extracto de tubérculo de patata en tampón de hialuronidasa (tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 5,3; NaCl 150 mM) mediante la adición de 5 µg (~ 3 unidades) de hialuronidasa (hialuronidasa de tipo III de Sigma, N° de prod. H 2251) e incubando a 37 °C durante 30 min. En cada caso, en una dilución de 1:10, todas las muestras se usaron para determinar el contenido de hialuronano.

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

La actividad de una proteína que tiene la actividad de GFAT se determina como se describe en Rachel *et al.* (1996, *J. Bacteriol.* 178 (8), 2320-2327). Para distinguir si una proteína tiene la actividad de una GFAT-1 o GFAT-2, se usa el procedimiento descrito en Hu *et al.* (2004, *J. Biol. Chem.* 279 (29), 29988-29993).

#### 6. Transformación de plantas de arroz

Las plantas de arroz se transformaron mediante el procedimiento descrito por Hiei *et al.* (1994, *Plant Journal* 6(2), 271-282).

#### 7. Transformación de plantas de tomate

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

### Ejemplos

#### 55 1. Preparación del vector de expresión vegetal IR 47-71

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

8721), que se construyó de la siguiente manera: se aisló un fragmento de una longitud de 529 pb que comprendía los nucleótidos 6909-7437 del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor como fragmento *EcoR* I//*Kpn* I a partir del plásmido pDH51 (Pietrzak *et al*, 1986 *Nucleic Acids Res.* 14, 5858) y se ligó entre los sitios de restricción de *EcoR* I y *Kpn* I del polienlazador de pUC18. De esta manera, se formó el plásmido pUC18-35S. Usando las endonucleasas de restricción *Hind* III y *Pvu* II, se aisló un fragmento de una longitud de 192 pb que incluía la señal de poliadenilación (extremo 3') del gen *Octopin sintasa* (gen 3) del ADN-T del plásmido Ti pTiACH5 (Gielen *et al.*, 1984, *EMBO Journal* 3, 835-846) (nucleótidos 11749-11939) a partir del plásmido pAGV40 (Herrera-Estrella *et al.*, 1983 *Nature*, 303, 209-213). Tras la adición de los enlazadores *Sph* I al sitio de restricción *Pvu* II, se ligó el fragmento entre los sitios de restricción *Sph* I y *Hind* III de pUC18-35S. Esto dio el plásmido pA7. En este caso, se eliminó todo el polienlazador que comprendía el promotor 35S y el terminador ocs usando *EcoR* I y *Hind* III, y se ligó en el vector pBin19 adecuadamente escindido. Esto dio al vector de expresión vegetal pBinAR (Höfgen y Willmitzer, 1990, *Plant Science* 66, 221-230).

Se ligó el promotor del gen patatín B33 de *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa *et al.*, 1989, *EMBO J.* 8, 23-29), como fragmento *Dra* I (nucleótidos -1512+14), en el vector escindido por *Sst* I pUC19, cuyos extremos se habían truncado usando ADN polimerasa de T4. Esto dio el plásmido pUC19-B33. A partir de este plásmido, se eliminó el promotor B33 usando *EcoR* I y *Sma* I, y se ligó en el vector pBinAR apropiadamente restringido. Esto dio el vector de expresión vegetal pBinB33. Para facilitar etapas de clonación adicionales, se amplió el MCS (sitio de clonación múltiple). Con este fin, se sintetizaron dos oligonucleótidos complementarios, se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, se enfriaron lentamente hasta la 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 tenían la siguiente secuencia:

**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 vegetal pBinARHyg

Se retiró el fragmento que comprendía el promotor 35S, el terminador ocs y todo el sitio de clonación múltiple 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 usando las mismas endonucleasas de restricción. El plásmido obtenido se denominó pBinARHyg.

## 3. Preparación del vector de expresión vegetal pBinB33-Hyg

Se escindió el fragmento *EcoRI-HindIII* que comprendía el promotor B33, parte del polienlazador y el terminador ocs del plásmido pBinB33, y se ligó en el vector apropiadamente restringido pBIB-Hyg (Becker, 1990, *Nucleic Acids Res.* 18, 203). El vector de expresión vegetal obtenido se denominó pBinB33-Hyg.

## 4. Síntesis de moléculas de ácido nucleico

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

Se sintetizó la secuencia de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa (HAS) del Virus 1 de *Paramecium bursaria* de *Chlorella* por Medigenomix GmbH (Munich, Alemania) y se clonó en el vector pCR2.1 de Invitrogen (N° de prod. K2000-01). El plásmido obtenido se denominó IC 323-215. La secuencia de ácido nucleico sintética que codifica la proteína HAS del Virus 1 de *Paramecium bursaria* de *Chlorella* se muestra en la SEC ID N° 3. La secuencia de ácido nucleico correspondiente aislada originalmente del Virus 1 de *Paramecium bursaria* de *Chlorella* 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 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 clonada en el vector pCR4Topo de Invitrogen (N° de prod. 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 SEC ID N° 10. La secuencia de ácido nucleico correspondiente aislada originalmente de *Escherichia coli* se muestra en la SEC ID NO 8.

## 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 del ratón

La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 se adquirió en BioCat GmbH, Heidelberg (Nº de artículo 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. En este caso, 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* tiene, en comparación con la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID Nº 4, un cambio de la base T a C en la posición 1090 y un cambio de la base G a A en la posición 2027. Estos intercambios de bases no generan 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 de ratón se muestra en SEC ID Nº 4. Para facilitar las posteriores etapas de clonación, se aisló la secuencia que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT-1 usando las endonucleasas de restricción *Xho* I y *Eco* RV de IC 365-256 y se clonó en el plásmido pME9 (vector pBlueskript de Stratagene) que tiene un sitio de clonación múltiple modificado que, además, tiene un sitio de restricción *Pac* I en ambos extremos, plásmido que se había cortado con las mismas endonucleasas de restricción. El plásmido obtenido se denominó IC 367-256.

b) Moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 del ratón

Las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 del ratón se adquirieron en Invitrogen (ID del clon 4167189, clon de ADNc MGC:18324, IMAGE:4167189). Se trata de un clon que es producido por I.M.A.G.E. Konsortium (<http://image.llnl.gov>) y distribuido por Invitrogen. En este caso, el ADNc que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 se clona 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 SEC ID Nº 6.

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

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

7. Preparación del vector de expresión vegetal IC 399-299 que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 del ratón

Usando la digestión de restricción con *Xho* I y *Asp* 718, se aislaron moléculas de ácido nucleico que comprendían la secuencia que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 del ratón del plásmido 369-256 y se clonaron en el vector de expresión vegetal pBinB33-Hyg que se había cortado con las mismas endonucleasas de restricción. El vector de expresión vegetal obtenido se denominó IC 399-299.

8. Preparación del vector de expresión vegetal IC 399-300 que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT de *E. coli*

Se aislaron moléculas de ácido nucleico que comprendían la secuencia de codificación de la proteína que tiene la actividad de una GFAT de *E. coli* del plásmido 373-256 por digestión de restricción con *Sac* I y *Sbf* I, y se clonaron en el vector de expresión vegetal pBinB33-Hyg que se había cortado con las mismas endonucleasas de restricción. El vector de expresión vegetal obtenido se denominó IC 399-300.

9. Preparación del vector de expresión vegetal pBA16, que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa del Virus 1 de *Paramecium bursaria* de *Chlorella*

Usando la endonucleasa de restricción *Asp* 7181, se aisló un fragmento que comprendía la secuencia de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa del Virus 1 de *Paramecium bursaria* de *Chlorella* del plásmido IC 323-215, se truncan los extremos del fragmento usando la polimerasa de Klenow, y a continuación, se escindió una vez más el fragmento resultante usando la endonucleasa de restricción *Pac* I. Se ligó el fragmento obtenido de esta manera al plásmido IR103-123 (descrito en el documento WO 2006 032538), que se había escindido usando las endonucleasas de restricción *Pac* I y *Ecl*136 II. El vector de expresión vegetal obtenido se conoce como pBA16.

10. Preparación del vector de expresión vegetal IC 386-299

Se amplificó el ADN del promotor de prolamina del arroz (Nº de acceso del EMBL D63901, Sha *et al.*, 1996, *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, 335-337; Wu *et al.*, 1998, *Plant Cell Physiol.* 39(8), 885-889) usando el ADN genómico aislado en hojas de *Oryza sativa* (variedad cultivada M202).

