



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0616844-2 A2



(22) Data de Depósito: 05/10/2006
(43) Data da Publicação: 05/07/2011
(RPI 2113)

(51) Int.CI.:
C12N 15/82 2006.01
C12N 9/10 2006.01
C12N 9/04 2006.01
A01H 5/00 2006.01
C12P 19/04 2006.01

(54) Título: CÉLULA DE PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA, USO DA MESMA, PLANTA, PROCESSO PARA PRODUÇÃO DA MESMA, MATERIAL DE REPRODUÇÃO DE PLANTAS, PARTES DE PLANTAS COLHÍVEIS, PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE HIALURONANO, COMPOSIÇÃO, BEM COMO SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO

(30) Prioridade Unionista: 05/10/2005 EP 05 090278.2,
11/10/2005 US 60/725,183

(73) Titular(es): BAYER CROPSCIENCE AG

(72) Inventor(es): Claus Frohberg

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006009774 de 05/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/039315de 12/04/2007

(57) Resumo: CÉLULA DE PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA, USO DA MESMA, PLANTA, PROCESSO PARA PRODUÇÃO DA MESMA, MATERIAL DE REPRODUÇÃO DE PLANTAS, PARTES DE PLANTAS COLHÍVEIS, PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE HIALURONANO, COMPOSIÇÃO, BEM COMO SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO. A presente invenção refere-se a células de plantas e plantas, que sintetizam uma quantidade aumentada de hialuronano, bem como processos para a produção dessas plantas, como também processos para a produção de hialuronano com auxílio dessas células de plantas ou plantas. Nesse caso, as células de plantas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas apresentam a atividade de uma hialuronano sinta-se e, adicionalmente, uma atividade aumentada de uma UDP-glicose-desidrogenase (UDP-Glc-DH) em comparação com células de plantas de tipo silvestre ou plantas de tipo silvestre. Além disso, a presente invenção refere-se à utilização de plantas com síntese de hialuronano aumentada para a produção de hialuronano e alimentos ou forragens, que contêm hialuronano.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "CÉLULA DE PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA, USO DA MESMA, PLANTA, PROCESSO PARA PRODUÇÃO DA MESMA, MATERIAL DE REPRODUÇÃO DE PLANTAS, PARTES DE PLANTAS COLHÍVEIS, PROCESSO 5 PARA PRODUÇÃO DE HIALURONANO, COMPOSIÇÃO, BEM COMO SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO".

A presente invenção refere-se a células de plantas e plantas, que sintetizam uma quantidade aumentada de hialuronano, bem como processos para a produção dessas plantas, como também processos para a 10 produção de hialuronano com auxílio dessas células de plantas ou plantas. Nesse caso, as células de plantas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas apresentam a atividade de uma hialuronano sintase e, adicionalmente, um atividade aumentada de uma desidrogenase de UDP-glicose (UDP-Glc-DH) em comparação às células de plantas de tipo 15 silvestre ou plantas de tipo silvestre. Além disso, a invenção refere-se à utilização de plantas com síntese aumentada de hialuronano para a produção de hialuronano e alimentos ou forragens, que contêm hialuronano.

Hialuronano é um mucopolissacarídeo (glucosaminoglucano) linear, não ramificado, presente na natureza, o qual é composto de moléculas alternativas de ácido glucurônico e N-acetyl-glucosamina. O componente básico de hialuronano consiste no dissacarídeo beta-1,3-N-acetyl-glucosamina de ácido glucurônico. Essa unidade de repetição está ligada uma com a outra no hialuronano por ligações beta-1,4.

O termo ácido hialurônico é frequentemente utilizado na área 25 farmacêutica. Visto que o hialuronano se apresenta, na maioria das vezes, como polianion e não como ácido livre, utiliza-se a seguir preferentemente o termo hialuronano, em que as duas formas de molécula valem como sendo abrangidas pela respectiva designação.

O hialuronano possui características físico-químicas extraordinárias, tais como por exemplo, características de polieletrolitos, características viscoelásticas, uma alta capacidade de ligar água, características de formação de gel, que, além de outras características de hialuronano, são descritas 30

em um artigo sinóptico por Lepcik et al. (1998, *Chemical Reviews* 98(8) 2663-2684).

