

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 109**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2016** **PCT/GB2016/051887**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016** **WO16207643**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2016** **E 16738208 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2024** **EP 3313988**

54 Título: **Producción de noscapina**

30 Prioridad:

24.06.2015 GB 201511156

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.09.2024

73 Titular/es:

**SUN PHARMACEUTICAL INDUSTRIES
AUSTRALIA LIMITED (50.0%)
1 Acacia Place
Notting Hill, Victoria 3168, AU y
THE UNIVERSITY OF YORK (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WINZER, THILO;
GRAHAM, IAN y
WALKER, TRACY**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 978 109 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

Producción de noscapina

5 Campo de la Invención

Esta descripción se refiere a plantas productoras de alto contenido de noscapina que comprenden una copia funcional, o no funcional o parcialmente funcional de una citocromo P450-oxidoreductasa que cataliza la conversión de (S)-reticulina a (R)-reticulina en plantas del género *Papaver*.

10

Antecedentes de la descripción

Papaver somniferum, la amapola de opio, es una fuente de alcaloides opiáceos de utilidad clínica tales como morfina, codeína, tebaina, noscapina y papaverina. Los alcaloides opiáceos tienen una amplia aplicación clínica que varía desde analgésicos hasta supresores de la tos y antiespasmódicos, y se conocen por inducir dependencias físicas.

15

Los alcaloides opiáceos son estructuralmente diversos con la cadena principal estructural proporcionada por la bencilisoquinolina e incluyen compuestos tales como papaverina, noscapina, codeína, apomorfina, bernierina y sanguinarina. Los alcaloides de bencilisoquinolina pueden agruparse adicionalmente en base a su estructura química en alcaloides de morfina y de fitaldoisoquinolina. La morfina, la codeína y la tebaina son ejemplos de morfina, mientras que la papaverina y la noscapina pertenecen a la clase de fitaldoisoquinolinas. A diferencia de los morfina, la noscapina no tiene propiedades analgésicas, pero encontró su aplicación como supresor de la tos y actúa como un potente agente antitumoral que se une a la tubulina, lo que inhibe su polimerización, detiene la división celular e induce la apoptosis. La actividad antitumoral de la noscapina y sus derivados se demostró en varias formas de cáncer. Curiosamente, a diferencia de la mayoría de los otros alcaloides opiáceos, la noscapina no induce dependencias físicas.

20

25

Los alcaloides de bencilisoquinolina se encuentran en una serie de especies en la familia Papaveraceae, pero la producción de morfina solo se ha informado en la amapola de opio y el *P. setigerum* estrechamente relacionado. La síntesis química total, aunque es posible, no es un medio de producción económicamente viable. En consecuencia, los alcaloides de morfina aún se obtienen exclusivamente de la planta de amapola de opio. Aunque la biosíntesis de morfina se ha estudiado extensamente durante los últimos 25 años y se ha identificado la mayoría de los genes en la vía, los genes implicados en la primera etapa de la síntesis de morfina, la epimerización de (S) a (R)-reticulina, requerida para el desarrollo de una producción eficiente y económica viable de morfina en sistemas basados en microbios se han descubierto recientemente en *P. somniferum* y se describen en la solicitud de patente PCT/GB2015/051446 (WO2015173590). La (S)-reticulina se transforma en (R)-reticulina por medio de 1,2-deshidrorreticulina por una proteína de fusión que codifica un módulo de citocromo P450 y uno de oxidoreductasa, esta última pertenece a la familia de aldo-ceto-reductasas. El análisis de metabolitos de alelos mutantes y la expresión heteróloga demuestran que el módulo de P450 es responsable de la conversión de (S)-reticulina a 1,2-deshidrorreticulina mientras que el módulo de oxidoreductasa convierte 1,2-deshidrorreticulina en (R)-reticulina en lugar de funcionar como una pareja redox del P450. Una proteína de fusión similar que cataliza la conversión de (S)-a (R)-reticulina también se ha descrito en el documento WO 2015/081437.

30

35

40

Igualmente, la síntesis de noscapina solo se ha informado en una serie de especies de *Papaver*. El nivel de noscapina en variedades con alto contenido de noscapina es típicamente menos del 3 % del peso en seco de la cápsula (que corresponde a una concentración de noscapina de menos del 60 % del contenido total de alcaloides de bencilisoquinolina) y relativamente bajo y en comparación con los niveles de morfina que constituyen más del 41 % del peso en seco de la cápsula. Los documentos WO2009/143574 y WO2009/109012 describen *P. somniferum* con concentraciones de noscapina basadas en la concentración de alcaloides en paja de amapola de entre 0,1 y un máximo de 3,1 %. Se descubrió que la producción de noscapina requiere la presencia de un grupo complejo de genes expresados conjuntamente que comprenden principalmente citocromo P450 y metiltransferasas convertidoras de escoulerina por medio de varias etapas en noscapina y se describe en el documento US2015/0004659.

45

50

Esta descripción se refiere a la identificación y caracterización de plantas de amapola de opio con alto contenido de noscapina que comprenden una versión no funcional de la proteína de fusión P450-oxidoreductasa implicada en la conversión de (S) a (R)-reticulina. Las plantas que tienen el gen mutado tienen concentraciones de noscapina mejoradas de más del 3 % de noscapina del peso en seco de la cápsula (más de al menos 50 % de noscapina del contenido total de alcaloides de bencilisoquinolina). Las plantas de amapola que comprenden el gen de fusión modificado o plantas modificadas genéticamente que tienen una expresión nula o reducida del gen de fusión de tipo silvestre proporcionan una fuente alternativa más eficiente de noscapina.

55

60

Declaraciones de la invención

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una planta del género *Papaver* en donde dicha planta se modifica en un gen que comprende una secuencia de nucleótidos modificada como se expone en la SEQ ID NO: 6, 7 u 8, o una molécula de ácido nucleico que es al menos 90 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO 6, 7

65

u 8 respecto a la secuencia de nucleótidos completa y codifica una citocromo P450-oxidoreductasa modificada que cataliza la conversión de (*S*)-reticulina a (*R*)-reticulina en donde dicha modificación es homocigótica, se hereda de manera estable y reduce o anula la expresión o actividad de dicho dominio de citocromo P450 y/o dominio de oxidoreductasa de dicho polipéptido modificado en donde la noscapina comprende al menos el 50 % del contenido de alcaloides de bencilisoquinolina de dicha planta modificada.

En una modalidad preferida de la invención, dicha molécula de ácido nucleico modificada es:

i) al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, 7 u 8 respecto a la secuencia de nucleótidos completa; o

ii) es al menos 99 % idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO 6, 7 u 8, respecto a la secuencia de nucleótidos completa y en donde dicha modificación es una adición, sustitución o delección de al menos una base nucleotídica entre los nucleótidos 1280-1300 expuestos en la SEQ ID NO 6, 7 u 8.

En una modalidad preferida de la invención dicha modificación es una sustitución de al menos una base nucleotídica entre los nucleótidos 1280-1300 expuestos en la SEQ ID NO 6, 7 u 8 o en donde dicha modificación es una sustitución de al menos una base nucleotídica entre los nucleótidos 1285-1295 expuestos en la SEQ ID NO 6, 7 u 8 o en donde dicha modificación es una sustitución de C por T de la base nucleotídica en el nucleótido 1291 de la SEQ ID NO 6, 7 u 8.

En una modalidad preferida de la invención dicho polipéptido modificado tiene actividad reducida o anulada y se selecciona del grupo que consiste en:

i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9, 10 u 11;

ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos modificada que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de longitud completa como se expone en la SEQ ID NO: 9, 10 u 11, en donde dicha secuencia se modifica mediante adición, delección o sustitución de una o más secuencias de aminoácidos y en donde dicho polipéptido tiene actividad enzimática reducida o anulada en la conversión de (*S*)-reticulina a 1,2-deshidrorreticulina y/o a (*R*)-reticulina en comparación con el polipéptido no modificado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9, 10 u 11.

En una modalidad preferida de la invención dicho polipéptido modificado tiene actividad reducida o anulada y se selecciona del grupo que consiste en:

i) un polipéptido modificado que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15;

ii) un polipéptido modificado que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 16;

iii) un polipéptido modificado que comprende una secuencia de aminoácidos modificada que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de longitud completa como se expone en la SEQ ID NO: 15 o 16, en donde dicha secuencia se modifica mediante adición, delección o sustitución de una o más secuencias de aminoácidos y en donde dicho polipéptido tiene actividad enzimática reducida o anulada en la conversión de 1,2-deshidrorreticulina a (*R*)-reticulina en comparación con el polipéptido no modificado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 o 16.

En una modalidad preferida de la invención, dicho polipéptido modificado se selecciona del grupo:

i) al menos una adición, delección o sustitución de un residuo de aminoácido en la región de los aminoácidos 386-486 como se expone en la SEQ ID NO: 9, 10 u 11;

ii) al menos una adición, delección o sustitución de un residuo de aminoácido en la región de los aminoácidos 426-436 como se expone en la SEQ ID NO: 9, 10 u 11 y en donde dicho polipéptido modificado es al menos 90 % idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9, 10 u 11; o

iii) dicho polipéptido modificado comprende una delección o sustitución del residuo de aminoácido 431 de la SEQ ID NO: 9 en donde dicho polipéptido modificado es al menos 90 % idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9.

iv) dicho polipéptido modificado comprende una delección o sustitución del residuo de aminoácido 432 de la SEQ ID NO: 10 en donde dicho polipéptido modificado es al menos 90 % idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10;

v) dicho polipéptido modificado comprende una delección o sustitución del residuo de aminoácido 431 de la SEQ ID NO: 11 en donde dicho polipéptido modificado es al menos 90 % idéntico a la secuencia de aminoácidos

- expuesta en la SEQ ID NO: 11;
- vi) dicho polipéptido modificado comprende una sustitución o delección en el aminoácido arginina 431 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9;
- vii) en donde dicho polipéptido modificado comprende una sustitución o delección en el aminoácido arginina 432 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10;
- viii) en donde dicho polipéptido modificado comprende una sustitución o delección en el aminoácido arginina 431 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11;
- ix) en donde dicha modificación es la sustitución de arginina por triptófano en la posición 431 de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 9;
- x) en donde dicha modificación es la sustitución de arginina por triptófano en la posición 432 de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 10;
- xi) en donde dicha modificación es la sustitución de arginina por triptófano en la posición 431 de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 11.
- En una modalidad preferida de la invención dicho polipéptido modificado comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 27, 28 o 29.
- En una modalidad preferida de la invención dicha planta comprende uno o más genes que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- i) una secuencia de nucleótidos como la representada por la secuencia en la SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26;
- ii) una secuencia de nucleótidos en donde dicha secuencia está degenerada como resultado del código genético con respecto a la secuencia de nucleótidos definida en (i);
- iii) una molécula de ácido nucleico cuya hebra complementaria se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas a la secuencia en la SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 en donde dicha molécula de ácido nucleico codifica polipéptidos implicados en la biosíntesis de noscapina o intermediarios en la biosíntesis de noscapina de *Papaver*.
- En una modalidad preferida de la invención, dicha planta es nula para dicha citocromo P450-oxidoreductasa.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una cápsula, paja o semilla de *Papaver* obtenida de la planta modificada de acuerdo con la invención.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso de un gen que codifica una citocromo P450-oxidoreductasa que cataliza la conversión de (S)-reticulina a (R)-reticulina en la identificación de cultivares de *Papaver* que tienen niveles mejorados de noscapina o intermediarios en la síntesis de noscapina de acuerdo con la invención en donde dicho gen comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- i) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico como se expone en la SEQ ID NO: 6, 7 u 8; o
- ii) una molécula de ácido nucleico cuya hebra complementaria se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, 7 u 8, y que codifica un polipéptido que tiene expresión o actividad reducida o anulada de una citocromo P450-oxidoreductasa que cataliza la conversión de (S)-reticulina a (R)-reticulina en comparación con una planta de *Papaver* de tipo silvestre que comprende un gen que codifica una citocromo P450-oxidoreductasa funcional.
- De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para identificar una planta de *Papaver* que comprende un gen de la citocromo P450-oxidoreductasa modificado que comprende las etapas:
- i) obtener una muestra de material vegetal a partir de una planta a analizar;
- ii) extraer ácido nucleico genómico de dicho material vegetal; y
- iii) analizar el ácido nucleico genómico extraído que codifica una variante de secuencia de nucleótidos de las secuencias de nucleótidos expuestas en la SEQ ID NO: 6, 7 u 8; y opcionalmente,
- iv) comparar la secuencia con una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 6, 7 u 8; y opcionalmente
- v) preparar una mezcla de reacción que comprende:
- a) ADN genómico a analizar,
- b) un primer cebador oligonucleotídico directo específico de alelo que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a dicha secuencia de nucleótidos del gen de la citocromo P450-oxidoreductasa y