Condiciones usadas para la amplificación por PCR:

Para la amplificación, se usó la ADN polimerasa Expand High Fidelity (PCR Systems, Roche Nº de producto: 1732641). Se usaron las condiciones y los tampones suministrados por el fabricante del kit mencionado



(continuación)

Concentración de hialuronano	Mediciones individuales independientes			Media	D.E.
	E <sub>450nm</sub>	E <sub>450nm</sub>	E <sub>450nm</sub>		
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
1.600 ng/ml	2,089	2,487	3,170	2,582	0,547

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

5 En un invernadero, se cultivaron plantas individuales de la línea 365 ES en el suelo de macetas de 6 cm. En cada caso, se procesaron aproximadamente 0,3 g de material de tubérculos de patata de cada planta de acuerdo con el procedimiento descrito en el punto 2 del apartado de Procedimientos generales. Usando el procedimiento descrito en el punto 4 del apartado de Procedimientos generales, se determinó la cantidad de hialuronano presente en los respectivos extractos vegetales, con la ayuda de la curva de calibración mostrada en el Ejemplo 12a) y en la Fig. 1. En este caso, se usó el sobrenadante obtenido tras la centrifugación en una dilución de 1:10 para la determinación del contenido de hialuronano. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:

15 **Tabla 2:** Cantidad de hialuronano (en µg de hialuronano por gramo de peso fresco) producida por plantas transgénicas independientes de la línea 365 ES. La columna 1 se refiere a la planta de la que se recogió el material de tubérculo (en el presente documento, "de 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 usada 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 la línea de regresión (véase la Fig. 1) teniendo en cuenta el factor de dilución, de la siguiente manera: ((valor de la columna 3-0,149)/0,00185) x 10. La columna 5 indica la cantidad de hialuronano basada en el peso fresco usado, y se calculó de la siguiente manera: (valor de la columna 4/valor de la columna 2)/1.000. "n.d." significa no detectable.

Nombre de la planta	Peso del material vegetal empleado [g]	Extinción E450	Cantidad de hialuronano [ng/ml]	Hialuronano basado en el peso fresco del material vegetal [µg/g]
365 ES 13	0,297	2,746	14	47
365 ES 74	0,306	4,000	20816	68
Tipo natural	0,305	0,111	n.d.	n.d.

13. Transformación de plantas que sintetizan hialuronano con vectores de expresión vegetales que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT de *Escherichia coli*

a) Transformación de plantas

25 Se transformaron plantas de patata de las líneas 365 ES 13 y 365 ES 74, en cada caso, con el vector de expresión vegetal IC 399-300 usando el procedimiento dado en el punto 1 del apartado de Procedimientos generales. Las plantas de patata transgénicas obtenidas tras la transformación de la línea 365 ES 74 con el plásmido IC 399-300 se denominaron 433 ES.

b) Análisis de los tubérculos de patata de la línea 433 ES

30 En un invernadero, se cultivaron plantas individuales de la línea 433 ES en el suelo de macetas de 6 cm. En cada caso, se procesaron aproximadamente 0,3 g de material de tubérculos de patata y/o de hojas de cada planta de acuerdo con el procedimiento descrito en el punto 2 del apartado de Procedimientos generales. Usando el procedimiento descrito en el punto 4 del apartado de Procedimientos generales, se determinó la cantidad de

## ES 2 536 925 T3

hialuronano presente en los respectivos extractos vegetales, con la ayuda de la curva de calibración mostrada en el Ejemplo 12a) y en la Fig. 1. En este caso, se usó el sobrenadante obtenido tras la centrifugación en una dilución de 1:10 para la determinación del contenido de hialuronano. Se obtuvieron los siguientes resultados para las plantas seleccionadas:

- 5 **Tabla 3:** Cantidad de hialuronano ("HA" en  $\mu\text{g}$  de hialuronano por gramo de peso fresco) producida por plantas transgénicas independientes de la línea 433 ES. La columna 1 se refiere a la planta de la que se recogió el material de tubérculo o de hoja (en el presente documento, "de tipo natural" se refiere a las plantas no transformadas y ES 365 74 se refiere a las plantas que se han usado como material de partida para la transformación con el plásmido c 399-300). Las columnas 2 y 3 se refieren a la cantidad de hialuronano detectada en las hojas o los tubérculos, respectivamente.
- 10

Nombre de la planta	Cantidad de HA de las hojas [ $\mu\text{g/g}$ FG]	Cantidad de HA de los tubérculos [ $\mu\text{g/g}$ FG]
433ES 1	111,84	126,70
433ES 3	303,34	203,16
433ES 4	3142,41	
433ES 5	312,98	825,96
433ES 7	1492,94	
433ES 8	914,03	
433ES 9	1858,68	
433ES 10	357,90	
433ES 11	5962,82	
433ES 12	662,99	662,99
433ES 13	626,52	624,33
433ES 14	665,23	
433ES 15	601,36	
433ES 16	3416,94	
433ES 18	781,02	
433ES 19	3294,09	
433ES 20	1348,85	975,18
433ES 21	937,92	
433ES 22	1086,45	
433ES 23	1327,28	
433ES 24	340,80	76,00
433ES 25	1529,95	
433ES 26	375,53	
433ES 27		425,65
433ES 28	1850,99	294,98
433ES 30	2512,40	
433ES 31	3337,54	
433ES 32	1583,60	

(continuación)

Nombre de la planta	Cantidad de HA de las hojas [ $\mu\text{g/g}$ FG]	Cantidad de HA de los tubérculos [ $\mu\text{g/g}$ FG]
433ES 34	3552,44	
433ES 35	5419,43	
433ES 36	902,01	
433ES 37	829,35	
433ES 38	1536,55	
Tipo natural 1	0,40	n.d.
Tipo natural 2	0,34	n.d.
Tipo natural 3	n.d.	
365 ES 74-1	265,1	
365 ES 74-2		91,84
365 ES 74-3	193,5	
365 ES 74-4		175,48
365 ES 74-5	73,9	
365 ES 74-6		168,68
365 ES 74-7	67,58	
365 ES 74-8	121,89	121,89
365 ES 74-9	62,23	
365 ES 74-10		275,24
365 ES 74-11	134,56	

## 14. Transformación de plantas de arroz

- 5 a) con vectores de expresión vegetales que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronano sintasa del Virus 1 de *Paramecium bursaria* de *Chlorella*

10 Se transformaron plantas de arroz (variedad cultivada M202) con el vector de expresión vegetal pBA16, que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de hialuronano sintasa del Virus 1 de *Paramecium bursaria* de *Chlorella* bajo el control del promotor del gen globulina de *Oryza sativa* (Wu *et al.*, 1998, *Plant Cell Physiol.* 39 (8), 885-889), usando el procedimiento descrito en el punto 6 del apartado de Procedimientos generales. Las plantas de arroz transgénicas obtenidas que habían sido transformadas con el plásmido pBA16 se conocen como Os-pBA16.

- b) con vectores de expresión vegetales que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 de ratón

15 Se transformaron plantas de arroz (variedad cultivada M202) con el vector de expresión vegetal IC 386-299, que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2 de ratón bajo el control del promotor de los polipéptidos de prolamina de 13 kDa de *Oryza sativa*, usando el procedimiento dado en el punto 6 del apartado de Procedimientos generales. Las plantas de arroz transgénicas obtenidas que habían sido transformadas con el plásmido pBA16 se conocen como GAOS0788.

## 15. Análisis de las plantas de arroz de la línea Os-pBA16

- 20 a) semillas de arroz inmaduras

Se recogieron semillas de arroz inmaduras (de 5 a 10 días tras la polinización) producidas por plantas individuales de la línea OS-pBA16, cultivadas en el suelo del invernadero, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a

-80 °C. Se seleccionaron aleatoriamente granos congelados de cada planta, se exprimió el endospermo, se combinaron, se pesaron y se congelaron de nuevo en nitrógeno líquido. Se deshizo la muestra con un molino de bolas (Modelo MM200, Firma Retsch, Alemania), se añadieron 100 µl de agua, se mezcló el material homogeneizado, se centrifugó (13.000 xg, 5 min) y se determinó la concentración de hialuronano de cada muestra de acuerdo con el procedimiento descrito en el punto 4 del apartado de Procedimientos generales.

De las 37 de combinaciones de semillas, comprendiendo cada una 3 semillas inmaduras de plantas independientes de la línea OS-pBA16, más del 70 % resultaron sintetizar una cantidad significativa de hialuronano (al menos 0,1 µg de hialuronano por g de peso fresco) en las semillas. La cantidad de hialuronano de las mezclas de semillas preparadas a partir de plantas de arroz independientes varió entre 0,1 y 15,7 µg de hialuronano por gramo de peso fresco. En la siguiente tabla, se muestran los resultados de cada una de las combinaciones de semillas preparadas a partir de plantas independientes:

**Tabla 4:** Detección de hialuronano en combinaciones de semillas, cada una preparada a partir de plantas independientes de la línea transgénica OS-pBA16.