O hialuronano é componente de tecido de ligação extracelular e líquidos do corpo de vertebrados. No homem, o ácido hialurônico é sintetizado pela membrana celular de todas as células do corpo, principalmente pelas células mesenquimais e está presente de maneira ubiquitária no corpo, com uma concentração particularmente alta nos tecidos de ligação, na matriz extracelular, no cordão umbilical, no líquido das articulações, no tecido cartilaginoso, na pele e no corpo vítreo do olho (Bernhard Gebauer, 1998, 5 Inaugural-Dissertation, Virchow-Klinikum, Faculdade de Medicina Charité da Universidade Humboldt em Berlin; Fraser et al., 1997, *Journal of Internal Medicine* 242, 27-33). Recentemente, o hialuronano também pôde ser comprovado em organismos animais não vertebrados (moluscos) (Volpi e Mac- 10 caci, 2003, *Biochimie* 85, 619-625).

Além disso, algumas bactérias gram-positivas patogênicas humanas (*estreptococos* do grupo A e C) e bactérias gram-negativas (*pasteurela*) sintetizam hialuronano como exopolissacarídeos, que preservam essas bactérias contra o acesso do sistema imunológico de seu hospedeiro, pois o hialuronano representa uma substância não imunógena. Vírus, os quais infectam algas verdes do gênero *Chlorella* monocelulares e parcialmente presentes como endossimbiontes em espécies *Paramecium*, proporcionam às algas verdes monocelulares após a infecção do vírus, a capacidade, de sintetizar hialuronano (Graves et al., 1999, *Virology* 257, 15-23). No entanto, a capacidade para a síntese de hialuronano não é uma característica, que está 15 agregada às respectivas algas. A capacidade das algas, de sintetizar hialuronano é intermediada por uma infecção de um vírus, cujo genoma apresenta uma sequência que codifica a hialuronano sintase (DeAngelis, 1997, *Science* 278, 1800-1803). Além disso, o vírus contém sequências de genoma, que codificam um UDP-glicose-desidrogenase (UDP-Glc-DH). UDP-Gli-DH 20 catalisa a síntese de ácido UDP-glucurônico, que é utilizado como substrato pela hialuronano sintase (DeAngelis et al., 1997, *Science* 278, 1800-1803, Graves et al., 1999, *Virology* 257, 15-23). Não se conhece a importância da 25 30

expressão de UDP-Glc-DH em vírus de células de Chlorella infectadas para a síntese de hialuronano e nem se ela é necessária para a síntese de hialuronano.

As próprias plantas naturais não apresentam ácido nucleico em seu genoma, que codificam proteínas, que catalisam a síntese de hialuronano e, embora tenham sido descritos e caracterizados um sem-número de carboidratos vegetais, até agora não foram comprovados nem hialuronano nem moléculas relacionadas ao hialuronano em plantas naturais, não infectadas (Graves et al., 1999, *Virology* 257, 15-23).

A catálise da síntese de hialuronano é realizada por uma única enzima integrada à membrana ou associada à membrana, a hialuronano sintase. As hialuronano sintases pesquisadas até agora podem ser divididas em dois grupos: hialuronano sintases da classe I e hialuronano sintases da classe II (DeAngelis, 1999, *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences* 56, 670-682). Uma outra distinção das hialuronano sintases de vertebrados é efetuada com base nas isoenzimas identificadas. As diversas isoenzimas são designadas com números arábicos na ordem de sua identificação (por exemplo, hsHAS1, hsHAS2, hsHAS3).

O mecanismo da transferência de moléculas de hialuronano sintetizadas através da membrana do citoplasma para longe do meio que envolve as células, ainda não está completamente esclarecido. Hipóteses anteriores partiam do fato de que o transporte através da membrana celular para longe da hialuronano sintase seria realizado por ele mesmo. No entanto, resultados atuais apontam para o fato de que o transporte de moléculas de hialuronano se realiza através da membrana do citoplasma por um transporte dependente de energia por meio de proteínas de transporte competentes para esse fim. Dessa maneira, através de mutagênese, foram produzidas cepas de *Streptococcus*, nas quais a síntese de uma proteína de transporte ativa foi inibida. Essas cepas sintetizam menos hialuronano do que o tipo silvestre de cepas de bactérias correspondentes (Ouskova et al., 2004, *Glycobiology* 14(10), 931-938). Em células de fibroblastos humanas foi possível demonstrar, com auxílio de agentes de ação especificamente inibidora sobre

proteínas de transporte, que tanto a quantidade de hialuronano produzido, como também a atividade de sintases de hialuronano pode ser reduzida (Prehm und Schumacher, 2004, Biochemical Pharmacology 68, 1401-1410). Não se sabe, se e se em tudo, em que quantidade de proteínas de transporte, que podem transportar hialuronano, está presente em plantas.