una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de un primer casete indicador de fluorescencia,

c) un segundo cebador oligonucleotídico directo específico de alelo que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a dicho gen de la citocromo P450-oxidoreductasa y una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos

de un segundo casete indicador de fluorescencia en donde el nucleótido en el extremo 3' de dicha segunda secuencia de cebador oligonucleotídico es complementaria a una variante de secuencia de nucleótidos polimórfica de dicho gen de la citocromo P450-oxidoreductasa, y en donde la secuencia de nucleótidos de dichos primer y segundo cebadores oligonucleotídicos es complementaria a la misma secuencia de nucleótidos aguas arriba de dicho gen de la citocromo P450-oxidoreductasa; d) un cebador oligonucleotídico inverso que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos aguas abajo de dicha secuencia de nucleótidos del gen de la citocromo P450-oxidoreductasa; y e) dos casetes indicadores que comprenden ácido nucleico de doble hebra que comprende:

un primer ácido nucleico de doble hebra en donde una hebra comprende una etiqueta fluorescente y es complementaria a dicho primer cebador específico de alelo y una segunda hebra que comprende una etiqueta desactivadora que desactiva dicha etiqueta fluorescente; y

un segundo ácido nucleico de doble hebra en donde una hebra comprende una etiqueta fluorescente diferente de la etiqueta fluorescente de i) y es complementaria a dicho segundo cebador específico de alelo y una segunda hebra que comprende una etiqueta desactivadora que desactiva dicha segunda etiqueta fluorescente;

vi) calentar dicha mezcla de reacción para desnaturalizar el ácido nucleico genómico y dichos indicadores de doble hebra y proporcionar condiciones para aparear los cebadores a su secuencia de nucleótidos complementaria respectiva, extender por cebado dichos cebadores oligonucleotídicos apareados y amplificación en cadena de la polimerasa de dicha mezcla; y

vii) detectar la emisión de fluorescencia.

La PCR específica de alelos competitiva (KASP) permite la identificación de polimorfismo de un solo nucleótido en una secuencia de ADN. El método se basa en la extensión por cebado de dos cebadores específicos de alelos (directos) y la amplificación del producto resultante mediante el uso de un cebador inverso común. Los cebadores directos se diseñan específicamente para unir y extender el cebador al SNP o al alelo de tipo silvestre lo que permite la unión subsecuente del cebador inverso común para la amplificación del producto. En una segunda etapa, un casete de oligonucleótido complementario a una secuencia 5' específica del primer cebador directo específico de alelo y un segundo casete de oligonucleótido complementario a una secuencia 5' específica del segundo cebador directo específico de alelo que comprende una etiqueta fluorescente diferente se añaden a la reacción lo que permite la amplificación del SNP y de las dianas de tipo silvestre y la detección del producto a través de la señalización de fluorescencia. Alternativamente, pueden usarse cebadores etiquetados directamente con fluorescencia dirigidos al cebador inverso común para amplificar, por ejemplo, solo la especie con el SNP en una muestra. La tecnología KASP se describe en el documento US2016/0002712.

Será evidente para el experto en la técnica que se dispone de técnicas que permiten el análisis de mutaciones en secuencias génicas y/o su expresión e incluyen, pero no se limitan a, secuenciación de ADN genómico, análisis basado en PCR del ADN por medio de polimorfismos de polinucleótidos de un solo polinucleótido (análisis de SNP), polimorfismo conformacional de una sola hebra (SSCP), electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE), PCR cuantitativa y PCR múltiple para detectar la expresión de múltiples genes.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para la extracción de noscapina de una planta o cápsula o paja modificada de acuerdo con la invención que comprende las etapas:

- i) recolectar una planta, cápsula o paja modificada de acuerdo con la invención y formar una mezcla de reacción de material vegetal en partículas;
- ii) extraer con solvente dicha mezcla de reacción para proporcionar una fracción enriquecida en alcaloides; y

concentrar dicha fracción enriquecida en alcaloides para proporcionar una fracción de noscapina enriquecida.

La hibridación de una molécula de ácido nucleico ocurre cuando dos moléculas de ácido nucleico complementarias experimentan una cantidad de enlaces de hidrógeno entre sí. Las moléculas de ácido nucleico aisladas como se menciona en la presente descripción incluyen ADN genómico, moléculas de ADNc y moléculas de ARN. La rigurosidad de la hibridación puede variar de acuerdo con las condiciones ambientales que rodean a los ácidos nucleicos, la naturaleza del método de hibridación y la composición y longitud de las moléculas de ácido nucleico usadas. Los cálculos relacionados con las condiciones de hibridación requeridas para lograr grados particulares de rigurosidad se analizan en Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001); y Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, Nueva York, 1993). La T_m es la temperatura a la que el 50 % de una hebra dada de una molécula de ácido nucleico se hibrida con su hebra complementaria. El siguiente es un conjunto

ilustrativo de condiciones de hibridación y no es limitativo:

Muy alta rigurosidad (permite la hibridación de secuencias que comparten al menos 90 % de identidad)

- 5 Hibridación: SSC 5x a 65 °C durante 16 horas
 Lavar dos veces SSC 2x a temperatura ambiente (RT) durante 15 minutos cada vez
 Lavar dos veces: SSC 0,5 x a 65 °C durante 20 minutos cada vez

10 Alta rigurosidad (permite la hibridación de secuencias que comparten al menos 80 % de identidad)

- Hibridación: SSC 5 x-6 x a 65 °C-70 °C durante 16-20 horas
 Lavar dos veces: SSC 2 x a RT durante 5-20 minutos cada vez
 Lavar dos veces: SSC 1 x a 55 °C-70 °C durante 30 minutos cada vez

15 Baja rigurosidad (permite la hibridación de secuencias que comparten al menos 50 % de identidad)

- Hibridación: SSC 6 x a RT a 55 °C durante 16-20 horas
 Lavar al menos dos veces: SSC 2 x-3 x a RT a 55 °C durante 20-30 minutos cada vez

20 En una modalidad preferida de la invención se proporciona un polipéptido modificado codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se describe en la presente descripción.

25 En una modalidad de la invención dicha planta expresa un polipéptido P450-oxidoreductasa modificado en donde dicho polipéptido modificado tiene actividad reducida o anulada en la conversión de (S)-reticulina a (R)-reticulina.

En una modalidad de la invención, dicho polipéptido modificado se selecciona del grupo que consiste en:

- 30 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9, 10 u 11;
 ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 12, 13 o 14;
 iii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos modificada que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de longitud completa como se expone en la SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13 o 14, en donde dicha secuencia se modifica mediante adición, delección o sustitución de una o más secuencias de aminoácidos y en donde dicho polipéptido tiene actividad enzimática reducida o anulada en la conversión de (S)-reticulina a 1,2-deshidrorreticulina y/o a (R)-reticulina en comparación con el polipéptido no modificado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13 o 14.

40 En una modalidad de la invención, dicho polipéptido modificado se selecciona del grupo que consiste en:

- i) un polipéptido modificado que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15;
 ii) un polipéptido modificado que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 16;
 45 iii) un polipéptido modificado que comprende una secuencia de aminoácidos modificada que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de longitud completa como se expone en la SEQ ID NO: 15 o 16, en donde dicha secuencia se modifica mediante adición, delección o sustitución de una o más secuencias de aminoácidos y en donde dicho polipéptido tiene actividad enzimática reducida o anulada en la conversión de 1,2-deshidrorreticulina a (R)-reticulina en comparación con el polipéptido no modificado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 o 16.

50 En una modalidad de la invención dicho polipéptido modificado comprende una delección o sustitución del residuo de aminoácido 431 de la SEQ ID NO: 9 en donde dicho polipéptido modificado es al menos 90 % idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9.

55 En una modalidad de la invención dicho polipéptido modificado comprende una delección o sustitución del residuo de aminoácido 432 de la SEQ ID NO: 10 en donde dicho polipéptido modificado es al menos 90 % idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10.

60 En una modalidad de la invención dicho polipéptido modificado comprende una delección o sustitución del residuo de aminoácido 431 de la SEQ ID NO: 11 en donde dicho polipéptido modificado es al menos 90 % idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11.

65 En una modalidad de la invención dicho polipéptido modificado es 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9 en donde dicho polipéptido modificado

comprende una delección o sustitución del residuo de aminoácido 431 de la SEQ ID NO: 9.

En una modalidad de la invención dicho polipéptido modificado es 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10 en donde dicho polipéptido modificado comprende una delección o sustitución del residuo de aminoácido 432 de la SEQ ID NO: 10.

En una modalidad de la invención dicho polipéptido modificado es 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 en donde dicho polipéptido modificado comprende una delección o sustitución del residuo de aminoácido 431 de la SEQ ID NO: 11.

En una modalidad de la invención dicho polipéptido modificado comprende una sustitución o delección en el aminoácido arginina 431 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9.

En una modalidad de la invención dicho polipéptido modificado comprende una sustitución o delección en el aminoácido arginina 432 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10.

En una modalidad de la invención dicho polipéptido modificado comprende una sustitución o delección en el aminoácido arginina 431 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11.

En una modalidad de la invención, dicha modificación es la sustitución de arginina por triptófano en la posición 431 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9.

En una modalidad de la invención, dicha modificación es la sustitución de arginina por triptófano en la posición 432 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10.

En una modalidad de la invención, dicha modificación es la sustitución de arginina por triptófano en la posición 431 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11.

En una modalidad de la invención, dicho polipéptido modificado comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 27.

En una modalidad de la invención, dicho polipéptido modificado comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 28.

En una modalidad de la invención, dicho polipéptido modificado comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29.

En una modalidad de la invención, dicho polipéptido modificado está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 30.

En una modalidad de la invención, dicho polipéptido modificado está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 31.

En una modalidad de la invención, dicho polipéptido modificado está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 32.

La mutagénesis como medio para inducir cambios fenotípicos en los organismos se conoce bien en la técnica e incluye, pero no se limita al uso de agentes mutagénicos tales como mutágenos químicos (por ejemplo, análogos de bases, agentes desaminantes, agentes intercalantes de ADN, agentes alquilantes, transposones, bromo, azida de sodio) y mutágenos físicos [por ejemplo, radiación ionizante, exposición a psoraleno combinada con radiación UV]. También es un conocimiento general común que la anulación de la función génica puede obtenerse a través de medios genéticos tales como ARNip y antisentido. La introducción de ARN de doble hebra, también conocido como ARN inhibidor/interferente pequeño (ARNip) o ARN de horquilla corta [ARNhc], en una célula da como resultado la destrucción del ARNm complementario a la secuencia incluida en la molécula de ARNip/ARNhc. Esto se realiza típicamente por medio de la transfección de constructos de expresión, por ejemplo, los descritos en el documento PCT/GB2015/051446, que se integra de manera estable al genoma y se hereda de una manera mendeliana.