Material vegetal	Hialuronano basado en el peso fresco del material vegetal [µg/g]
OS-pBA16 0612-00102	7,30
OS-pBA16 0612-00102	0,54
OS-pBA16 0612-00201	12,16
OS-pBA16 0612-00401	1,12
OS-pBA16 0612-00402	7,28
OS-pBA16 0612-00502	0,08
OS-pBA16 0612-00601	0,37
OS-pBA16 0612-00701	0,66
OS-pBA16 0612-00702	0,03
OS-pBA16 0612-00801	2,48
OS-pBA16 0612-00802	3,84
OS-pBA16 0612-00902	0,02
OS-pBA16 0612-01001	0,02
OS-pBA16 0612-01201	1,71
OS-pBA16 0612-01202	0,11
OS-pBA16 0612-01301	5,84
OS-pBA16 0612-01401	0,25
OS-pBA16 0612-01402	0,11
OS-pBA16 0612-01501	0,16
OS-pBA16 0612-01601	1,12
Tipo natural 1	0,01
Tipo natural 2	0,02
Tipo natural 3	0,02
OS-pBA16 0613-00101	4,43

(continuación)

Material vegetal	Hialuronano basado en el peso fresco del material vegetal [µg/g]
OS-pBA16 0613-00102	1,95
OS-pBA16 0613-00301	0,25
OS-pBA16 0613-00401	15,72
OS-pBA16 0613-00402	0,38
OS-pBA16 0613-00502	0,87
OS-pBA16 0613-00601	0,02
OS-pBA16 0613-00602	0,01
OS-pBA16 0613-00701	0,23
OS-pBA16 0613-00702	0,80
OS-pBA16 0613-00801	1,72
OS-pBA16 0613-00802	0,15
OS-pBA16 0613-00902	0,02
OS-pBA16 0613-01001	0,02
OS-pBA16 0613-01002	0,01
OS-pBA16 0613-01102	0,24
OS-pBA16 0613-01202	9,48
OS-pBA16 0613-01301	13,44
OS-pBA16 0613-01302	9,79
OS-pBA16 0613-01501	0,63
OS-pBA16 0613-01502	6,78

## b) Harina de arroz

5 Se recogieron 20-25 semillas maduras de cada planta transformada. Se retiraron las cáscaras con un descascarillador (Laboratory Paddy sheller, Grainman, Miami, Florida, EE.UU.) y se molió el grano de arroz integral con un molino de laboratorio (Cyclotec, molino de muestras, Foss, Dinamarca). A aproximadamente 40 mg de la harina de arroz obtenida de las semillas combinadas de cada planta independiente, se añadió 1 ml de agua, se mezcló la muestra, se centrifugó (13.000 xg, 5 min) y se determinó la concentración de hialuronano del sobrenadante de cada muestra de acuerdo con el procedimiento descrito en el punto 4 del apartado de Procedimientos generales. En la siguiente tabla, se muestran los resultados para las muestras de harina seleccionadas preparadas a partir de plantas independientes:

10 Tabla 5: Detección de hialuronano de las muestras de harina de arroz, preparadas a partir de semillas de cada planta independiente de la línea transgénica OS-pBA16. La detección se llevó a cabo usando el procedimiento descrito en el punto 4 del apartado de Procedimientos generales.

Material vegetal	Hialuronano basado en el peso del material vegetal [µg/g]
OS-pBA16 0612-00101	2,03
OS-pBA16 0612-00102	1,19

ES 2 536 925 T3

(continuación)

Material vegetal	Hialuronano basado en el peso del material vegetal [µg/g]
OS-pBA16 0612-00201	1,94
OS-pBA16 0612-00402	4,24
OS-pBA16 0612-00502	1,19
OS-pBA16 0612-00601	1,64
OS-pBA16 0612-00602	2,51
OS-pBA16 0612-00701	0,87
OS-pBA16 0612-00702	1,04
OS-pBA16 0612-00801	3,61
OS-pBA16 0612-00802	3,88
OS-pBA16 0612-00902	1,02
OS-pBA16 0612-01001	0,58
OS-pBA16 0612-01201	4,86
OS-pBA16 0612-01202	2,96
OS-pBA16 0612-01301	11,30
OS-pBA16 0612-01401	1,64
OS-pBA16 0612-01402	1,50
OS-pBA16 0612-01501	4,54
OS-pBA16 0612-01601	1,90
OS-pBA16 0613-00101	3,46
OS-pBA16 0613-00102	3,94
OS-pBA16 0613-00301	3,32
OS-pBA16 0613-00401	5,21
OS-pBA16 0613-00402	3,45
OS-pBA16 0613-00502	5,20
OS-pBA16 0613-00601	0,83
OS-pBA16 0613-00602	0,77
OS-pBA16 0613-00701	2,63
OS-pBA16 0613-00702	3,77
OS-pBA16 0613-00801	1,55
OS-pBA16 0613-00802	2,81
OS-pBA16 0613-00902	2,65
OS-pBA16 0613-01001	1,06
OS-pBA16 0613-01002	0,59

(continuación)

Material vegetal	Hialuronano basado en el peso del material vegetal [µg/g]
OS-pBA16 0613-01102	1,19
OS-pBA16 0613-01202	10,18
OS-pBA16 0613-01301	5,02
OS-pBA16 0613-01302	3,84
OS-pBA16 0613-01501	4,00
OS-pBA16 0613-01502	5,63
OS-pBA16 0613-000101	0,63
OS-pBA16 0613-000103	0,58
OS-pBA16 0613-000104	0,87

## b) Análisis de las plantas de arroz de la línea GAOS0788

5 Se cultivaron plantas de arroz independientes de la línea GAOS0788 obtenidas tras la transformación con el plásmido IC 386-299 en suelo del invernadero. De cada planta, se recogieron de 20 a 25 semillas maduras (granos), se retiraron las cáscaras con un descascarillador (Laboratory Paddy sheller, Grainman, Miami, Florida, EE.UU.) y se molieron aproximadamente 7 granos de arroz integral de cada línea con un molino de bolas de laboratorio (MM200, Company Retsch, Alemania, 30 segundos a 30 Hz), lo que produjo la harina de arroz. Tras ello, se determinó el contenido de derivados de glucosamina N-acetilados de cada muestra de acuerdo con el procedimiento descrito por Elson y Morgan (1933, *J. Biochem.* 27,1824). Varias muestras analizadas sí mostraron un aumento del contenido de derivados de glucosamina N-acetilados que variaba de aproximadamente 2 µmol a aproximadamente 20 µmol de derivados de glucosamina N-acetilados por gramo de peso fresco de la muestra. Los granos sueltos de plantas seleccionadas (GAOS0788-00501), analizados como se ha descrito anteriormente, mostraron un contenido de derivados de glucosamina N-acetilados de hasta aproximadamente 43 µmol por gramo de peso fresco de la muestra.

10 Se cruzaron entre sí las plantas seleccionadas de las líneas OS-pBA16 y GAOS0788, obteniéndose plantas que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de una hialuronano sintasa y que codifican una proteína que tiene la actividad de una GFAT-2.

## LISTADO DE SECUENCIAS

20

&lt;110&gt; Bayer CropScience GmbH

&lt;120&gt; Plantas con producción de hialuronano aumentada

25

&lt;130&gt; BCS 05-5008 PCT

&lt;150&gt; EP05090279.0

&lt;151&gt; 05-10-2005

30

&lt;150&gt; US60/725.388

&lt;151&gt; 11-10-2005

<160> 14

<170> Patente en versión 3.3

5

<210> 1

<211> 1707

<212> ADN

<213> Virus 1 de *Paramecium bursaria* de *Chlorella*

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1707)

<300>

15

<308> PB42580

<309> 24-12-1995

<313> (50903)..(52609)