As extraordinárias características do hialuronano divulgam uma variedade de possibilidades para a aplicação nos mais diversos campos, tais como, por exemplo, na farmácia, na indústria cosmética, na produção de alimentos e forragens, em aplicações técnicas (por exemplo, como lubrificantes) e outros. As aplicações mais importantes, nas quais o hialuronano é atualmente utilizado, estão na área medicinal e cosmética (vide, por exemplo, Lapcik et al., 1998, Chemical Reviews 98(8), 2663-2684, Goa und Benfield, 1994, Drugs 47(3), 536-566). Na área medicinal, os produtos contendo hialuronano são atualmente utilizados para o tratamento intra-articular da artrose, bem como na oftalmologia, que são utilizados em cirurgias no olho. O hialuronano também é utilizado para o tratamento de doenças articulares em cavalos de corrida. Além disso, o ácido hialurônico é componente de alguns rinológicos, que servem, por exemplo, na forma de gotas oftálmicas e nasais para umedecer a mucosa seca. Soluções injetáveis contendo hialuronano são utilizadas como analgésicos e antirreumáticos. Hialuronano ou camadas contendo hialuronano derivatizado são aplicadas na cura de feridas. Implantes de gel contendo hialuronano são usados como preparações dermatológicas para a correção de deformações da pele na cirurgia plástica.

Para aplicações farmacológicas prefere-se o hialuronano com um alto peso molecular.

Na medicina estética as preparações de hialuronano são incluídas nos materiais apropriados de preenchimento de pele. Injetando hialuronano, obtém-se por um tempo limitado o alisamento de rugas ou um volume aumentado dos lábios. Em produtos cosméticos, especialmente em cremes para pele e loções, o hialuronano encontra frequente aplicação como ume-decedor, devido a sua alta capacidade de ligação à água.

Além disso, as preparações contendo hialuronano são vendidas

como os chamados nutracêuticos(suplementos alimentares), que também são aplicados em animais (por exemplo, cães, cavalos) para a prevenção e alívio de artrose.

Hialuronano utilizado para fins industriais é atualmente isolado
5 de tecidos animais (cristas de galos) ou produzido fermentativamente por meio de culturas de bactérias.

Um processo para o isolamento de hialuronano de cristas de galos ou alternativamente de cordões umbilicais é descrito na US 4.141.973. Além de hialuronano em tecidos animais (por exemplo, cristas de galos, cor-
10 dões umbilicais) ainda há outros mucopolissacarídeos relacionados com hia-
luronano, tais como sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratano, sulfato de heparano e heparina. Organismos animais apresen-
tam, além disso, proteínas (hialaderinas), que se ligam especificamente em hialuronano e que são necessárias para as mais diversas funções no orga-
15 nismo, tais como, por exemplo, para a degradação de hialuronano no fígado, a função de hialuronano como estrutura condutora para a migração celular, a regulação da endocitose, o ancoramento de hialuronano na superfície da célula ou a formação de redes de hialuronano (Turley, 1991, Adv Drug Deli-
very Rev 7, 257 e seguintes; Laurent e Fraser, 1992, FASEB J. 6, 183 e se-
20 guintes; Stamenkoviv e Aruffo, 1993, Methods Enzymol. 245, 195 e seguin-
tes; Knudson e Knudson, 1993, FASEB 7, 1233 e seguintes).

As cepas de *Streptococcus* usadas para a produção bacteriana de hialuronano pertencem exclusivamente às bactérias patogênicas huma-
nas. Ao serem cultivadas essas bactérias produzem também exotoxinas (pi-
25 rogênicas) e hemolisinas (estreptolisina (especialmente alfa- e beta-
hemolisina) (Kilian, M.: *Streptococcus and Enterococcus*. In: *Medical Micro-
biology*. Greenwood, D.; Slack, RCA; Peutherer, J.F. (Eds.). Capítulo 16.
Churchill Livingstone, Edinburgh, Reino Unido: páginas 174-188, 2002, ISBN
0443070776), que são colocadas em meio de cultura. Esse dificulta a purifi-
30 cação e isolamento do hialuronano, o qual foi produzido com auxílio de ce-
pas de *Streptococcus*. A presença de exotoxinas e hemolisinas nas prepara-
ções representa um problema particularmente para aplicações farmacêuti-

cas. A US 4.801.539 descreve a produção de hialuronano através da fermentação de uma cepa de bactérias que sofreu mutagênese (*Streptococcus zooedemicus*). A cepa de bactérias que sofreu mutagênese utilizada não sintetiza mais a beta-hemolisina. Nesse caso, foi obtido um rendimento de 5 3,6 g de hialuronano por litro de cultura.