En una modalidad de la invención dicha planta de *Papaver* modificada comprende además uno o más genes que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- i) una secuencia de nucleótidos como la representada por la secuencia en la SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26;
- ii) una secuencia de nucleótidos en donde dicha secuencia está degenerada como resultado del código genético con respecto a la secuencia de nucleótidos definida en (i);
- iii) una molécula de ácido nucleico cuya hebra complementaria se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas a la secuencia en la SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 en donde dicha molécula de ácido nucleico

codifica polipéptidos implicados en la biosíntesis de noscapina o intermediarios en la biosíntesis de noscapina de *Papaver*.

5 En una modalidad de la invención, dicha molécula de ácido nucleico es al menos 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 respecto a la secuencia de nucleótidos completa.

10 En una modalidad de la invención dicha planta comprende niveles mejorados de noscapina o intermediarios en la síntesis de noscapina.

En una modalidad de la invención, la noscapina comprende al menos el 50 % del contenido de alcaloides de bencilisoquinolina de dicha planta modificada.

15 En una modalidad adicional de la invención dicha planta comprende un contenido de noscapina que es al menos el 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % del contenido de alcaloides de bencilisoquinolina de dicha planta modificada.

20 En una modalidad alternativa de la invención dicha planta comprende un contenido de noscapina que es al menos el 50 % del contenido de alcaloides de una combinación de alcaloides que comprenden morfina, codeína, oriparvina, tebaína y noscapina. En una modalidad adicional de la invención dicha planta comprende un contenido de noscapina que es al menos el 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % del contenido de alcaloides de una combinación de alcaloides que comprenden morfina, codeína, oriparvina, tebaína y noscapina.

25 En una modalidad de la invención dicha planta comprende un contenido de bencilisoquinolina que comprende sustancialmente noscapina.

En una modalidad de la invención dicha planta de *Papaver* es *Papaver somniferum*.

30 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una cápsula de *Papaver* obtenida de la planta modificada de acuerdo con la invención.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una paja de *Papaver* obtenida de la planta modificada de acuerdo con la invención.

35 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una semilla de *Papaver* obtenida de la planta modificada de acuerdo con la invención.

40 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta descripción, las palabras "comprende" y "contiene" y las variaciones de las palabras, por ejemplo "que comprende" y "comprende", significan "que incluye pero no se limita a", y no pretende (ni lo hace) excluir otras porciones, aditivos, componentes, enteros o etapas. "Que consiste esencialmente" significa que tiene los enteros esenciales pero incluye los enteros que no afectan materialmente la función de los enteros esenciales.

45 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta descripción, el singular abarca el plural a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera. En particular, donde se usa el artículo indefinido, la descripción debe entenderse que contempla la pluralidad así como también la singularidad, a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera.

50 Debe entenderse que los elementos, enteros, características, compuestos, porciones o grupos químicos descritos junto con un aspecto, modalidad o ejemplo particular de la invención son aplicables a cualquier otro aspecto, modalidad o ejemplo descrito en la presente descripción a menos que sea incompatible con el mismo.

Definiciones

55 Los "alcaloides de bencilisoquinolina" incluyen típicamente papaverina, noscapina, codeína, morfina, apomorfina, berberina, protopina, tubocurarina y sanguinarina. Los principales alcaloides son morfina, codeína, oriparvina, tebaína y noscapina.

60 "Sustancialmente noscapina" significa que otros alcaloides de bencilisoquinolina son alcaloides traza o alcaloides de bencilisoquinolina indetectables medidos mediante técnicas disponibles para el experto.

"Heredado de manera estable" se refiere a la transferencia de características relevantes que permanecen sin cambios después de la propagación repetida o, en el caso de un ciclo de propagación particular, al final de cada uno de tales ciclos.

65 "Expresión reducida o anulada" se refiere a la reducción de la expresión de ARNm en 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80,

90 o 100 % en comparación con una planta de tipo silvestre que expresa un gen que codifica una citocromo p450-oxidoreductasa no modificada. El experto conoce los métodos de expresión de ARNm cuantitativos tales como, por ejemplo, PCR en tiempo real.

- 5 "Citocromo P450-oxidoreductasa funcional" se refiere a una enzima no modificada que es capaz de convertir (S)- a (R)-reticulina por medio de 1,2-deshidrorreticulina. La medición de las actividades del citocromo P450 y la oxidoreductasa se conoce bien en la técnica, por ejemplo, ver Lenz & Zenk, 1995, FEBS 233:132-139. Además, la expresión heteróloga de los dominios de citocromo P450 y oxidoreductasa además de la expresión de la proteína de fusión citocromo P450-oxidoreductasa en sistemas microbianos tales como levadura permite la caracterización
- 10 funcional de enzimas citocromo P450-oxidoreductasas funcionales y no funcionales.

La frase "niveles mejorados de noscapina e intermediarios de noscapina" significa que produce un nivel más alto de noscapina o intermediarios en la síntesis de noscapina en comparación con una planta de tipo silvestre que comprende una citocromo P450-oxidoreductasa funcional, por ejemplo, un aumento del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70

15 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % en el nivel de noscapina o intermediarios en la biosíntesis de noscapina.

"Planta de tipo silvestre" significa una planta que tiene un fenotipo que es característico de la especie en una población de reproducción natural.

- 20 "Actividad reducida o anulada en la conversión de (S)-reticulina a (R)-reticulina" se refiere a la reducción de la actividad catalítica de la enzima en 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % con relación a una citocromo P450-oxidoreductasa no modificada.

25 Variante como se menciona en "Resumen de SEQ ID" se refiere a diferentes formas polimórficas del gen particular.

- SEQ ID NO: 1 P450 domain nucleotide sequence; polymorphic variant a
 SEQ ID NO: 2 P450 domain nucleotide sequence; polymorphic variant b
 SEQ ID NO: 3 P450 domain nucleotide sequence; polymorphic variant c
 30 SEQ ID NO: 4 secuencia de nucleótidos de oxidoreductasa A, variante b
 SEQ ID NO: 5 secuencia de nucleótidos de oxidoreductasa B
 SEQ ID NO: 6 secuencia de nucleótidos de citocromo P450-oxidoreductasa; variante polimórfica a
 SEQ ID NO: 7 secuencia de nucleótidos de citocromo P450-oxidoreductasa; variante polimórfica b
 SEQ ID NO: 8 secuencia de nucleótidos de citocromo P450-oxidoreductasa; variante polimórfica c
 35 SEQ ID NO: 9 aminoácidos de citocromo P450-oxidoreductasa, variante polimórfica a
 SEQ ID NO: 10 aminoácidos de citocromo P450-oxidoreductasa; variante polimórfica b
 SEQ ID NO: 11 aminoácidos de citocromo P450-oxidoreductasa; variante polimórfica c
 SEQ ID NO: 12 aminoácidos del dominio P450; variante polimórfica a
 SEQ ID NO: 13 aminoácidos del dominio P450; variante polimórfica b
 40 SEQ ID NO: 14 aminoácidos del dominio P450; variante polimórfica c
 SEQ ID NO: 15 aminoácidos de oxidoreductasa A
 SEQ ID NO: 16 aminoácidos de oxidoreductasa B
 SEQ ID NO: 17 PSMT1
 SEQ ID NO: 18 PSMT2
 45 SEQ ID NO: 19 PSMT3
 SEQ ID NO: 20 CYP450 1 (CYP 82X1)
 SEQ ID NO: 21 CYP450 2 (CYP 719A21)
 SEQ ID NO: 22 CYP450 3 (CYP 82X2)
 SEQ ID NO: 23 CYP450 4 (CYP 82Y1)
 50 SEQ ID NO: 24 PSAT1
 SEQ ID NO: 25 PSSDR1
 SEQ ID NO: 26 PSCXE1
 SEQ ID NO: 27 aminoácidos mutantes de citocromo P450-oxidoreductasa, variante a
 SEQ ID NO: 28 aminoácidos mutantes de citocromo P450-oxidoreductasa, variante b
 55 SEQ ID NO: 29 aminoácidos mutantes de citocromo P450-oxidoreductasa, variante c
 SEQ ID NO: 30 secuencia de nucleótidos mutante de citocromo P450-oxidoreductasa variante a
 SEQ ID NO: 31 secuencia de nucleótidos mutante de citocromo P450-oxidoreductasa variante b
 SEQ ID NO: 32 secuencia de nucleótidos mutante de citocromo P450-oxidoreductasa variante c
 SEQ ID NO: 33 oxidoreductasa A, secuencia de ácido nucleico, variante a (y c)

60 Ahora se describirá una modalidad de la invención únicamente como ejemplo y con referencia a las figuras, ejemplos y tablas:

- 65 Figura 1: Diagrama de violín de la cantidad relativa (% del total) de noscapina y alcaloides de morfinano en cápsulas secas de poblaciones F2 que segregan *storr-4*. HOM_STORR4, material F2 homocigótico para *storr-4*; HET_STORR4, material F2 heterocigótico para *storr-4*; WT_STORR, material F2 homocigótico para el alelo de

tipo silvestre de STORR; HN4, plantas de control de NOSCAPINA CVS 4, una de las líneas parentales del material F2;

Figura 2: Diagrama de violín de la cantidad absoluta (% de peso en seco de la cápsula) de noscapina y alcaloides de morfinano en cápsulas secas de poblaciones F2 segregantes que segregan *storr-4*. HOM_STORR4, material F2 homocigótico para *storr-4*; HET_STORR4, material F2 heterocigótico para *storr-4*; WT_STORR, material F2 homocigótico para el alelo de tipo silvestre de STORR; HN4, plantas de control de NOSCAPINA CVS 4, una de las líneas parentales del material F2; DW, peso en seco; y

Figura 3: Descripción esquemática de las vías de biosíntesis de noscapina y morfinano en la amapola de opio y la posición del bloqueo de la vía conferido por *storr-4*. (S)-reticulina es un intermediario de punto de ramificación principal en el metabolismo de alcaloides en la amapola de opio que sirve como precursor tanto para la biosíntesis de noscapina como de morfinano. El locus STORR controla la reacción de entrada en la biosíntesis de morfinano, la epimerización en dos etapas de (S)- a (R)-reticulina. La afectación de STORR, por ejemplo por medio de mutaciones de inactivación génica tales como *storr-4*, conduce a un bloqueo de la biosíntesis de morfinano y a una mayor producción de noscapina en cultivares de amapola de opio productores de noscapina.

Materiales & métodos

Mutagénesis con EMS

Antes de la mutagénesis, las semillas M0 del cultivar de *P. somniferum* de GSK NOSCAPINA CVS2 se empaparon en solución de cloruro de potasio al 0,1 % (p/v) durante aproximadamente 24 horas. Después, la semilla se remojó durante tres horas con solución de metanosulfonato de etilo (EMS) (EMS 200 mM en tampón de hidrogenofosfato de sodio 100 mM, pH 5,0, suplementado con dimetilsulfóxido 700 mM). La semilla M1 tratada se lavó dos veces durante 15 minutos cada una con solución de tiosulfato de sodio 100 mM

y después dos veces durante 15 minutos cada una con agua destilada. Se usó un volumen de 10 ml de las soluciones respectivas por cada 1000 semillas y todas las etapas se llevaron a cabo en una plataforma oscilante. La semilla M1 lavada se secó durante toda la noche en papel de transferencia Whatman 3MM (Whatman/GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido) y se sembró a la mañana siguiente sobre una mezcla de compost John Innes no 2, vermiculita y perlita (4:2:1), después se cubrió con una capa fina de compost. Las plántulas se trasplantaron de tres a cuatro semanas después de la germinación a macetas más grandes y se cultivaron en el invernadero hasta la madurez. Se recolectaron a mano cápsulas secas de la población M1 una vez que las cápsulas se habían secado hasta aproximadamente 10 % de humedad en la planta. La semilla M2 se separó manualmente de la cápsula, lo que proporcionó las familias de semillas M2 que se usaron en los ensayos de campo descritos más abajo.