<400> 1

20

ES 2 536 925 T3

atg Met 1	ggt Gly	aaa Lys	aat Asn	ata Ile 5	atc Ile	ata Ile	atg Met	ggt Val	tcg Ser 10	tgg Trp	tac Tyr	acc Thr	atc Ile 15	ata Ile	act Thr	48
tca Ser	aat Asn	cta Leu	atc Ile 20	gcg Ala	ggt Val	gga Gly	gga Gly	gcc Ala 25	tct Ser	cta Leu	atc Ile	ttg Leu 30	gct Ala	ccg Pro	gca Ala	96
att Ile	act Thr	ggg Gly 35	tat Tyr	ggt Val	cta Leu	cat His	tgg Trp 40	aat Asn	att Ile	gct Ala	ctc Leu	tcg Ser 45	aca Thr	atc Ile	tgg Trp	144
gga Gly 50	gta Val	tca Ser	gct Ala	tat Tyr	ggt Gly 55	att Ile	ttc Phe	ggt Val	ttt Phe	ggg Gly 60	ttt Phe	ttc Phe	ctt Leu	gca Ala	caa Gln	192
ggt Val 65	tta Leu	ttt Phe	tca Ser	gaa Glu 70	ctg Leu 70	aac Asn	agg Arg	aaa Lys	cgt Arg	ctt Leu 75	cgc Arg	aag Lys	tgg Trp	att Ile 80	tct Ser 80	240
ctc Leu	aga Arg	cct Pro	aag Lys	ggt Gly 85	tgg Trp	aat Asn	gat Asp	ggt Val	cgt Arg 90	ttg Leu	gct Ala	gtg Val	atc Ile 95	att Ile 95	gct Ala	288
gga Gly	tat Tyr	cgc Arg	gag Glu 100	gat Asp	cct Pro	tat Tyr	atg Met	ttc Phe 105	cag Gln	aag Lys	tgc Cys	ctc Leu	gag Glu 110	tct Ser	gta Val	336
cgt Arg	gac Asp	tct Ser 115	gat Asp	tat Tyr	ggc Gly	aac Asn	ggt Val 120	gcc Ala	cgt Arg	ctg Leu	att Ile	tgt Cys 125	gtg Val	att Ile	gac Asp	384
ggt Gly	gat Asp	gag Glu	gac Asp	gat Asp	gat Asp	atg Met	agg Arg	atg Met	gct Ala	gcc Ala	ggt Val	tac Tyr	aag Lys	gcg Ala	atc Ile	432

ES 2 536 925 T3

130	135	140														
tac Tyr 145	aat Asn	gat Asp	aat Asn	atc Ile	aag Lys 150	aag Lys	ccc Pro	gag Glu	ttt Phe	gtt Val 155	ctg Leu	tgt Cys	gag Glu	tca Ser	gac Asp 160	480
gac Asp	aag Lys	gaa Glu	ggt Gly	gaa Glu 165	cgc Arg	atc Ile	gac Asp	tct Ser	gat Asp 170	ttc Phe	tct Ser	cgc Arg	gac Asp	att Ile 175	tgt Cys	528
gtc Val	ctc Leu	cag Gln	cct Pro 180	cat His	cgf Arg	gga Gly	aaa Lys	cgg Arg 185	gag Glu	tgt Cys	ctt Leu	tat Tyr 190	act Thr 190	ggg Gly	ttt Phe	576
caa Gln	ctt Leu	gca Ala 195	aag Lys	atg Met	gac Asp	ccc Pro	agt Ser 200	gtc Val	aat Asn	gct Ala	gtc Val	gtt Val 205	ctg Leu	att Ile	gac Asp	624
agc Ser	gat Asp 210	acc Thr	ggt Val	ctc Leu	gag Glu	aag Lys 215	gat Asp	gct Ala	att Ile	ctg Leu	gaa Glu 220	ggt Val	gta Val	tac Tyr	cca Pro	672
ctt Leu 225	gca Ala	tgc Cys	gat Asp	ccc Pro	gag Glu 230	atc Ile	caa Gln	gcc Ala	ggt Val	gca Ala 235	ggt Gly	gag Glu	tgt Cys	aag Lys	att Ile 240	720
tgg Trp	aac Asn	aca Thr	gac Asp	act Thr 245	ctt Leu	ttg Leu	agt Ser	ctt Leu	ctc Leu 250	gtc Val	gct Ala	tgg Trp	cgg Arg	tac Tyr 255	tat Tyr	768
tct Ser	gcg Ala	ttt Phe	tgt Cys 260	gtg Val	gag Glu	agg Arg	agt Ser	gcc Ala 265	cag Gln	tct Ser	ttt Phe	ttc Phe	agg Arg 270	act Thr	gtt Val	816
cag Gln	tgc Cys	ggt Val 275	ggg Gly	ggg Gly	cca Pro	ctg Leu	ggt Gly 280	gcc Ala	tac Tyr	aag Lys	att Ile	gat Asp 285	atc Ile	att Ile	aag Lys	864
gag Glu	att Ile 290	aag Lys	gac Asp	ccc Pro	tgg Trp	att Ile 295	tcc Ser	cag Gln	cgc Arg	ttt Phe	ctt Leu 300	ggt Gly	cag Gln	aag Lys	tgt Cys	912
act Thr 305	tac Tyr	ggt Gly	gac Asp	gac Asp	cgc Arg 310	cgg Arg	cta Leu	acc Thr	aac Asn	gag Glu 315	atc Ile	ttg Leu	atg Met	cgf Arg	ggt Gly 320	960
aaa Lys	aag Lys	ggt Val	gtg Val	ttc Phe 325	act Thr	cca Pro	ttt Phe	gct Ala	ggt Val 330	ggt Gly	tgg Trp	tct Ser	gac Asp 335	agt Ser 335	ccg Pro	1008
acc Thr	aat Asn	gtg Val	ttt Phe 340	cgg Arg	tac Tyr	atc Ile	ggt Val	cag Gln 345	cag Gln	acc Thr	cgc Arg	tgg Trp	agt Ser 350	aag Lys	tcg Ser	1056
tgg Trp	tgc Cys	cgc Arg 355	gaa Glu	att Ile	tgg Trp	tac Tyr	acc Thr 360	ctc Leu	ttc Phe	gcc Ala	gcg Ala	tgg Trp 365	aag Lys	cac His	ggt Gly	1104
ttg Leu	tct Ser 370	gga Gly	att Ile	tgg Trp	ctg Leu	gcc Ala 375	ttt Phe	gaa Glu	tgt Cys	ttg Leu	tat Tyr 380	caa Gln	att Ile	aca Thr	tac Tyr	1152
ttc Phe 385	ttc Phe	ctc Leu	gtg Val	att Ile	tac Tyr 390	ctc Leu	ttt Phe	tct Ser	cgc Arg	cta Leu 395	gcc Ala	ggt Val	gag Glu	gcc Ala	gac Asp 400	1200
cct Pro	cgc Arg	gcc Ala	cag Gln	aca Thr	gcc Ala	acg Thr	gtg Val	att Ile	gtg Val	agc Ser	acc Thr	acg Thr	ggt Val	gca Ala	ttg Leu	1248

ES 2 536 925 T3

405				410				415								
att Ile	aag Lys	tgt Cys	ggg Gly 420	tat Tyr	ttt Phe	tca Ser	ttc Phe	cga Arg 425	gcc Ala	aag Lys	gat Asp	att Ile	cgg Arg 430	gcg Ala	ttt Phe	1296
tac Tyr	ttt Phe	gtg Val 435	ctt Leu	tat Tyr	aca Thr	ttt Phe	gtt Val 440	tac Tyr	ttt Phe	ttc Phe	tgt Cys	atg Met 445	att Ile	ccg Pro	gcc Ala	1344
agg Arg	att Ile 450	act Thr	gca Ala	atg Met	atg Met	acg Thr 455	ctt Leu	tgg Trp	gac Asp	att Ile	ggc Gly 460	tgg Trp	ggt Gly	act Thr	cgc Arg	1392
ggt Gly 465	gga Gly	aac Asn	gag Glu	aag Lys	cct Pro 470	tcc Ser	gtt Val	ggc Gly	acc Thr	cgg Arg 475	gtc Val	gct Ala	ctg Leu	tgg Trp	gca Ala 480	1440
aag Lys	caa Gln	tat Tyr	ctc Leu	att Ile 485	gca Ala	tat Tyr	atg Met	tgg Trp	tgg Trp 490	gcc Ala	gcg Ala	gtt Val	ggt Val	ggc Gly 495	gct Ala	1488
gga Gly	ggt Val	tac Tyr	agc Ser 500	atc Ile	gtc Val	cat His	aac Asn	tgg Trp 505	atg Met	ttc Phe	gat Asp	tgg Trp	aat Asn 510	tct Ser	ctt Leu	1536
tct Ser	tat Tyr	cgt Arg 515	ttt Phe	gct Ala	ttg Leu	gtt Val	ggt Gly 520	att Ile	tgt Cys	tct Ser	tac Tyr	att Ile 525	ggt Val	ttt Phe	att Ile	1584
ggt Val	att Ile 530	gtg Val	ctg Leu	gtg Val	ggt Val	tat Tyr 535	ttc Phe	acc Thr	ggc Gly	aaa Lys	att Ile 540	acg Thr	act Thr	tgg Trp	aat Asn	1632
ttc Phe 545	acg Thr	aag Lys	ctt Leu	cag Gln	aag Lys 550	gag Glu	cta Leu	atc Ile	gag Glu	gat Asp 555	cgc Arg	ggt Val	ctg Leu	tac Tyr	gat Asp 560	1680
gca Ala	act Thr	acc Thr	aat Asn	gct Ala 565	cag Gln	tct Ser	gtg Val	tga								1707