A EP 0694616 descreve um processo para o cultivo de *Streptococcus zooedemicus* ou *Streptococcus equi*, no qual, com as condições de cultura, não é sintetizada estreptolisina, mas grandes quantidades de hialuronano. Nesse caso, foi obtido um rendimento de 3,5 g de hialuronano por 10 litro de cultura.

Durante a cultura, cepas de *Streptococcus* transferem a enzima hialuronidase para o meio de cultura, o que leva a que também neste sistema de produção o peso molecular durante a purificação seja reduzido. O uso de hialuronidase de cepas de *Streptococcus* negativas ou de processos de 15 produção, nos quais a produção de hialuronidase é inibida durante a cultura, para a produção de hialuronano, são descritos na US 4.782.046. Nesse caso, é obtido um rendimento de até 2,5 g de hialuronano por litro de cultura, sendo obtido um peso molecular médio máximo de $3,8 \times 10^6$ Da com uma distribuição de peso molecular de $2,4 \times 10^6$ até $4,0 \times 10^6$.

20 A US 20030175902 e a WO 03 054163 descrevem a produção de hialuronano com auxílio da expressão heteróloga de uma hialuronano sintase a partir de *Streptococcus equisimilis* em *Bacillus subtilis*. Para obter a produção de quantidades suficientes de hialuronano, necessita-se, além da expressão heteróloga de uma hialuronano sintase, também a expressão simultânea de uma UDP-glicose-desidrogenase nas células de *Bacillus*. A quantidade absoluta de hialuronano, que é obtida na produção com auxílio de *Bacillus subtilis*, não é mencionada na US 20030175902 e na WO 03 054163. Foi obtido um peso molecular médio máximo de cerca de $4,2 \times 10^6$ Da. Esse peso molecular médio, no entanto, foi obtido apenas para a cepa 25 de *Bacillus* recombinante, na qual um gene que codifica o gene da hialuronano sintase de *Streptococcus equisimilis* e o gene que codifica a UDP-glicose-desidrogenase de *Bacillus subtilis* foi integrado no genoma do *Bacil-* 30

lus subtilis sob o controle do promotor *amyQ* e simultaneamente o gene *cxpY* endógeno de *Bacillus subtilis* foi inativado (que codifica uma citocromoxidase P450).

A WO 05 012529 descreve a produção de plantas de tabaco transgênicas que foram transformadas com moléculas de ácido nucleico, que codifica hialuronano sintases a partir de vírus infectados com *Chlorella*. Na WO 05 012529, por um lado, foram utilizadas sequências de ácido nucleico, que codifica a hialuronano sintase da cepa CVHI1 do vírus *Chlorella* e, por outro lado, da cepa CVKA1 do vírus *Chlorella*, para a transformação de plantas de tabaco. A síntese de hialuronano pôde ser comprovada apenas para uma planta, que após a transformação com uma sequência de ácido nucleico, que codifica uma hialuronano sintase, que foi isolada da cepa CVKA1 do vírus *Chlorella*. Para plantas de tabaco, que com uma sequência de ácido nucleico, que codificam uma hialuronano sintase, que foi isolada da cepa CVHI1 do vírus *Chlorella*, não foi possível comprovar nenhuma síntese de hialuronano nas plantas transgênicas correspondentes. A quantidade de hialuronano que foi sintetizada pela única planta de tabaco transgênica produtora de hialuronano, obtida na WO 05 012529, é indicada com cerca de 4,2 µg de hialuronano por ml de volume medido o que, considerando-se a descrição para a execução do respectivo experimento, corresponde aproximadamente a uma quantidade de no máximo 12 µg de hialuronano produzido por grama de peso fresco de material da planta.

Hialuronano sintase catalisa a síntese de hialuronano partindo dos produtos de partida UDP-N-acetyl glucosamina e ácido UDP-glucurônico. Os dois produtos de partida mencionados estão presentes em células vegetais.