Ensayos de campo de líneas mutadas con EMS

La semilla M2 se sembró en el campo en Tasmania en la temporada de cultivo de 2009/2010. Las líneas de semillas M2 de la población mutada con EMS se sembraron a mano en surcos de 3 m de largo. Después de la germinación, las plantas se entresacaron a 75 mm de separación. Típicamente, 4 plantas (designadas A, B, C, D) por línea M2 se autopolinizaron (dos brotes inmaduros por planta seleccionada) al amarrar una bolsa de lino sobre el brote. Los surcos polinizados sin cubrir se recolectaron a ~ 11 % de humedad y se analizaron (como se describe más abajo) para determinar el contenido de morfina (M), codeína (C), oripavina (O) y tebaína (T). El análisis de unas cápsulas autopolinizadas seleccionadas de unas plantas M2 indicó ensayos de morfinano significativamente reducidos, y ensayos significativamente más altos de noscapina. Las semillas M3 y M4 derivadas de una cápsula M2 autopolinizada seleccionada que muestra el fenotipo de bajo contenido de alcaloides de morfinano/alto contenido de noscapina se sembraron en las siguientes temporadas de cultivo en Tasmania para confirmar este fenotipo tanto en cápsulas polinizadas sin cubrir como en cápsulas autopolinizadas. Típicamente, 4 plantas (designadas A, B, C, D) se autopolinizaron por línea de semilla M3 y M4 como se describió anteriormente. Los cultivares comerciales de GSK se cultivaron junto con las líneas M2, M3 y M4 como comparación. En dependencia de la temporada, incluyeron los CULTIVARES de GSK MORFINA 3 y 5, CULTIVAR de GSK TEBAINA 3, CULTIVARES de GSK NOSCAPINA 3 - 6.

Análisis de paja de amapola de ensayos de campo

Se recolectaron a mano cápsulas de amapola de las líneas mutantes respectivas una vez que las cápsulas se habían secado hasta aproximadamente 10 % de humedad en la planta. La semilla se separó manualmente de la cápsula y el material de paja de la cápsula (paja de amapola) se envió después a la instalación de extracción de GSK en Port Fairy, Australia.

Las muestras de paja de amapola se molieron en un molino de bolas Retsch Modelo MM400 hasta obtener un polvo fino. Se extrajeron muestras de dos gramos de paja de amapola molida (2 6 0,003 g) en 50 ml de una solución de ácido acético al 10 %. La suspensión de extracción se agitó en un agitador orbital a 200 rpm durante un mínimo de 10 minutos y después se filtró para proporcionar un filtrado transparente. El filtrado final se pasó a través de un filtro de 0,22 mm antes del análisis.

Las soluciones se analizaron mediante el uso de un sistema de UPLC Waters Acquity (Waters Corporation, Milford, MA, Estados Unidos) equipado con una columna Waters Acquity BEH C18, 2,1 mm 3 100 mm con paquete de 1,7 micras. La fase móvil usó un perfil de gradiente con el eluyente A que consiste en ácido trifluoroacético 0,1 % en agua desionizada y el eluyente B que consiste en acetonitrilo 100 %. Las condiciones de gradiente de fase móvil usadas son como se enumeran en la Tabla 1, el número de curva de gradiente se determinó mediante el uso de un paquete de programas informáticos de cromatografía Waters Empower. El régimen de flujo fue de 0,6 ml por minuto y la columna se mantuvo a 45 grados centígrados. El volumen de inyección fue de 1 ml de volumen de inyección y los alcaloides se detectaron mediante el uso de un detector UV a 285 nm.

La pérdida por secado (LOD) de la paja se determinó mediante secado en un horno a 105 grados centígrados durante 16-20 horas.

Tabla 1 - Programa de flujo de gradiente

TIEMPO (minutos)	Eluyente A %	Eluyente B %	Flujo (ml/min)	Número de curva
0,00	95,0	5,0	0,60	INICIAL
0,80	90,0	10,0	0,60	6
3,40	75,0	25,0	0,60	3
3,60	95,0	5,0	0,60	6
4,00	95,0	5,0	0,60	11

Las concentraciones de alcaloides para morfina, pseudomorfina, codeína, tebaína, oripavina y noscapina se cuantificaron mediante el uso de calibración estándar externa y los resultados se calcularon sobre una base de peso en seco. La reticulina se cuantificó mediante el uso de la calibración de la tebaína (se asume la respuesta de la tebaína) y los resultados se calcularon sobre una base de peso en seco (% en peso con relación a tebaína; % WRT).

Los tiempos de retención típicos son los siguientes:

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)
Morfina	1,14
Pseudomorfina	1,26
Codeína	1,69
Oripavina	1,80
Reticulina	2,05
10-hidroxitobaína	2,32
Tebaína	2,53
Noscapina	3,16

Análisis de látex de hojas de la generación M4 cultivada en invernadero (S-186668) derivada de la planta MCS 746 C autopolinizada.

El perfil de alcaloides de látex se determinó en hermanos M4 de las plantas usadas para la secuenciación del ADNc de la citocromo P450-oxidoreductasa (*STORR*) (ver más abajo). El látex se recolectó cuando surgieron los primeros brotes de flores (plantas de ~7 semanas de edad) de los pecíolos cortados, con una sola gota dispersada en 500 ml de ácido acético al 10 %. Esto se diluyó 103 en ácido acético al 1 % para dar una solución de alcaloides en ácido acético al 2 % para su análisis posterior. Las muestras se analizaron mediante UPLC-MS y archivos de comandos R como se describió anteriormente ("el método estándar"; (Winzer T. y otros (2012) Science 336, 1704-8)). Los compuestos se anotaron mediante la generación de fórmulas empíricas a partir de masas exactas (< 5 ppm de exactitud de masa) y la comparación con estándares auténticos. Los desconocidos se anotaron mediante una etiqueta de masa en el formato MxTy, donde x es la masa y y es el tiempo de retención en segundos.

El contenido relativo de alcaloides se midió como % del área del pico con relación al área del pico de alcaloides totales.

Aislamiento y secuenciación del ADNc de citocromo P450-oxidoreductasa en la generación M4 (S-186668) derivado de la planta MCS 746 C autopolinizada.

Se aisló el ARN de individuos M4 derivados de MCS 746 C individuales M3 autopolinizadas que presentaban el fenotipo de bajo contenido de alcaloides de morfinano/alto contenido de noscapina. Las plantas M4 se cultivaron en condiciones de invernadero hasta etapas posteriores al florecimiento (1-6 días después de la caída de los pétalos) y los segmentos de tallo (2,5-3 cm de largo) inmediatamente debajo de las flores se recolectaron y se congelaron

rápida en nitrógeno líquido.

El ARN total se extrajo de los tallos mediante el uso del método de extracción de ARN de pino (Chang y otros, 1993, Plant Mol. Biol. Rep. 11: 113-116) y se purificó adicionalmente mediante el uso del kit RNeasy Plus MicroKit (Qiagen, Crawley, Reino Unido).

La síntesis de ADNc se realizó mediante el uso de 1 mg de ARN total, oligo dT 10 mM MW 4500 (Invitrogen/Life Technologies, Paisley, Reino Unido) y dNTP 1 mM. Las reacciones se incubaron durante 5 min a 65 °C para permitir el apareamiento de oligonucleótidos. Las reacciones de síntesis de la primera hebra contenían tampón de primera hebra 1X (Invitrogen/Life Technologies), DTT 20 mM, RNase out 40 U (Invitrogen/Life technologies). Las reacciones se incubaron a 42 °C durante 2 min y después se añadieron 200 U de transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen/Life Technologies, Paisley, Reino Unido) seguido de una incubación de 50 min a 42 °C e inactivación por calor a 70 °C durante 15 min. Las muestras se diluyeron 5 X en agua y se usaron para amplificaciones específicas de genes. La región de longitud completa que codifica el gen de la citocromo P450-oxidoreductasa se amplificó a partir de muestras de ADNc mediante el uso de los cebadores 5'- ATGGAGCTCCAATATATTC-3', 5'-TCAAGCTTCATCATCCACA-3' y la polimerasa de ADN de alta fidelidad Q5® Hot Start High-Fidelity (New England Biolabs, Hitchin, Reino Unido) de acuerdo con las orientaciones suministradas por el fabricante. Las condiciones de los ciclos fueron las siguientes: 98 °C durante 30 s, 30 ciclos de 98 °C durante 10 s, 60 °C durante 30 s, 72 °C durante 1,5 min y una extensión final a 72 °C durante 2 min. Después, el producto de PCR de 3 kb se ligó en el vector de donación pJET1.2 mediante el uso del kit de clonación de PCR CloneJET (Thermo Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Tres clones individuales se secuenciaron completamente con el cebador de secuenciación mostrado en la Tabla 1.

Tabla 1: Cebadores de secuenciación usados para secuenciar el ADNc de la citocromo P450-oxidoreductasa de la progenie M4 de MCS 746 C.

SEQ ID NO	Secuencia de oligonucleótidos (5' a 3')
Cebador de secuenciación directo de pJET1.2 (SEQ ID NO 37)	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
SEQ ID NO	Secuencia de oligonucleótidos (5' a 3')
Cebador de secuenciación inverso de pJET1.2 (SEQ ID NO 38)	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
Cebador 1 (SEQ ID NO 39)	GCAGTGCTTCATATTTCTCG
Cebador 2 (SEQ ID NO 40)	CCTTATGGAAAATATTGGAGGGAGC
Cebador 3 (SEQ ID NO 41)	GTCTCTCTCAGAGGCTGCT
Cebador 4 (SEQ ID NO 42)	TTGTCTACATCCAGGCAATC

RNA-seq de tallos y cápsulas de GSK NOSCAPINA CVS 3.

El material de tallos y cápsulas se recolectó de tallos y cápsulas de plantas de GSK NOSCAPINA CVS 3 1-2 días después de la caída de los pétalos. El ARN se preparó individualmente a partir de cinco plantas. El material recolectado se molió en nitrógeno líquido mediante el uso de un mortero y la mano. El ARN se aisló de las preparaciones de tallos o cápsulas molidas como se describió anteriormente (Chang y otros, 1993, Plant Mol. Biol. Rep. 11: 113-116) con ligeras modificaciones (tres extracciones con cloroformo:alcohol isoamílico, precipitación de ARN con cloruro de litio a -20 °C durante toda la noche). El ARN se cuantificó espectrofotométricamente antes de agrupar cantidades iguales de ARN de cinco plantas por cultivar, etapa y órgano. Las muestras agrupadas se sometieron a una etapa de purificación final mediante el uso de un RNeasy Plus MicroKit (Qiagen, Crawley, Reino Unido) para eliminar cualquier resto de ADN genómico de las preparaciones. El ARN se eluyó en 100 µl de agua libre de ARNasa.

La secuenciación de ARN se realizó en un carril de la plataforma Illumina HiSeq 2000 (Illumina, Little Chesterford, Reino Unido) mediante el uso del kit de ARN TruSeq. La construcción de la biblioteca de ARN TruSeq se llevó a cabo de acuerdo con la descripción del fabricante e incluyó una etapa de selección de poli-A.

El ensamble de secuencias de novo de los conjuntos de secuencias sin procesar se realizó mediante el uso de la herramienta de ensamble de RNA-seq Trinity de novo (Haas y otros, 2013, Nature Protocols, 8: 1494-1512; <http://trinityrnaseq.github.io/>).

Descubrimiento de mutaciones en el locus *STORR*

Las secuencias de ADNc de *STORR* clonales obtenidas de la progenie M4 de la planta MCS 746 C que presenta el fenotipo de bajo contenido de alcaloides de morfina/alto contenido de noscapina se compararon con la secuencia contigua correspondiente ensamblada a partir de datos de RNA-seq de GSK NOSCAPINA CVS 3, el cultivar de amapola de opio usado para la mutagénesis con EMA. Las secuencias clonales y contiguas fueron idénticas aparte de las transiciones de C a T en la posición 1291 con respecto a la SEQ ID NO: 6. Esta transición de C a T es consistente con el tipo de mutaciones introducidas por EMS (Greene y otros, 2003, Genetics, 164: 731-740). La mutación da como

resultado una sustitución de aminoácido arginina por triptófano en la posición 431 de la proteína STORR (R431W).