<210> 2

<211> 568

5

<212> PRT

<213> Virus 1 de *Paramecium bursaria* de *Chlorella*

<400> 2

ES 2 536 925 T3

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  
Val Leu Phe Ser Glu Leu Asn Arg Lys Arg Leu Arg Lys Trp Ile Ser  
65 70 75 80

ES 2 536 925 T3

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  
 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  
 385 390 395 400  
 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

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

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

<400> 3

```

atgggtaaga acattatcat tatgggtgcc tggtagacaaa ttattacaag taatctcatc      60
gcagttgggtg gtgcatctct tattctcgcct ccagctatca ctggatatgt tcttcactgg      120
aacatcgccc tctcaactat ttggggagtt tccgcatatg gtatTTTTgt tttcgggttc      180
TTTTTggctc aggttctgtt ctcagagctc aatcgtaaga gactcaggaa gtggattagc      240
cttagaccaa aggggtggaa tgacgttcgt ctcgctgtca ttatcgcctg 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 atatctgcgt 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 tcctttggga      840
gcttacaanaa ttgatatcat caaggagatt aaggacccat ggattagtca aaggtttctt      900
ggtcagaagt gcacttatgg cgatgatcgt agattgacta acgaaatcct tatgaggggc      960
aagaaagtcg tttttactcc atttgctgtc ggatgggtctg attcacctac aaatgttttc     1020
cgttatattg tgcaacaaac acgttggagt aagagctggg gtagggagat ctggtacact     1080
ttgttcgctg cttggaagca cgggcttagc ggaatTTTggc ttgcttttga atgcctttac     1140
cagattacat actttttctt ggtgatctat ttgttttcac gtcttgccgt cgaggctgac     1200
cctagagcac agactgcaac tgtgattggt tctactacag tcgcacttat taagtgtggc     1260
tatttcagtt ttagagcaaa agatattaga gccttctatt ttgttttTga cacatttgtt     1320
tatttctttt gcatgattcc agctcgtatt accgctatga tgaccttgtg ggacatcgga     1380
tggggaacta gaggtggtaa cgaaaagcct tctgtgggaa caagggtggc cttttgggca     1440
aaacaatata tcatcgccta catgtgggtg gccgctgtcg ttgggtgccgg agtgtactca     1500
atcgttcata actggatggt tgactggaac tctttgagct atcgtttcgc tcttTgtggg     1560
atTTgttctt acattgTTTT catcgtgatt gtgctcgttg tgtatttcac tggtaaaatc     1620
acaacctgga atttactaa acttcaaaag gaattgattg aagacagggt tctgtatgat     1680
gctactacca acgcccagtc agtttaa                                     1707

```

5

<210> 4

<211> 2298

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

ES 2 536 925 T3

<220>

<221> CDS

<222> (150)..(2192)

5

<220>

<221> alelo

<222> (1190)..(1190)

10

<223> Secuencia insertada en el plásmido IC 365-256 que contiene un cambio de la base T a C en la posición 1190

<220>

<221> alelo

<222> (2027)..(2027)

15

<223> Secuencia insertada en el plásmido IC 365-256 que contiene un cambio de la base G a A en la posición 2027

<300>

<308> BC050762.1

20

<309> 08-03-2005

<313> (150)..(2195)

<400> 4

gagagcgaag cgagcgtga gtcggactgt cgggtctgag ctgtcgcatac ccagagtcct	60
ctcattgccca ccaccccggc ccgagctcac cctcgtcttct gaagctctcc gcgcgcccga	120
cagctcagcc 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 40	
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
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	
105 110 115 120	
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	
125 130 135	
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	
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	
155 160 165	
agt ttt acc acc ttg gtg gag aga gtt atc caa caa ttg gaa ggc gcc	701

ES 2 536 925 T3

Ser	Phe	Thr	Thr	Leu	Val	Glu	Arg	Val	Ile	Gln	Gln	Leu	Glu	Gly	Ala		
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	ggt	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	ggt	gag	gaa	aag	gca	ggt	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		250
	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		265
					270					275					280		
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		285
				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		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		315
		315					320					325					
att	ttt	gag	cag	cca	gaa	tct	ggt	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		330
						335					340						
aat	ttt	gat	gac	tac	act	gtg	aat	ttg	gga	ggt	ttg	aaa	gat	cac	att		1229
Asn	Phe	Asp	Asp	Tyr	Thr	Val	Asn	Leu	Gly	Gly	Leu	Lys	Asp	His	Ile		345
					350					355					360		
aag	gag	atc	cag	cgg	tgt	cgg	cgg	ttg	att	ctt	att	gct	tgt	ggc	aca		1277
Lys	Glu	Ile	Gln	Arg	Cys	Arg	Arg	Leu	Ile	Leu	Ile	Ala	Cys	Gly	Thr		365
				365					370					375			
agt	tac	cac	gct	ggt	gtg	gca	acc	cgt	cag	gtc	ctg	gag	gag	ctg	acc		1325
Ser	Tyr	His	Ala	Gly	Val	Ala	Thr	Arg	Gln	Val	Leu	Glu	Glu	Leu	Thr		380
			380					385					390				
gag	ctg	ccc	gtg	atg	gtg	gag	ctt	gcc	agt	gac	ttc	ttg	gat	aga	aac		1373
Glu	Leu	Pro	Val	Met	Val	Glu	Leu	Ala	Ser	Asp	Phe	Leu	Asp	Arg	Asn		395
		395				400						405					
act	cca	gtc	ttt	cga	gat	gat	ggt	tgc	ttt	ttc	att	agt	caa	tca	ggc		1421
Thr	Pro	Val	Phe	Arg	Asp	Asp	Val	Cys	Phe	Phe	Ile	Ser	Gln	Ser	Gly		410
						415					420						
gag	aca	gct	gac	acc	ctg	atg	gga	ctt	cgt	tac	tgt	aag	gag	aga	gga		1469
Glu	Thr	Ala	Asp	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Arg	Tyr	Cys	Lys	Glu	Arg	Gly		425
					430					435					440		
gcc	tta	act	gtg	ggg	atc	aca	aat	aca	gtc	ggc	agt	tct	ata	tca	agg		1517

ES 2 536 925 T3

Ala	Leu	Thr	Val	Gly	Ile	Thr	Asn	Thr	Val	Gly	Ser	Ser	Ile	Ser	Arg	
				445					450					455		
gag	aca	gat	tgc	ggg	ggt	cat	att	aat	gct	ggt	cct	gag	att	ggc	gtg	1565
Glu	Thr	Asp	Cys	Gly	Val	His	Ile	Asn	Ala	Gly	Pro	Glu	Ile	Gly	Val	
			460					465					470			
gcc	agt	aca	aag	gca	tac	acc	agc	cag	ttt	gtg	tcc	ctc	gtg	atg	ttt	1613
Ala	Ser	Thr	Lys	Ala	Tyr	Thr	Ser	Gln	Phe	Val	Ser	Leu	Val	Met	Phe	
		475					480					485				
gct	ctc	atg	atg	tgt	gat	gac	agg	atc	tcc	atg	caa	gag	aga	cgc	aaa	1661
Ala	Leu	Met	Met	Cys	Asp	Asp	Arg	Ile	Ser	Met	Gln	Glu	Arg	Arg	Lys	
	490					495					500					
gag	atc	atg	ctc	gga	ctg	aag	cga	ctg	ccg	gac	ttg	att	aag	gaa	gtg	1709
Glu	Ile	Met	Leu	Gly	Leu	Lys	Arg	Leu	Pro	Asp	Leu	Ile	Lys	Glu	Val	
	505				510					515					520	
ctg	agc	atg	gat	gat	gaa	atc	cag	aag	ctg	gcg	acg	gag	ctt	tac	cac	1757
Leu	Ser	Met	Asp	Asp	Glu	Ile	Gln	Lys	Leu	Ala	Thr	Glu	Leu	Tyr	His	
				525					530					535		
cag	aag	tcg	gtc	ctg	ata	atg	ggg	cgg	ggc	tac	cat	tat	gct	aca	tgc	1805
Gln	Lys	Ser	Val	Leu	Ile	Met	Gly	Arg	Gly	Tyr	His	Tyr	Ala	Thr	Cys	
			540					545					550			
ctt	gaa	ggg	gct	ctg	aaa	atc	aag	gag	att	act	tat	atg	cat	tcg	gaa	1853
Leu	Glu	Gly	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys	Glu	Ile	Thr	Tyr	Met	His	Ser	Glu	
		555					560					565				
ggc	atc	ctt	gct	ggt	gag	ctc	aag	cac	ggc	cct	ctg	gcc	ttg	gtg	gac	1901
Gly	Ile	Leu	Ala	Gly	Glu	Leu	Lys	His	Gly	Pro	Leu	Ala	Leu	Val	Asp	
	570					575					580					
aag	ttg	atg	cct	gtc	atc	atg	atc	atc	atg	cga	gac	cac	act	tat	gcc	1949
Lys	Leu	Met	Pro	Val	Ile	Met	Ile	Ile	Met	Arg	Asp	His	Thr	Tyr	Ala	
	585				590					595					600	
aag	tgc	cag	aac	gct	ctt	cag	cag	gtg	ggt	gca	cgg	cag	ggg	cgt	cca	1997
Lys	Cys	Gln	Asn	Ala	Leu	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Arg	Gln	Gly	Arg	Pro	
			605						610					615		
gtc	gtg	atc	tgt	gat	aag	gag	gat	act	gag	acc	att	aag	aat	aca	aaa	2045
Val	Val	Ile	Cys	Asp	Lys	Glu	Asp	Thr	Glu	Thr	Ile	Lys	Asn	Thr	Lys	
			620					625					630			
agg	aca	atc	aag	gtg	ccc	cac	tca	gtg	gac	tgc	ttg	cag	ggc	att	ctc	2093
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	ggt	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	tttgatttaa	actatcaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa											2298