Ácido UDP-glucurônico serve em células vegetais como metabólito para um dos vários possíveis processos de síntese do ácido ascórbico (Lorence et al., 2004, Plant Physiol 134, 1200-1205) e como metabólito central para a síntese do componente da parede celular pectina e hemicelulose, que são sintetizadas na retícula endoplasmática da célula vegetal (Reiter, 1998, Plant Physiol Biochem 36(1), 167-176). O monômero mais importante

e mais frequente da pectina representa o ácido D-galacturônico (2004, H. W. Heldt em "Plant Biochemistry", 3^a edição, Academic Press, ISBN 0120883910), o qual é sintetizado com o emprego de ácido UDP-glucurônico. Além disso, entre outros, também podem ser sintetizados UDP-5-xilose, UDP-arabinose, ácido UDP-galacturônico e UDP-apiose, metabólitos para a síntese de hemicelulose e pectina, com o emprego de ácido UDP-glucurônico (Seitz et al., 2000, Plant Journal, 21(6), 537-546). O ácido UDP-glucurônico pode ser sintetizado em células vegetais ou por meio do metabolismo de fosfato de hexose, que abrange, entre outros, a reação de UDP-10-glicose para ácido UDP-glucurônico através de UDP-Glc-DH ou por meio do processo de metabolismo oxidativo *myo*-inositol, que abrange a reação de glicuronato-1-fosfato para ácido UDP-glucurônico por meio da uridiltransferase de fosfato de glicuronato-1-fosfato. Os dois processos de metabolismo para a síntese de ácido glucurônico parecem existir, independentes uns dos 15 outros, alternativamente em diferentes tecidos/estágios de desenvolvimento de plantas *Arabidopsis* (Seitz et al., 2000, Plant Journal 21(6), 537-546). Ainda não está esclarecido, que contribuição os dois processos de metabolismo mencionados (metabolismo de fosfato de hexose ou metabolismo oxidativo de *myo*-inositol) prestam em cada caso em relação à síntese do ácido 20 UDP-glucurônico (Kärkönen, 2005, Plant Biosystems 139(1), 46-49).

A enzima UDP-Glc-DH catalisa a reação de UDP-glicose para ácido UDP-glucurônico. Samac et al. (2004, Applied Biochemistry and Biotechnology 113-116, Humana Press, Editor Ashok Mulehandani, 1167-1182) descrevem a superexpressão específica de tecido de uma UDP-Glc-DH de 25 soja em células Phloem de alfafa com o objetivo, de aumentar o teor de pectina nos caules dessas plantas. Embora a atividade da UDP-Glc-DH possa ser aumentada em mais de 200% em comparação com o tipo silvestre de plantas correspondentes, a quantidade de pectina, que foi produzida por plantas correspondentes, era menor do que a quantidade de pectina, que foi 30 produzida pelas plantas de tipo silvestre correspondentes. A quantidade dos monômeros xilose e ramnose na fração da parede celular das respectivas plantas transgênicas estava aumentada, ao contrário do que a quantidade

de monômeros manose na fração da parede celular era reduzida.

A superexpressão constitutiva de uma UDP-Glc-DH em plantas *Arabidopsis* levou a que as respectivas plantas comparadas com plantas de tipo silvestre correspondentes mostrassem um crescimento aberrante e a-
5 presentassem um fenótipo anão (dwarf). A fração da parede celular das plantas correspondentes apresentou uma quantidade aumentada de manose e galactose e uma quantidade reduzida de xilose, arabinose e ácidos urôni-
cos em comparação às plantas de tipo silvestre correspondentes (Roman,
2004, "Studies on The Role of UDP-Glc-DH in Polysaccharide Biosynthesis",
10 Dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis, ISBN 91-554-6088-7, ISSN
0282-7476). Esses resultados estão, portanto, pelo menos parcialmente em desacordo com os resultados de Samac et al. (2004, Applied Biochemistry
and Biotechnology 113-116, Humana Press, Editor Ashok Mulehandani,
1167-1182), tinham comprovado uma quantidade reduzida de manose e
15 uma quantidade aumentada de xilose na fração da parede celular de plantas
transgênicas correspondentes.