Ensayos enzimáticos

- 5 La preparación de la reacción general se llevó a cabo como se describió anteriormente (Lenz & Zenk, 1995, FEBS 233:132-139). Los sustratos (S)-reticulina, 1,2-deshidrorreticulina y coclaurina se compraron a TRC Chemicals (Toronto, Canadá) y la codeína se suministró por MacFarlan-Smith (Edinburgh, Reino Unido). Las reacciones del ensayo contenían NADPH 300 mM, 5 mg de preparación de oxidoreductasa A o B, tampón 100 mM que cubre un intervalo de valores de pH (fosfato de potasio pH 6-8, glicina-NaOH pH 9) y sustrato 75 mM. Las reacciones se
10 incubaron durante 2 h a 37 °C y se congelaron inmediatamente a -80 °C. Las reacciones se secaron hasta obtener polvo en speedvac Gene Vac EZ-2 plus (Ipswich, Reino Unido) a 40 °C y se resuspendieron en 100 ml de Hexano: Etanol 1:1 (v/v), dietilamina al 0,1 % (v/v).

- Alternativamente, los ensayos enzimáticos se prepararon en volúmenes de 250 ml que contenían concentraciones
15 finales de tampón Bis-tris propano 50 mM, NADPH 1 mM y 100 mM de sustrato preparado a partir de levadura transformada que expresa de manera recombinante las citocromo P450-oxidoreductasas de tipo silvestre y mutante. Los ensayos se iniciaron mediante la adición de 50 ml de extracto soluble o microsomal a 2 mg ml⁻¹ de levadura transformada, y se incubaron a 37 °C durante 3 horas. Después de este tiempo, se retiraron 50 ml del extracto y se inactivó mediante la adición de 50 ml de metanol + ácido acético al 1 % que contenía noscapina 100 mM como un
20 estándar interno. Después, la reacción se centrifugó a 20 000 g durante 2 min, y el sobrenadante se recuperó para el análisis del contenido de 1,2-deshidrorreticulina y (R/S)-reticulina (es decir, método no quiral). Los 200 ml restantes del ensayo se usaron para el análisis quiral. La reacción se inactivó mediante la adición de tampón de carbonato de sodio 0,5 M (pH 10,0). Después se extrajo la reticulina de los productos de reacción mediante tres extracciones secuenciales con 400 ml de diclorometano. Los extractos de solvente se combinaron y se evaporaron hasta la
25 sequedad en un speedvac. Después el extracto se disolvió en 100 ml de hexano/etanol/dietilamina 50:50:0,1 y se analizó mediante el método de HPLC quiral para determinar las cantidades relativas de (R)- y (S)-reticulina.

- La mutagénesis con EMS de un cultivar de amapola de opio de noscapina conduce a líneas de amapola de opio donde la noscapina constituye más del 90 % del contenido total de alcaloides.

- 30 Entre las plantas derivadas de la línea de semillas M2 S-121435, un individuo, designado planta A, presentó un fenotipo de alto contenido de noscapina y bajo contenido de alcaloides de morfina en comparación con cultivares de noscapina, tebaína y morfina (Tabla 3). El contenido relativo de noscapina expresado como porcentaje del total de alcaloides principales (morfina, codeína, oripavina, tebaína y noscapina) alcanzó casi el 85 % en esta planta. El
35 contenido relativo de la noscapina aumentó aún más y el de los alcaloides de morfina disminuyó aún más en la progenie M3 y M4 tanto en cápsulas autopolinizadas como en cápsulas polinizadas sin cubrir, lo que indica que la mutación subyacente ya no se segrega en estas poblaciones. Igualmente, la noscapina asciende a más del 90 % del contenido relativo de alcaloides en el látex de hermanos M4 cultivados en invernadero de plantas usadas para secuenciar el ADN de citocromo P450-oxidoreductasa (STORR) (Tabla 2). Esto demuestra que el fenotipo mutante
40 es estable en la generación M4 y en condiciones ambientales y de desarrollo.

Generación de poblaciones F2 que segregan *storr-4* en el fondo de cvs 4 con alto contenido de noscapina (HN4)

- 45 El impacto del alelo *storr-4* sobre la acumulación de noscapina y alcaloides de morfina se evaluó en poblaciones F2 segregantes. Las plantas mutantes M4 derivadas del lote de semillas S-186668 se cruzaron con CVS4 de alto contenido de NOSCAPINA (HN4). La generación F1 resultante se autopolinizó para producir líneas de semillas F2 que segregan *storr-4* en un fondo de noscapina. Tres líneas F2 (S-185973, S-185975, S-185976) se cultivaron junto con plantas de control HN4 en el invernadero hasta la madurez. El material de cápsulas secas se recolectó y se analizó como se describe más abajo.

50

Genotipado de *storr-4*

- Los ensayos de genotipado por KASP para *storr-4* se diseñaron para genotipar poblaciones F2. Para diseñar
55 cebadores específicos de alelos, se enviaron secuencias de 50-100 nucleótidos alrededor del sitio 10 de mutación a LGC genomics (Hoddesdon, Reino Unido) para solicitar la mezcla de cebadores de KASP por diseño (KBD). Las secuencias de los cebadores específicos de alelos así como también el cebador común se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de cebadores, en orientación 5'-3'.

Alelo mutante	Cebador	Secuencia del cebador	Etiqueta
<i>storr-4</i>	Alelo de tipo silvestre (SEQ ID NO 34)	CCAGGCAATCATCAAAGAATCAATGC	FAM
	Alelo mutante (SEQ ID NO 35)	CCAGGCAATCATCAAAGAATCAATGT	HEX
	Cebador común (SEQ ID NO 36)	CACGGGGCTGGCTGGATACAA	

- 65 Se recolectaron muestras de hojas (30-50 mg) para la extracción de ADN de plantas de 4-6 semanas de edad. El ADN

genómico se extrajo mediante el uso del kit de plantas BioSprint 96 en la estación de trabajo BioSprint 96 (Qiagen, Crawley, Reino Unido) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN extraído se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop™ 8000 (Fisher Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos) y se normalizó a 5 ng/ul.

- 5 Las reacciones del ensayo KASP se llevaron a cabo en placas de 384 pocillos FrameStar® (4titude® Ltd, Wotton, Reino Unido) en un volumen de 5,07 ml por reacción, con los siguientes componentes de reacción: mezcla maestra de KASP V4.0 2x (LGC genomics), 2,5 ml; mezcla de cebadores de KBD, 0,07 ml; agua de grado molecular HyClone (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, Reino Unido), 0,5 ml; ADN 5 ng/ul, 2 ml. Las placas se centrifugaron durante 2 minutos a 4500 3 g, se sellaron por calor mediante el uso del sellador de placas a base de calor Kube™ (LGC genomics), y los
- 10 ciclos térmicos se llevaron a cabo en un termociclador a base de baño de agua Hydrocycler™ (LGC genomics), con las siguientes condiciones: 94 °C durante 15 minutos; 10 ciclos: 94 °C durante 20 segundos, 61-55 °C durante 60 segundos (reducción de 0,6 °C por ciclo); 34 ciclos: 94 °C durante 20 segundos, 55 °C durante 60 segundos. La lectura de la placa se llevó a cabo en un instrumento ViiA7 de Applied Biosystems (Life Technologies), durante 30 segundos a 25 °C.

- 15 **Análisis de paja de cápsula de poblaciones F2 cultivadas en invernadero**

- Las cápsulas de las poblaciones F2 y los controles HN4 se recolectaron una vez que las cápsulas se habían secado hasta aproximadamente 10 % de humedad en las plantas. La semilla se separó manualmente de la cápsula y las cápsulas individuales se molieron hasta obtener un polvo fino en un molino de bolas (Modelo MM04, Retsch, Haan, Alemania). Después, se pesaron con exactitud muestras de paja de amapola molida a 10 6 0,1 mg y se extrajeron en 0,5 ml de una solución de ácido acético al 10 % (v/v) con agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente. Después, las muestras se clarificaron mediante centrifugación y una submuestra de 50 ml se diluyó 103 en ácido acético al 1 % (v/v) para dar una solución de alcaloides en ácido acético al 2 % para su análisis posterior. Todas las
- 20 soluciones se analizaron como se describió para el análisis de la paja de amapola de plantas cultivadas en el campo. Igualmente, el análisis de todos los datos se llevó a cabo mediante el uso del lenguaje de programación R. Los supuestos picos de alcaloides se cuantificaron por sus áreas de iones pseudomoleculares mediante el uso de secuencias de comandos personalizadas. Los alcaloides se identificaron tras comparar los valores exactos de masa y tiempo de retención con los de los estándares. Cuando no se disponía de estándares, se usó el paquete Bioconductor rcdk (Smith y otros, 2006), Anal. Chem. 78 (3): 779-787) para generar fórmulas pseudomoleculares a partir de masas exactas dentro de las restricciones elementales C = 1 100, H = 1 200, O = 0 200, N = 0 3 y exactitud de masa < 5 ppm. El acierto con el error de ppm más bajo dentro de estas restricciones se usó para asignar una fórmula supuesta.

35 Ejemplos

- El alelo *storr-4* se cosegrega con el fenotipo de alto contenido de noscapina sin morfinano. Las poblaciones F2 que segregan *storr-4* en un fondo de alto contenido de noscapina se genotiparon para *storr-4* y su contenido de alcaloides relativo y absoluto se determinó en cápsulas secas. El alelo mutante *storr-4* se cosegregó estrictamente con niveles
- 40 extremadamente altos de noscapina y sin morfinano (Figuras 1 y 2). El contenido relativo de noscapina en el material homocigótico para *storr-4* alcanzó el 98 6 0,7 %, el resto era principalmente reticulina (1,8 6 0,7 %). Los niveles de noscapina y morfinano del material F2 heterocigótico fueron intermedios entre los del material F2 homocigótico para *storr-4* y las plantas F2 homocigóticas para el alelo de STORR de tipo silvestre (Figuras 1 y 2). El perfil de alcaloides de las plantas F2 homocigóticas para el alelo de STORR de tipo silvestre fue en general muy similar al de las plantas de control HN4, una de las variedades parentales usadas para generar la población F2.

- 45 Los datos demuestran claramente que la inactivación de la biosíntesis de morfinano en mutaciones de inactivación génica de STORR tal como *storr-4* permite conducir a un aumento del flujo metabólico hacia la vía de la rama de noscapina (Figura 3), lo que da como resultado, por lo tanto, niveles extremadamente altos de noscapina.