<210> 5

<211> 681

5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 5

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 60

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

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

ES 2 536 925 T3

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  
 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

ES 2 536 925 T3

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> 6

<211> 2049

5

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

10

<222> (1)..(2046)

<300>

<308> BC031928.1

<309> 07-10-2003

15

<313> (51)..(299)

<400> 6

ES 2 536 925 T3

atg	tgc	gga	atc	ttt	gcc	tac	atg	aat	tac	aga	ggt	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	ggt	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				

ES 2 536 925 T3

gtc Val	aaa Lys 50	gaa Glu	aga Arg	cac His	atc Ile	cat His 55	ctt Leu	gtg Val	aag Lys	aaa Lys	agg Arg 60	ggg Gly	aaa Lys	gta Val	aag Lys	192
gct Ala 65	ctg Leu	gat Asp	gaa Glu	gaa Glu	ctt Leu 70	tac Tyr	aag Lys	caa Gln	gat Asp	agc Ser 75	atg Met	gac Asp	ttg Leu	aag Lys	gtg Val 80	240
gag Glu	ttt Phe	gag Glu	aca Thr	cac His 85	ttc Phe	ggc Gly	att Ile	gcc Ala	cac His 90	aca Thr	cgt Arg	tgg Trp	gcc Ala	acc Thr 95	cac His	288
ggg Gly	gtt Val	ccc Pro	aat Asn 100	gct Ala	gtc Val	aac Asn	agt Ser	cac His 105	ccg Pro	cag Gln	cgt Arg	tcg Ser	gac Asp 110	aaa Lys	gac Asp	336
aat Asn	gaa Glu	ttt Phe 115	gtt Val	gtc Val	atc Ile	cac His	aac Asn 120	ggg Gly	atc Ile	atc Ile	act Thr	aat Asn 125	tac Tyr	aag Lys	gat Asp	384
cta Leu	agg Arg 130	aag Lys	ttt Phe	ctg Leu	gaa Glu	agc Ser 135	aaa Lys	ggc Gly	tac Tyr	gag Glu	ttt Phe 140	gag Glu	tca Ser	gaa Glu	aca Thr	432
gac Asp 145	acg Thr	gag Glu	acc Thr	atc Ile	gcc Ala 150	aag Lys	ctg Leu	att Ile	aaa Lys	tat Tyr 155	gta Val	ttt Phe	gac Asp	aac Asn	aga Arg 160	480
gag Glu	act Thr	gag Glu	gac Asp	ata Ile 165	acg Thr	ttt Phe	tcc Ser	aca Thr	ttg Leu 170	gtc Val	gaa Glu	aga Arg	gtc Val	att Ile 175	cag Gln	528
cag Gln	ttg Leu	gaa Glu	ggc Gly 180	gcc Ala	ttt Phe	gca Ala	ctg Leu	gtt Val 185	ttc Phe	aag Lys	agt Ser	att Ile	cac His 190	tac Tyr	ccg Pro	576
gga Gly	gaa Glu	gct Ala 195	gtc Val	gcc Ala	acg Thr	agg Arg	aga Arg 200	ggc Gly	agc Ser	ccc Pro	ttg Leu	ctc Leu 205	atc Ile	ggg Gly	gta Val	624
cga Arg	agc Ser 210	aaa Lys	tac Tyr	aaa Lys	ctc Leu	tcc Ser 215	aca Thr	gag Glu	cag Gln	atc Ile	ccc Pro 220	gtc Val	tta Leu	tat Tyr	ccg Pro	672
aca Thr 225	tgc Cys	aat Asn	atc Ile	gag Glu	aat Asn 230	gtg Val	aag Lys	aat Asn	atc Ile	tgc Cys 235	aag Lys	act Thr	agg Arg	atg Met	aag Lys 240	720
aga Arg	ctg Leu	gac Asp	agc Ser	tcc Ser 245	acc Thr	tgc Cys	ctg Leu	cac His	gct Ala 250	gtg Val	ggc Gly	gat Asp	aaa Lys	gct Ala 255	gtg Val	768
gaa Glu	ttc Phe	ttc Phe	ttt Phe 260	gct Ala	tct Ser	gat Asp	gca Ala	agt Ser 265	gcc Ala	atc Ile	ata Ile	gaa Glu	cac His 270	acc Thr	aac Asn	816
cgg Arg	gtc Val	atc Ile	ttc Phe	tta Leu	gaa Glu	gat Asp	gat Asp 280	gat Asp	atc Ile	gct Ala	gca Ala	gtg Val 285	gct Ala	gat Asp	ggg Gly	864
aaa Lys 290	ctc Leu	tcc Ser	att Ile	cac His	cga Arg 295	gtc Val	aag Lys	cgc Arg	tca Ser	gct Ala	act Thr 300	gat Asp	gac Asp	ccc Pro	tcc Ser	912
cga Arg 305	gcc Ala	atc Ile	cag Gln	acc Thr	ttg Leu 310	cag Gln	atg Met	gaa Glu	ctg Leu	cag Gln 315	caa Gln	ata Ile	atg Met	aaa Lys	ggg Gly 320	960

ES 2 536 925 T3

aac Asn	ttc Phe	agc Ser	gca Ala	ttt Phe 325	atg Met	cag Gln	aag Lys	gag Glu	atc Ile 330	ttc Phe	gag Glu	cag Gln	cca Pro	gaa Glu 335	tca Ser	1008
gtt Val	ttt Phe	aat Asn	acc Thr 340	atg Met	aga Arg	ggt Gly	cgg Arg	gtg Val 345	aat Asn	ttt Phe	gag Glu	acc Thr	aac Asn 350	aca Thr	gtg Val	1056
ctc Leu	ctg Leu	ggt Gly 355	ggc Gly	ttg Leu	aag Lys	gac Asp	cat His 360	ttg Leu	aaa Lys	gag Glu	atc Ile	cga Arg 365	cga Arg	tgc Cys	cga Arg	1104
agg Arg	ctc Thr 370	att Ile	gtg Val	att Ile	ggc Gly	tgt Cys 375	gga Gly	acc Thr	agc Ser	tac Tyr	cat His 380	gcc Ala	gct Ala	gtg Val	gct Ala	1152
aca Thr 385	cgg Arg	caa Gln	gtc Val	tta Leu	gag Glu 390	gaa Glu	ctg Leu	acc Thr	gag Glu	ctg Leu 395	cct Pro	gtg Val	atg Met	gtt Val	gaa Glu 400	1200
ctt Leu	gcc Ala	agt Ser	gac Asp	ttt Phe 405	ctg Leu	gac Asp	agg Arg	aac Asn	aca Thr 410	cct Pro	gtg Val	ttc Phe	agg Arg	gat Asp 415	gac Asp	1248
gtt Val	tgc Cys	ttt Phe	ttc Phe 420	ata Ile	agc Ser	caa Gln	tca Ser	ggt Gly 425	gag Glu	act Thr	gca Ala	gac Asp	acg Thr 430	ctc Leu	ctg Leu	1296
gcg Ala	ctg Leu	cga Arg 435	tac Tyr	tgt Cys	aag Lys	gat Asp	cga Arg 440	ggt Gly	gcg Ala	ctg Leu	acc Thr	gtg Val 445	ggc Gly	atc Ile	acc Thr	1344
aac Asn	acc Thr 450	gtg Val	ggt Gly	agc Ser	tcc Ser	atc Ile 455	tcc Ser	cgg Arg	gag Glu	act Thr	gac Asp 460	tgt Cys	ggc Gly	gtc Val	cac His	1392
atc Ile 465	aac Asn	gca Ala	ggg Gly	ccc Pro	gag Glu 470	att Ile	ggg Gly	gtg Val	gcc Ala	agc Ser 475	acc Thr	aag Lys	gcg Ala	tac Tyr	acc Thr 480	1440
agc Ser	cag Gln	ttc Phe	atc Ile	tct Ser 485	ctg Leu	gtg Val	atg Met	ttt Phe	ggt Gly 490	ttg Leu	atg Met	atg Met	tct Ser	gaa Glu 495	gat Asp	1488
cga Arg	att Ile	tct Ser	cta Leu 500	cag Gln	aac Asn	agg Arg	aga Arg	caa Gln 505	gag Glu	atc Ile	atc Ile	cgt Arg	ggc Gly 510	ctc Leu	aga Arg	1536
tct Ser	tta Leu	ccg Pro 515	gag Glu	ctg Leu	atc Ile	aaa Lys	gaa Glu 520	gtg Val	ctg Leu	tcc Ser	ctg Leu	gat Asp 525	gag Glu	aag Lys	atc Ile	1584
cat His 530	gac Asp	ttg Leu	gcc Ala	ctg Leu	gag Glu	ctc Leu	tac Tyr	aca Thr	caa Gln	agg Arg	tct Ser 540	ctc Leu	ctc Leu	gtg Val	atg Met	1632
gga Gly 545	cgg Arg	gga Gly	tat Tyr	aac Asn	tat Tyr 550	gcc Ala	aca Thr	tgt Cys	ctg Leu	gaa Glu 555	ggt Gly	gcc Ala	ttg Leu	aaa Lys	att Ile 560	1680
aag Lys	gag Glu	ata Ile	acc Thr	tac Tyr 565	atg Met	cat His	tca Ser	gaa Glu	ggt Gly 570	atc Ile	cta Leu	gcc Ala	gga Gly	gag Glu 575	ctg Leu	1728
aag Lys	cac His	ggg Gly	ccc Pro 580	ctt Leu	gct Ala	ctc Leu	gtc Val	gac Asp 585	aag Lys	cag Gln	atg Met	cca Pro	gtc Val 590	atc Ile	atg Met	1776