A produção de hialuronano com auxílio da fermentação de cepas de bactérias está ligada a altos custos, pois as bactérias precisam ser fermentadas em recipientes estéreis, fechados, com condições de cultura con-
20 troladas, caras (vide, por exemplo, US 4.897.349). Além disso, a quantidade de hialuronano, que pode ser produzido por meio da fermentação de cepas de bactérias, é limitada pelas instalações de produção existentes em cada caso. Nesse caso, deve-se considerar também que os fermentadores, devi-
do às legalidades físicas, não podem ser construídos para volumes de cultu-
25 ra excessivamente grandes. De modo especial, menciona-se aqui a mistura uniforme para uma produção eficiente de substâncias introduzidas do exterior (por exemplo, fontes de substâncias nutritivas essenciais para bactérias, reagentes para a regulação do pH, oxigênio) com o meio de cultura, que po-
de ser assegurada em grandes fermentadores, se de tudo, somente com
30 grandes gastos técnicos.

A presença de outros mucopolissacarídeos e de proteínas que se ligam especificamente ao hialuronano em tecidos animais, encarece a

purificação de hialuronano de organismos animais. O uso de preparações medicinais contendo hialuronano, que são contaminadas com proteínas animais, pode levar a reações imunológicas indesejáveis do corpo de pacientes (US 4.141.973), especialmente quando o paciente apresenta uma alergia contra proteínas animais (por exemplo, albumina de galinha). Além disso, as quantidades (rendimentos) de hialuronano, que podem ser obtidas a partir de tecidos animais com qualidade e pureza satisfatórias, são baixas (crista de gallo: 0,079% w/w, EP 0144019, US 4.782.046), o que leva a que grandes quantidades de tecidos animais precisem ser processadas. Um outro problema no isolamento de hialuronano a partir de tecidos animais, consiste em que o peso molecular do hialuronano durante a purificação é reduzido, porque tecidos animais também apresentam uma enzima que degrada hialuronano (hialuronidase).

Cepas de *Streptococcus* produzem, além das hialuronidases e exotoxinas já mencionadas, também endotoxinas, que, quando presentes em produtos farmacológicos, representam riscos para a saúde do paciente. Em um estudo científico foi demonstrado, que mesmo preparações medicinais contendo hialuronano encontradas no mercado, ainda apresentam quantidades comprováveis de endotoxinas bacterianas (Dick et al., 2003, Eur J Ophtalmol. 13(2), 176-184). Uma outra desvantagem do hialuronano produzido com auxílio de cepas de *Streptococcus* consiste em que o hialuronano isolado apresenta um peso molecular mais baixo, do que hialuronano, que foi isolado de cristas de galos (Lapčík et al. 1998, Chemical Reviews 98(8), 2663-2684). A US 20030134393 descreve o emprego de uma cepa de *Streptococcus* para a produção de hialuronano, a qual sintetiza uma cápsula de hialuronano particularmente pronunciada (supercapsuladas). O hialuronano isolado após a fermentação apresentou um peso molecular de $9,1 \times 10^6$ Da. No entanto, o rendimento importou meramente em 350 mg por litro.

Na verdade, algumas das desvantagens da produção de hialuronano por meio de fermentação bacteriana ou do isolamento de tecidos animais, poderiam ser excluídas através da produção de hialuronano por meio

de plantas transgênicas, no entanto, as quantidades de hialuronano obtidas até agora, que podem ser obtidas por meio de plantas transgênicas, necessitariam de uma área cultivável relativamente grande, para produzir maiores quantidades de hialuronano. Além disso, o isolamento ou purificação de hialuronano de plantas, que apresentam um baixo teor de hialuronano é essencialmente mais caro e de custos mais intensos do que de plantas, que apresentam um maior teor de hialuronano.

5 Embora o hialuronano apresente características extraordinárias, até agora ele é utilizado, se de tudo, raramente, devido a sua pouca disponibilidade 10 e ao alto preço.

Por conseguinte, o objetivo da presente invenção, é pôr agentes e processos à disposição, que permitam pôr hialuronano à disposição em quantidade e qualidade suficiente, bem como abrir a possibilidade de disponibilizar hialuronano também para aplicações técnicas e aplicações na área 15 de alimentos e forragens.

Esse objetivo é resolvido pelas formas de concretização designadas nas reivindicações.