50 **Tabla 2**

Datos de látex de la progenie M4 cultivada en invernadero (S-186668) de la planta MCS 746 C							
Contenido de alcaloides % de alcaloides totales							
Morfina	Codeína	Codeinona	Oripavina	Tebaína	Noscapina	Laudanosina	Protopina
1,3 ± 2,32	0,34 ± 0,71	0,01 ± 0	0 ± 0	0,07 ± 0,1	92,34 ± 3,35	0,81 ± 0,38	0,2 ± 0,22
se muestran los promedios y la desviación estándar de 15 plantas M4 individuales							

55

Tabla 3: contenido de alcaloides (% de peso en seco y % de contenido total de alcaloides) en diferentes líneas vegetales

Temporalidad	Línea	Generación	Autopollinizadas/ sin cubrir *	Contenido de alcaloides % de peso en seco	Codeína	Orpavina	Tebaina	Noscapina	Contenido de alcaloides % de peso en seco	Codeína	Orpavina	Tebaina	Noscapina	Contenido de alcaloides % de peso en seco	Codeína	Orpavina	Tebaina	Noscapina
2012/13	GSK MORENA CVS 4		Surco de OP	3,520	0,310	0,050	0,170	0,000	86,9	7,7	1,2	4,2	0,0					
	GSK NOSCAPINA CVS 3		Surco de OP	2,630	0,180	0,015	0,030	2,530	48,7	3,3	0,3	0,6	47,2					
	S-121435	M2	Surco de OP	1,780	0,140	0,010	0,060	2,850	36,8	2,9	0,2	1,2	58,9					
			Cáp A SP	0,590	0,060	0,020	0,030	4,230	11,9	1,2	0,4	1,6	84,9					
2013/14	GSK MORENA CVS 5		Surco de OP	3,840	0,140	0,040	0,135	0,090	90,5	3,3	0,9	3,2	2,1					
	GSKTEBAÍNA CVS 3		Surco de OP	0,970	0,210	1,150	2,970	0,060	18,1	2,9	21,5	55,4	1,1					
	GSK NOSCAPINA CVS 4		Surco de OP	2,225	0,185	0,115	0,25	1,955	47,0	3,8	2,4	5,3	41,3					
	MC 746 (cápsula autopollinizada A de la progenie de S-121435)	M3	Surco de OP	0,27	0,06	0,01	0,07	3,370	7,1	1,6	0,3	1,9	89,2					
2014/15	GSK NOSCAPINA CVS 3		Cápsulas A-D SP	0,19 ± 0,295	0,033 ± 0,013	0,01 ± 0	0,07 ± 0,046	3,47 ± 1,39	4,05 ± 4,95	1,03 ± 0,74	0,31 ± 0,13	1,70 ± 0,56	92,91 ± 4,87					
	GSK NOSCAPINA CVS 4		Surco de OP	2,125	0,145	0,025	0,065	1,885	50,1	3,4	0,6	1,5	44,4					
	GSK NOSCAPINA CVS 5		Surco de OP	1,145	0,080	0,030	0,175	2,520	29,0	2,0	0,8	4,4	63,8					
	GSK NOSCAPINA CVS 6		Surco de OP	2,325	0,095	0,01	0,035	1,995	52,1	2,1	0,2	0,8	44,7					
2014/15	GSK NOSCAPINA CVS 6		Surco de OP	2,375	0,165	0,015	0,055	1,71	55,0	3,8	0,3	1,3	30,6					
	MD 2717 (cápsula A autopollinizada de la progenie de MC 746)	M4	Surco de OP	0,020	0,020	0,010	0,080	3,610	0,530	0,530	0,270	2,140	96,520					
	MD 2717 (cápsula A autopollinizada de la progenie de MC 746)	M4	Cápsulas A-D SP	0,028 ± 0,005	0,035 ± 0,013	0,02 ± 0	0,058 ± 0,019	4,108 ± 0,39	0,655 ± 0,152	0,803 ± 0,322	0,474 ± 0,046	1,377 ± 0,517	95,661 ± 0,717					

* OP = polinizada sin cubrir; SP-cáps(s) = cápsula(s) autopollinizadas.

** en base a los alcaloides principales: Morfina, Codeína, Orpavina, Tebaina y Noscapina

REIVINDICACIONES

1. Una planta del género *Papaver* en donde dicha planta se modifica en un gen que comprende una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 6, 7 u 8, o una molécula de ácido nucleico que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO 6, 7 u 8 respecto a la secuencia de nucleótidos completa y codifica un citocromo P450-oxidorreductasa modificada que cataliza la conversión de (S)-reticulina a (R)-reticulina en donde dicha modificación es homocigótica, se hereda de manera estable y reduce o anula la expresión o actividad de dicho dominio citocromo P450 y/o dominio oxidorreductasa de dicho polipéptido modificado, en donde la noscapina comprende al menos el 50 % del contenido de alcaloides de bencilisoquinolina de dicha planta modificada.
2. La planta de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha molécula de ácido nucleico modificada es:
 - i) al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, 7 u 8 respecto a la secuencia de nucleótidos completa; o
 - ii) es al menos 99 % idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO 6, 7 u 8, respecto a la secuencia de nucleótidos completa y en donde dicha modificación es una adición, sustitución o delección de al menos una base nucleotídica entre los nucleótidos 1280-1300 expuestos en la SEQ ID NO 6, 7 u 8.
3. La planta de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha modificación es una sustitución de al menos una base nucleotídica entre los nucleótidos 1280-1300 expuestos en la SEQ ID NO 6, 7 u 8 o en donde dicha modificación es una sustitución de al menos una base nucleotídica entre los nucleótidos 1285-1295 expuestos en la SEQ ID NO 6, 7 u 8 o en donde dicha modificación es una sustitución de C por T de la base nucleotídica en el nucleótido 1291 de la SEQ ID NO 6, 7 u 8.
4. La planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde dicho polipéptido modificado tiene actividad reducida o anulada y se selecciona del grupo que consiste en:
 - i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9, 10 u 11;
 - ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos modificada que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de longitud completa como se expone en la SEQ ID NO: 9, 10 u 11, en donde dicha secuencia se modifica mediante adición, delección o sustitución de una o más secuencias de aminoácidos y en donde dicho polipéptido tiene actividad enzimática reducida o anulada en la conversión de (S)-reticulina a 1,2-deshidrorreticulina y/o a (R)-reticulina en comparación con el polipéptido no modificado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9, 10 u 11.
5. La planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde dicho polipéptido modificado tiene actividad reducida o anulada y se selecciona del grupo que consiste en:
 - i) un polipéptido modificado que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15;
 - ii) un polipéptido modificado que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 16;
 - iii) un polipéptido modificado que comprende una secuencia de aminoácidos modificada que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de longitud completa como se expone en la SEQ ID NO: 15 o 16, en donde dicha secuencia se modifica mediante adición, delección o sustitución de una o más secuencias de aminoácidos y en donde dicho polipéptido tiene actividad enzimática reducida o anulada en la conversión de 1,2-deshidrorreticulina a (R)-reticulina en comparación con el polipéptido no modificado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 o 16.
6. La planta de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho polipéptido modificado se selecciona del grupo:
 - i) al menos una adición, delección o sustitución de un residuo de aminoácido en la región de los aminoácidos 386-486 como se expone en la SEQ ID NO: 9, 10 u 11;
 - ii) al menos una adición, delección o sustitución de un residuo de aminoácido en la región de los aminoácidos 426-436 como se expone en la SEQ ID NO: 9, 10 u 11 y en donde dicho polipéptido modificado es al menos 90 % idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9, 10 u 11;
 - iii) dicho polipéptido modificado comprende una delección o sustitución del residuo de aminoácido 431 de la SEQ ID NO: 9 en donde dicho polipéptido modificado es al menos 90 % idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9;
 - iv) dicho polipéptido modificado comprende una delección o sustitución del residuo de aminoácido 432 de la SEQ ID NO: 10 en donde dicho polipéptido modificado es al menos 90 % idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10;
 - v) dicho polipéptido modificado comprende una delección o sustitución del residuo de aminoácido 431 de la SEQ ID NO: 11 en donde dicho polipéptido modificado es al menos 90 % idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11;
 - vi) dicho polipéptido modificado comprende una sustitución o delección en el

- aminoácido arginina 431 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9;
vii) en donde dicho polipéptido modificado comprende una sustitución o delección en el aminoácido arginina 432 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10;
viii) en donde dicho polipéptido modificado comprende una sustitución o delección en el aminoácido arginina 431 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11;
ix) en donde dicha modificación es la sustitución de arginina por triptófano en la posición 431 de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 9;
x) en donde dicha modificación es la sustitución de arginina por triptófano en la posición 432 de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 10;
xi) en donde dicha modificación es la sustitución de arginina por triptófano en la posición 431 de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 11.
7. La planta de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho polipéptido modificado comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 27, 28 o 29.
 8. La planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha planta comprende uno o más genes que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
 - i) una secuencia de nucleótidos como la representada por la secuencia en la SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26;
 - ii) una secuencia de nucleótidos en donde dicha secuencia está degenerada como resultado del código genético con respecto a la secuencia de nucleótidos definida en (i);
 - iii) una molécula de ácido nucleico cuya hebra complementaria se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas a la secuencia en la SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 en donde dicha molécula de ácido nucleico codifica polipéptidos implicados en la biosíntesis de noscapina o intermediarios en la biosíntesis de noscapina de *Papaver*.
 9. La planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde la planta es nula para dicha citocromo P450-oxidoreductasa.
 10. La planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la planta es heterocigótica para dicho gen modificado.
 11. La planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la planta es homocigótica para dicho gen modificado.
 12. La planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde la planta es *Papaver somniferum*.
 13. Una cápsula, paja o semilla de *Papaver* obtenida de la planta modificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
 14. El uso de un gen que codifica una citocromo P450-oxidoreductasa que cataliza la conversión de (S)-reticulina a (R)-reticulina en la identificación de cultivares de *Papaver* que tienen niveles mejorados de noscapina o intermediarios en la síntesis de noscapina en donde dicho gen comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
 - i) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico como se expone en la SEQ ID NO: 6, 7 u 8; o
 - ii) una molécula de ácido nucleico cuya hebra complementaria se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, 7 u 8, y que codifica un polipéptido que tiene expresión o actividad reducida o anulada de una citocromo P450-oxidoreductasa que cataliza la conversión de (S)-reticulina a (R)-reticulina en comparación con una planta de *Papaver* de tipo silvestre que comprende un gen que codifica una citocromo P450-oxidoreductasa funcional.
 15. Un método para identificar una planta de *Papaver* que comprende un gen de la citocromo P450-oxidoreductasa modificado que comprende las etapas:
 - i) obtener una muestra de material vegetal a partir de una planta a analizar;
 - ii) extraer ácido nucleico genómico de dicho material vegetal; y
 - iii) analizar el ácido nucleico genómico extraído que codifica una variante de secuencia de nucleótidos de las secuencias de nucleótidos expuestas en la SEQ ID NO: 6, 7 u 8; y opcionalmente,
 - iv) comparar la secuencia con una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 6, 7 u 8; y opcionalmente
 - v) preparar una mezcla de reacción que comprende:
 - a) ADN genómico a analizar,

- b) un primer cebador oligonucleotídico directo específico de alelo que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a dicha secuencia de nucleótidos del gen de la citocromo P450-oxidoreductasa y una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de un primer casete indicador de fluorescencia,
- 5 c) un segundo cebador oligonucleotídico directo específico de alelo que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a dicho gen de la citocromo P450-oxidoreductasa y una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de un segundo casete indicador de fluorescencia en donde el nucleótido en el extremo 3' de dicha segunda secuencia de cebador oligonucleotídico es complementaria a una variante de secuencia de nucleótidos polimórfica de dicho
- 10 gen de la citocromo P450-oxidoreductasa, y en donde la secuencia de nucleótidos de dichos primer y segundo cebadores oligonucleotídicos es complementaria a la misma secuencia de nucleótidos aguas arriba de dicho gen de la citocromo P450-oxidoreductasa;
- d) un cebador oligonucleotídico inverso que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos aguas abajo de dicha secuencia de nucleótidos del gen de la citocromo
- 15 P450-oxidoreductasa; y
- e) dos casetes indicadores que comprenden ácido nucleico de doble hebra que comprende:
- un primer ácido nucleico de doble hebra en donde una hebra comprende una etiqueta fluorescente y es complementaria a dicho primer cebador específico de alelo y una segunda hebra que
- 20 comprende una etiqueta desactivadora que desactiva dicha etiqueta fluorescente; y
- un segundo ácido nucleico de doble hebra en donde una hebra comprende una etiqueta fluorescente diferente de la etiqueta fluorescente de i) y es complementaria a dicho segundo cebador específico de alelo y una segunda hebra que comprende una etiqueta desactivadora que desactiva dicha
- 25 segunda etiqueta fluorescente;
- ii) calentar dicha mezcla de reacción para desnaturalizar el ácido nucleico genómico y dichos indicadores de doble hebra y proporcionar condiciones para aparear cebadores a su secuencia de nucleótidos complementaria respectiva, extender por cebado dichos cebadores oligonucleotídicos apareados y
- 30 amplificación de la cadena de la polimerasa de dicha mezcla; y iii) detectar la emisión de fluorescencia.
16. Un método para la extracción de noscapina de una planta o cápsula o paja modificada de acuerdo con la invención que comprende las etapas:
- 35 i) recolectar una planta, cápsula o paja modificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y formar una mezcla de reacción de material vegetal en partículas;
- ii) extraer con solvente dicha mezcla de reacción para proporcionar una fracción enriquecida en alcaloides;
- y
- iii) iii) concentrar dicha fracción enriquecida en alcaloides para proporcionar una fracción de noscapina enriquecida.