ES 2 536 925 T3

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> 7

<211> 682

5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 7

ES 2 536 925 T3

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  
 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

ES 2 536 925 T3

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  
 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

ES 2 536 925 T3

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  
 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  
 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

<210> 8

<211> 1830

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<220>

5

<221> CDS

<222> (1)..(1827)

<300>

<308> U00096.2

10

<309> 08-09-2005

<313> (3909862)..(3911691)

<400> 8

ES 2 536 925 T3

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

ES 2 536 925 T3

gag Glu	ggc Gly 210	gat Asp	att Ile	gcg Ala	gaa Glu	atc Ile 215	act Thr	cgc Arg	cgt Arg	tcg Ser	gta Val 220	aac Asn	atc Ile	ttc Phe	gat Asp	672
aaa Lys 225	act Thr	ggc Gly	gcg Ala	gaa Glu	gta Val 230	aaa Lys	cgt Arg	cag Gln	gat Asp	atc Ile 235	gaa Glu	tcc Ser	aat Asn	ctg Leu	caa Gln 240	720
tat Tyr	gac Asp	gcg Ala	ggc Gly	gat Asp 245	aaa Lys	ggc Gly	att Ile	tac Tyr	cgt Arg 250	cac His	tac Tyr	atg Met	cag Gln	aaa Lys 255	gag Glu	768
atc Ile	tac Tyr	gaa Glu	cag Gln 260	ccg Pro	aac Asn	gcg Ala	atc Ile	aaa Lys 265	aac Asn	acc Thr	ctt Leu	acc Thr	gga Gly 270	cgc Arg	atc Ile	816
agc Ser	cac His	ggt Gly 275	cag Gln	ggt Val	gat Asp	tta Leu	agc Ser 280	gag Glu	ctg Leu	gga Gly	ccg Pro	aac Asn 285	gcc Ala	gac Asp	gaa Glu	864
ctg Leu 290	ctg Leu	tcg Ser	aag Lys	ggt Val	gag Glu	cat His 295	att Ile	cag Gln	atc Ile	ctc Leu	gcc Ala 300	tgt Cys	ggt Gly	act Thr	tct Ser	912
tat Tyr 305	aac Asn	tcc Ser	ggt Gly	atg Met	ggt Val 310	tcc Ser	cgc Arg	tac Tyr	tgg Trp	ttt Phe 315	gaa Glu	tcg Ser	cta Leu	gca Ala	ggt Gly 320	960
att Ile	ccg Pro	tgc Cys	gac Asp	gtc Val 325	gaa Glu	atc Ile	gcc Ala	tct Ser	gaa Glu 330	ttc Phe	cgc Arg	tat Tyr	cgc Arg	aaa Lys 335	tct Ser	1008
gcc Ala	gtg Val	cgt Arg	cgt Arg 340	aac Asn	agc Ser	ctg Leu	atg Met	atc Ile 345	acc Thr	ttg Leu	tca Ser	cag Gln	tct Ser 350	ggc Gly	gaa Glu	1056
acc Thr	gcg Ala	gat Asp 355	acc Thr	ctg Leu	gct Ala	ggc Gly	ctg Leu 360	cgt Arg	ctg Leu	tcg Ser	aaa Lys	gag Glu 365	ctg Leu	ggt Gly	tac Tyr	1104
ctt Leu 370	ggt Gly	tca Ser	ctg Leu	gca Ala	atc Ile	tgt Cys 375	aac Asn	ggt Val	ccg Pro	ggt Gly	tct Ser 380	tct Ser	ctg Leu	gtg Val	cgc Arg	1152
gaa Glu 385	tcc Ser	gat Asp	ctg Leu	gcg Ala	cta Leu 390	atg Met	acc Thr	aac Asn	gcg Ala	ggt Gly 395	aca Thr	gaa Glu	atc Ile	ggc Gly	gtg Val 400	1200
gca Ala	tcc Ser	act Thr	aaa Lys	gca Ala 405	ttc Phe	acc Thr	act Thr	cag Gln	tta Leu 410	act Thr	gtg Val	ctg Leu	ttg Leu	atg Met 415	ctg Leu	1248
gtg Val	gcg Ala	aag Lys	ctg Leu 420	tct Ser	cgc Arg	ctg Leu	aaa Lys	ggt Gly 425	ctg Leu	gat Asp	gcc Ala	tcc Ser	att Ile 430	gaa Glu	cat His	1296
gac Asp	atc Ile	gtg Val 435	cat His	ggt Gly	ctg Leu	cag Gln	gcg Ala 440	ctg Leu	ccg Pro	agc Ser	cgt Arg	att Ile 445	gag Glu	cag Gln	atg Met	1344
ctg Leu 450	tct Ser	cag Gln	gac Asp	aaa Lys	cgc Arg	att Ile 455	gaa Glu	gcg Ala	ctg Leu	gca Ala	gaa Glu 460	gat Asp	ttc Phe	tct Ser	gac Asp	1392
aaa Lys 465	cat His	cac His	gcg Ala	ctg Leu	ttc Phe 470	ctg Leu	ggc Gly	cgt Arg	ggc Gly	gat Asp 475	cag Gln	tac Tyr	cca Pro	atc Ile	gcg Ala 480	1440

ES 2 536 925 T3

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	
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> 9

<211> 609

5

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 9

ES 2 536 925 T3

Met Cys Gly Ile Val Gly Ala Ile Ala Gln Arg Asp Val Ala Glu Ile  
1 5 10 15  
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 95

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  
 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  
 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> 10