Figura 1

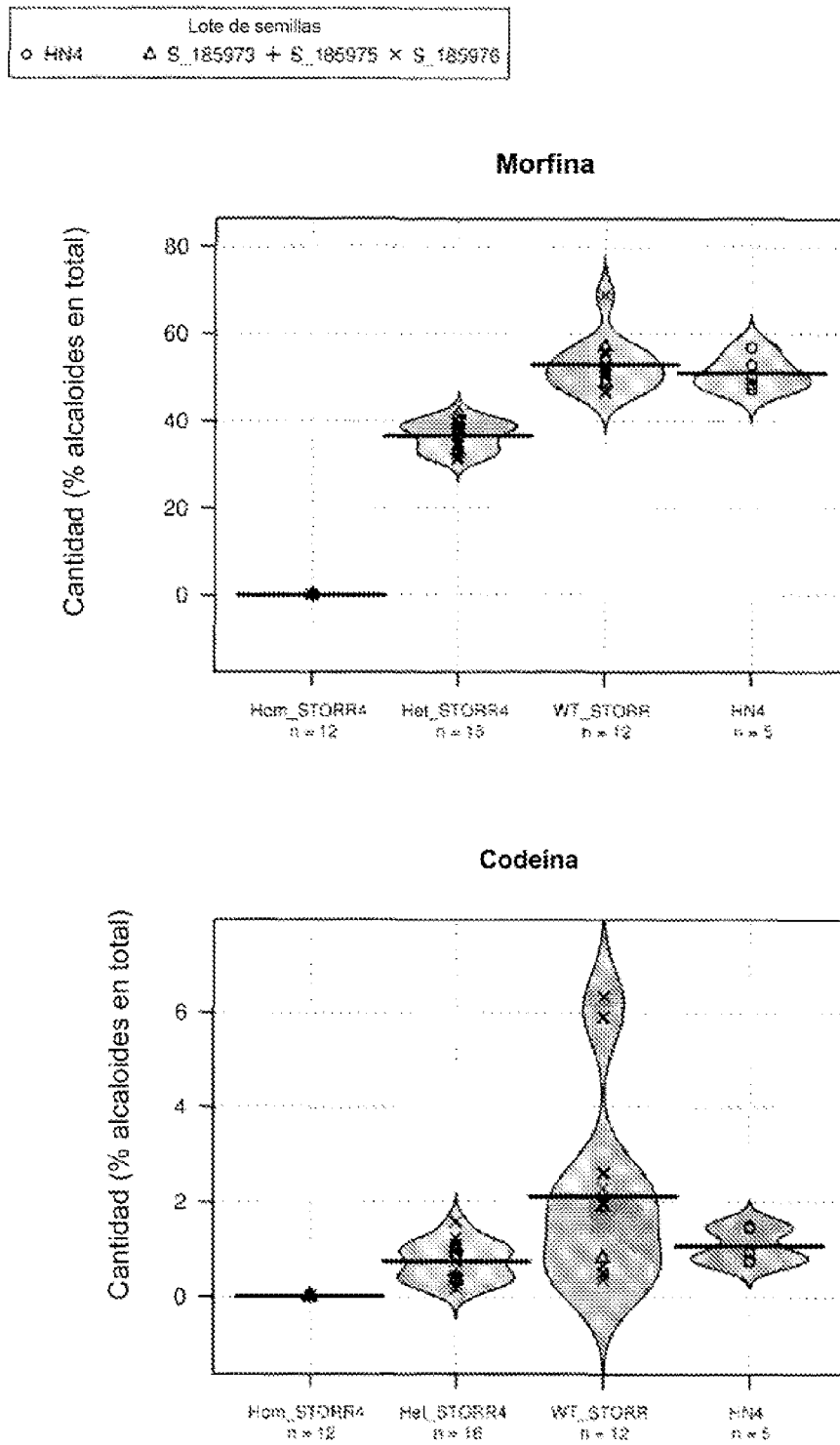


Figura 1 continuación

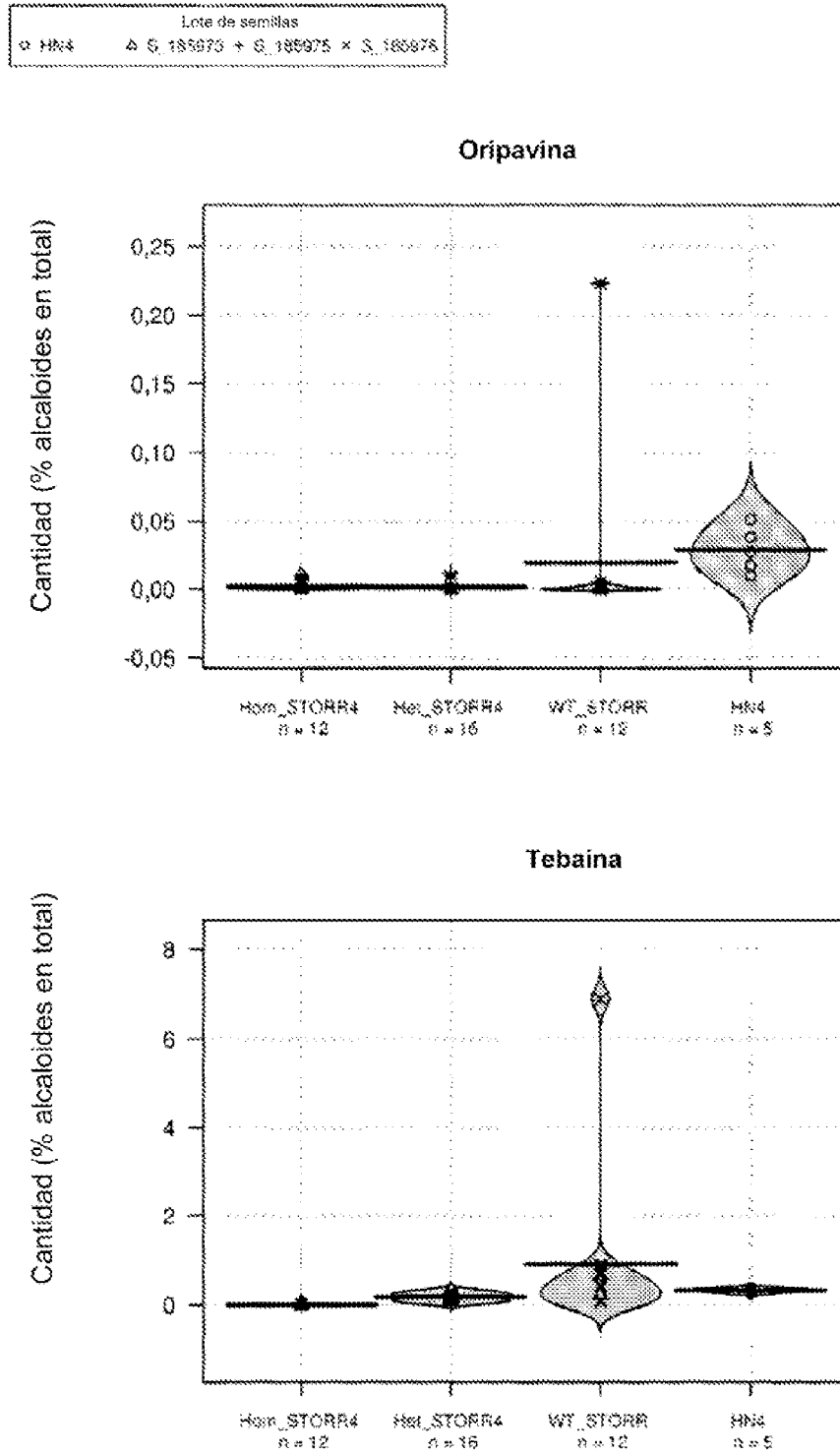


Figura 1 continuación

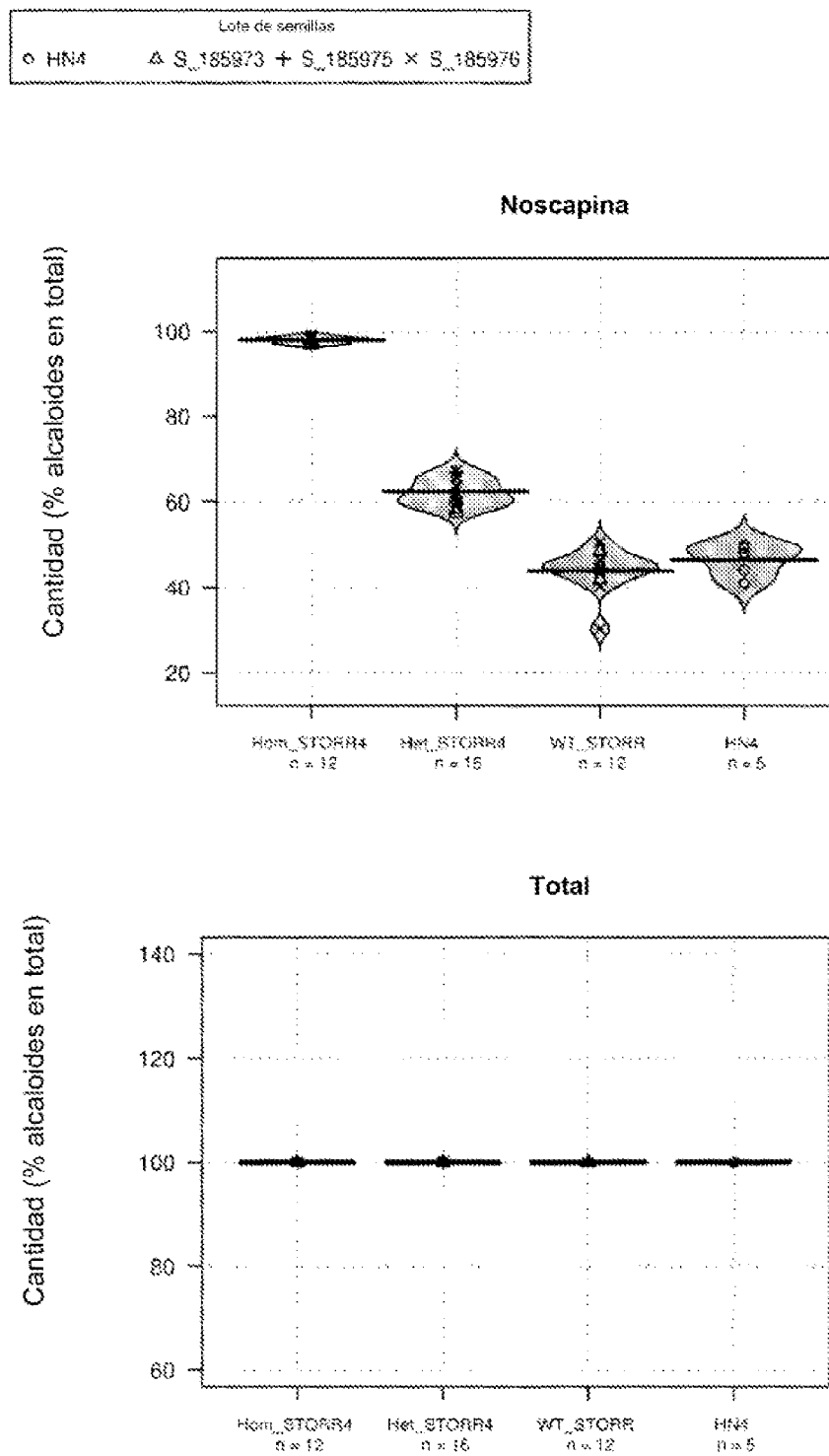


Figura 2

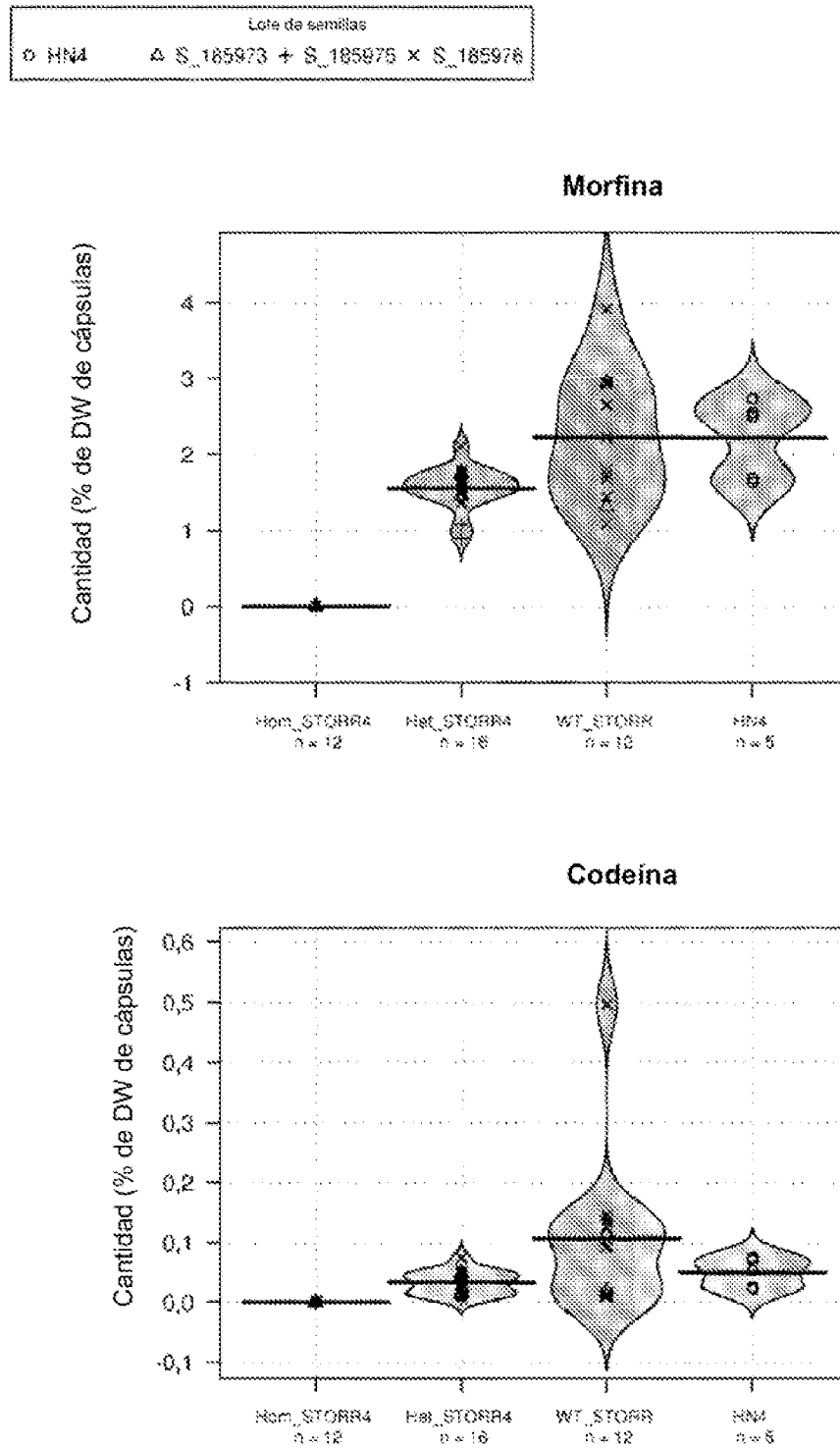


Figura 2 continuación

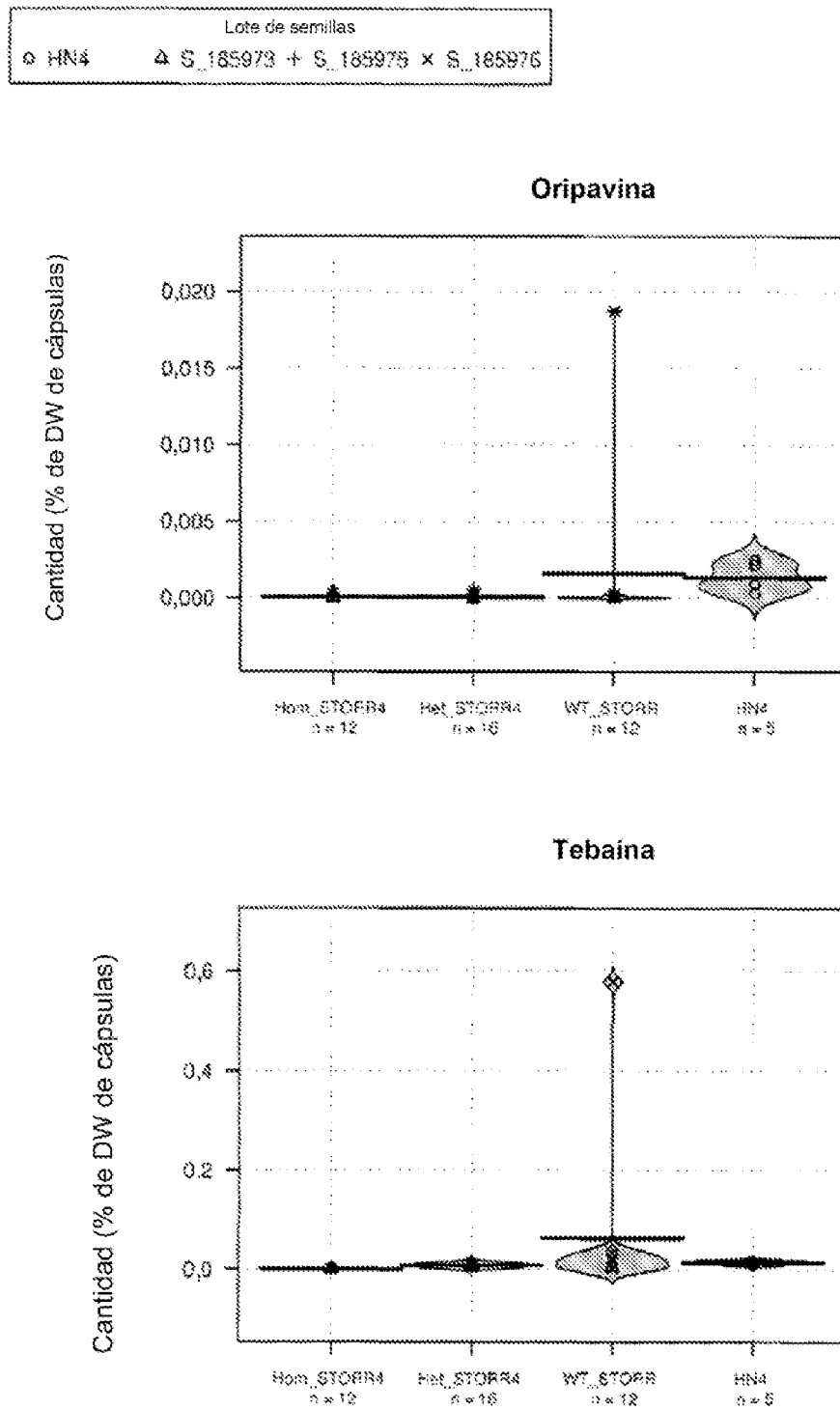


Figura 2 continuación

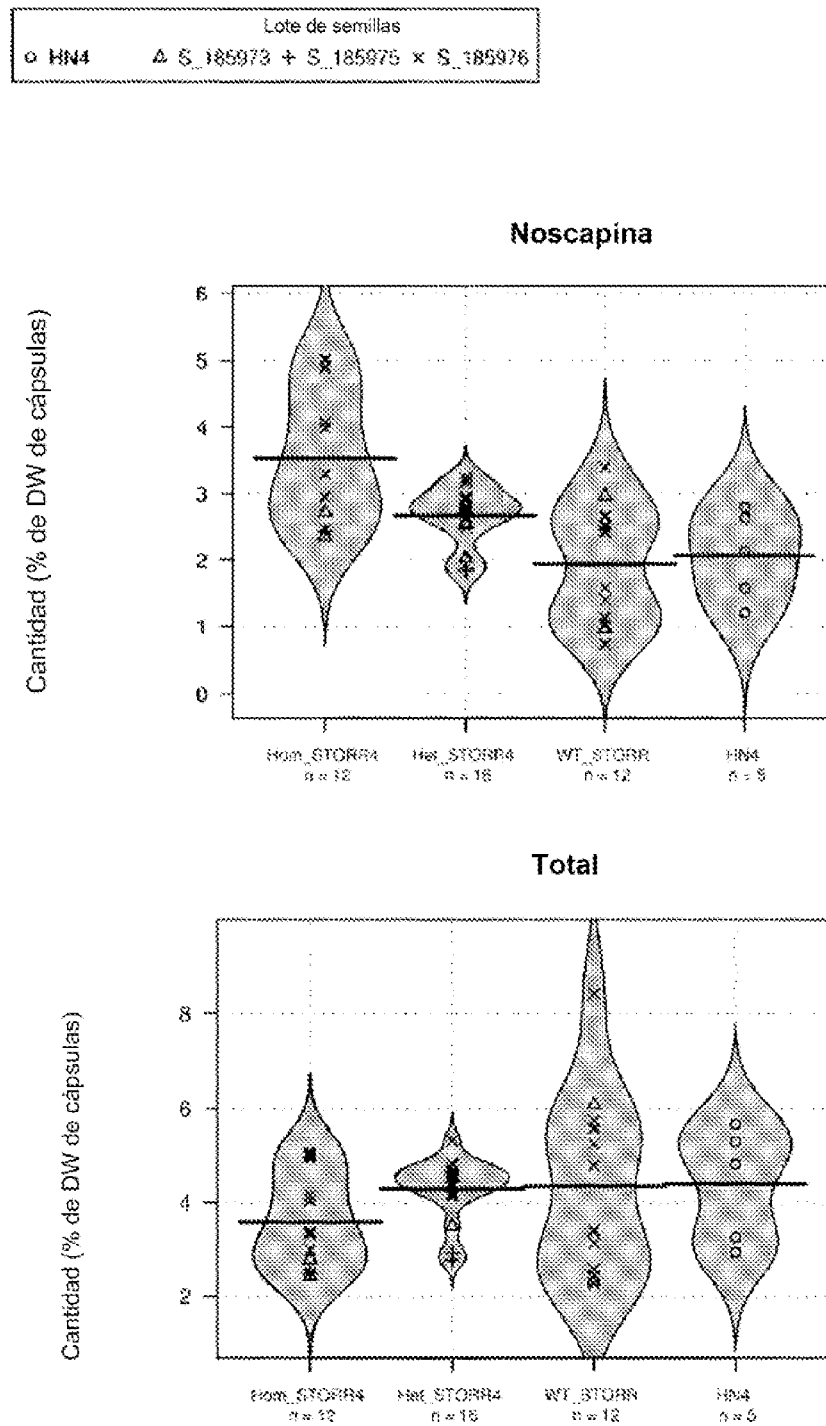


Figura 3