<211> 1830

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

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

5

<400> 10

```

atgtgcggaa ttgttgggtc tatcgcccaa agagacgttg ctgagatfff gttagagggt      60
ctgcgaaggc tagagtatag aggatatgac tccgctggtc tggctgtcgt tgatgctgag     120
ggcatatga caaggctaag aaggttagga aaggttcaga tgcttgctca ggcagctgag     180
gaacatccat tgcattggagg tactgggtatt gcacatacca ggtgggctac tcatggggag     240
ccatcagaag ttaatgctca tccacatgtg agtgagcata tcgttgtagt tcacaatggg     300
ataattgaaa accacgaacc attgagggaa gagttaaagg caagaggata tacttttgtg     360
agtgagactg aactgaggt tattgcacat ttagtgaact gggaaactcaa acaggggggc     420
acattgcgtg aggctgtgtt aagagctatt cctcaactta gaggtgcata cggtactggt     480
attatggatt caagacacc agatactctc cttgcagcta gatcaggtag tcccttggtc     540
ataggacttg gaatgggtga aaatfttatc gctagcgacc aattggcctt attgccagtt     600
acaagacgat ttattttcct tgaagagggc gatattgctg agattactag aaggctctgtg     660
aacatctttg ataagactgg cgctgagggt aaacgtcagg atatcgagtc taaccttcaa     720
tacgatgctg gtgataaagg aatttacagg cattatatgc aaaaggaaat ttatgaacaa     780
ccaaatgcta tcaaaaacac acttactggc cgtatttctc atggacaggt cgatttaagc     840
gagcttggtc ctaatgcaga cgaactgcta tcaaaagttg agcacatata gatactggca     900
tgcggaacta gttataattc aggaatggtc tctagatact ggttcgaaag cttggcaggt     960
ataccttgtg atgtagagat cgcttctgag tttagggtata gaaagtctgc tgtgcgtaga    1020
aattcattaa tgattacatt atctcaatcc ggagaaacag cagatacact ggctggattg    1080
aggctttcta aggaactcgg atatctgggt tcacttgcta tttgtaatgt accaggttcc    1140
tcattggttc gtgaatcaga tctagcactt atgacaaatg caggaactga aataggtgtg    1200
gcaagtacca aggctttcac aaccctactg accgtacttt taatgttggt agcaaaactc    1260
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 agcatggtcc tttggcactc atcgacgctg acatgcccggt gatcgtagtg    1560
gctcctaata acgaactgct cgaaaagctt aaatcaaata tcgaagaggt tcgagctaga    1620
ggaggtcagc ttacgtttt cgctgaacaa gatgctggat tcgtgtcaag cgataaatg    1680
catataattg aaatgcctca cgttgaagaa gtgattgcac ctatatttta tacagtccca    1740
ttgcaacttc tagcttacca tgttgcactt attaaaggaa ctgatgttga tcagcctaga    1800
aacctagcaa aatctgtaac agtcgaataa
    1830

```

## ES 2 536 925 T3

<210> 11  
<211> 48  
<212> ADN  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido sintético

10 <400> 11  
tcgacaggcc tggatcctta attaaactag tctcgaggag ctcggtac 48

<210> 12  
<211> 40  
15 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido sintético

20 <400> 12  
cgagctctc gagactagtt taattaagga tccaggcctg 40

<210> 13  
25 <211> 38  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
30 <223> oligonucleótido sintético usado como cebador

<400> 13  
aaaaactagt tctacatcgg ctaggtgta gcaacacg 38

35 <210> 14  
<211> 39  
<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético usado como cebador

5

<400> 14

aaaagatc tgtgttga ttctactact atgctcaa 39

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula vegetal modificada genéticamente que tiene una molécula de ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa integrada de manera estable en su genoma, teniendo dicha célula vegetal además una molécula de ácido nucleico foránea integrada de manera estable en su genoma, codificando dicha molécula de ácido nucleico foránea una proteína que tiene la actividad de una glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT) y teniendo la célula vegetal una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad de una glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT) en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente.
- 10 2. La célula vegetal modificada genéticamente según lo reivindicado en 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 no tienen actividad aumentada de una glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT).
3. Una planta que comprende células vegetales modificadas genéticamente según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
- 15 4. Material de propagación de plantas según lo reivindicado en la reivindicación 3 que comprende células vegetales modificadas genéticamente según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
5. Partes vegetales cosechables de plantas según lo reivindicado en la reivindicación 3 que comprenden células vegetales modificadas genéticamente según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
6. Un procedimiento de producción de una planta que sintetiza hialuronano que comprende:
  - 20 a) modificar genéticamente una célula vegetal, comprendiendo la modificación genética las siguientes etapas i a ii:
    - i) la introducción de una molécula de ácido nucleico foránea que codifica una hialuronano sintasa en la célula vegetal;
    - 25 ii) la introducción de una modificación genética en la célula vegetal que da lugar a un aumento de la actividad de una proteína que tiene la actividad enzimática de una glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT) en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente; en el que la modificación genética es la introducción de una molécula de ácido nucleico foránea que codifica una proteína que tiene la actividad de una glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT) en la célula vegetal,
    - 30 en el que las etapas i a ii se pueden llevar a cabo en cualquier orden, individualmente, o se puede llevar a cabo cualquier combinación de las etapas i a ii simultáneamente;
  - b) regenerar una planta a partir de células vegetales de la etapa a); en el que, si es apropiado, las células vegetales se aíslan de plantas obtenidas de acuerdo con la etapa b) i o b) ii, y las etapas a) a b) del procedimiento se repiten hasta que se genera una planta que tiene una molécula de ácido nucleico foránea que codifica una hialuronano sintasa y que tiene una actividad aumentada de una proteína que tiene la actividad enzimática de una GFAT en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo natural no modificadas genéticamente.
- 35 7. Un procedimiento de preparación de hialuronano que comprende la etapa de extraer hialuronano de células vegetales modificadas genéticamente según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, de plantas según lo reivindicado en la reivindicación 3, de material de propagación según lo reivindicado en la reivindicación 4, de partes cosechables de plantas según lo reivindicado en la reivindicación 5 o de plantas que se pueden obtener mediante el procedimiento según lo reivindicado en la reivindicación 6.
- 40 8. Uso de una célula vegetal modificada genéticamente según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, una planta según lo reivindicado en la reivindicación 3, material de propagación según lo reivindicado en la reivindicación 4, partes cosechables de plantas según lo reivindicado en la reivindicación 5 o de plantas que se pueden obtener mediante un procedimiento según lo reivindicado en la reivindicación 6 de preparación de hialuronano.
- 45 9. Una composición que comprende células vegetales modificadas genéticamente según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 y que comprende moléculas de ácidos nucleicos recombinantes **caracterizadas porque** las moléculas de ácidos nucleicos comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican una hialuronano sintasa y proteínas que tienen la actividad de una glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT).
- 50 10. Un procedimiento de preparación de una composición que comprende hialuronano, en el que se usan células vegetales modificadas genéticamente según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, plantas según lo reivindicado en la reivindicación 3, material de propagación según lo reivindicado en la reivindicación 4, partes cosechables de plantas según lo reivindicado en la reivindicación 5 o plantas que se pueden obtener
- 55

mediante un procedimiento según lo reivindicado en la reivindicación 6.

5 11. El uso de células vegetales modificadas genéticamente según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, de plantas según lo reivindicado en la reivindicación 3, de material de propagación según lo reivindicado en la reivindicación 4, de partes cosechables de plantas según lo reivindicado en la reivindicación 5 o de plantas que se pueden obtener mediante un procedimiento según lo reivindicado en la reivindicación 6 para la preparación de una composición según lo reivindicado en la reivindicación 9.

12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 que comprende una etapa adicional c) en la que se regeneran plantas adicionales mediante propagación vegetativa usando las plantas de la etapa b).

10

15

20

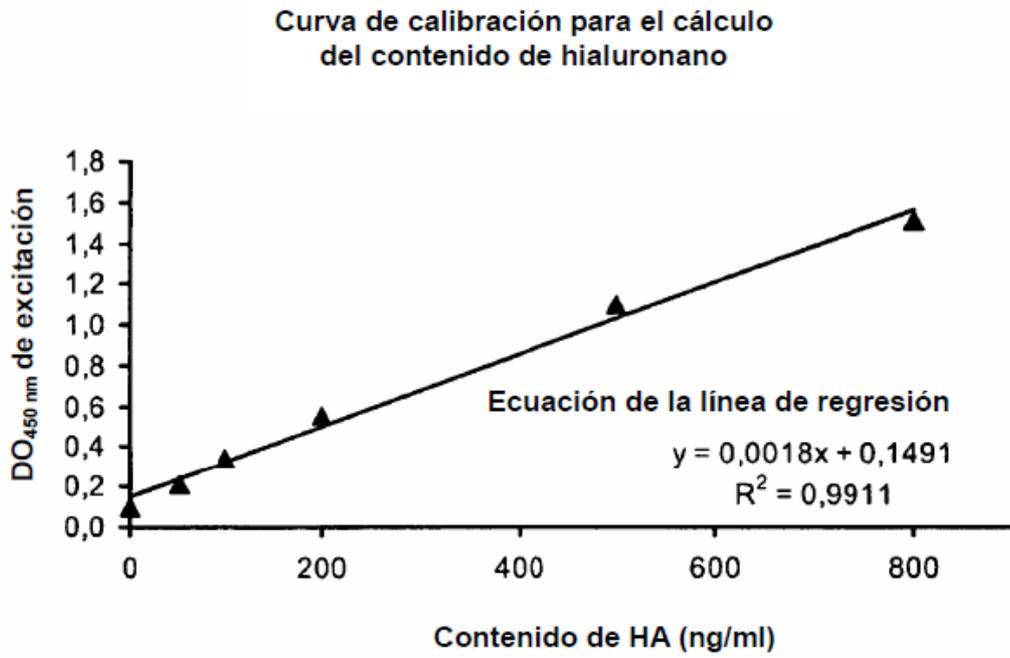


Fig. 1