Dessa maneira, a presente invenção refere-se a células de plantas geneticamente modificadas ou plantas geneticamente modificadas, que 20 apresentam uma molécula de ácido nucleico integrada de maneira estável em seu genoma, que codifica uma hialuronano sintase, caracterizadas pelo fato de que as células de plantas mencionadas ou as plantas mencionadas apresentam adicionalmente uma atividade aumentada de uma proteína com 25 a atividade (enzimática) de uma UDP-glicose-desidrogenase (UDP-Glc-DH) em comparação às células de plantas de tipo silvestre correspondentes não geneticamente modificadas ou plantas de tipo silvestre não geneticamente modificadas.

Nesse caso, a modificação genética de células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, ou de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, pode ser qualquer modificação genética, que causa uma integração estável de uma molécula de ácido nucleico, que codifica uma hialuronano sintase em uma célula de planta ou

em uma planta e que leva ao aumento da atividade de uma proteína com a atividade (enzimática) de uma UDP-Glc-DH em células de plantas geneticamente modificadas ou em plantas geneticamente modificadas, em comparação com células de plantas de tipo silvestre correspondentes não geneticamente modificadas.

5 mente modificadas ou plantas de tipo silvestre não geneticamente modifica-das.

O termo "célula de planta de tipo silvestre" no contexto da pre-sente invenção, significa que se trata de células de plantas, que serviram como material de partida para a produção das células de plantas geneticamente

10 mente modificadas de acordo com a invenção, isto é, cuja informação gené-tica, apesar das modificações genéticas introduzidas, levam a uma integra-ção estável de uma molécula de ácido nucleico, que codifica uma hialuronano sintase e ao aumento da atividade de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, que corresponde a uma célula de planta geneticamente

15 modificada de acordo com a invenção.

O termo "planta de tipo silvestre" no contexto da presente inven-ção, significa que se trata de plantas, que serviram como material de partida para a produção das plantas geneticamente modificadas de acordo com a

20 invenção, isto é, cuja informação genética, apesar das modificações genéti-cas introduzidas, leva a uma integração estável de uma molécula de ácido nucleico, que codifica uma hialuronano sintase e ao aumento da atividade de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, que corresponde a uma planta geneticamente modificada de acordo com a invenção.

O termo "correspondente" no contexto da presente invenção, 25 significa que na comparação de vários objetivos, os respectivos objetivos, que são comparados uns com os outros, foram mantidos com as mesmas condições. No contexto da presente invenção, o termo "correspondente" no contexto com células de plantas de tipo silvestre ou plantas de tipo silvestre, significa que as células de plantas ou plantas, que são comparadas umas 30 com as outras foram cultivadas com as mesmas condições de cultura e que elas apresentam uma mesma idade (de cultura).

Pelo termo "hialuronano sintase (EC 2.4.1.212) no contexto da

presente invenção, deve ser entendida uma proteína, que partindo dos substratos ácido UDP-glucurônico (UDP-GlcA) e N-acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc), sintetiza hialuronano. A catálise da síntese de hialuronano segue, com isso, os seguintes esquemas de reação:

- 5 nUDP-GlcA + nUDP-GlcNAc → beta-1,4-[GlcA-beta-1,3-GlcNAc]_n + 2 nUDP
- Moléculas de ácido nucleico e sequências de proteínas correspondentes, que codificam hialuronano sintase são descritas, entre outros, para os seguintes organismos: coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) ocHas2 (EMBL AB055978.1, US 20030235893), ocHas3 (EMBL AB055979.1, US 10 20030235893); Pavian (*Papio anubis*) paHas1 (EMBL AY463695.1); sapo (*Xenopus laevis*) xlHas1 (EMBL M22249.1, US 20030235893), xlHas2 (DG42) (EMBL AF168465.1), xlHas3 (EMBL AY302252.1); homem (*Homo sapiens*) hsHAS1 (EMBL D84424.1, US 20030235893), hsHAS2 (EMBL U54804.1, US 20030235893), hsHAS3 (EMBL AF232772.1, US 15 20030235893); camundongo (*Mus musculus*), mmHas1 (EMBL D82964.1, US 20030235893), mmHAS2 (EMBL U52524.2, US 20030235893), mmHas3 (EMBL U86408.2, US 20030235893); bovino (*Bos taurus*) btHas2 (EMBL AJ004951.1, US 20030235893); galinha (*Gallus gallus*) ggHas2 (EMBL AF106940.1, US 20030235893); rato (*Rattus norvegicus*) rnHas 1 (EMBL 20 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), cavalo (*Equus caballus*) ecHAS2 (EMBL AY056582.1, GI:23428486), porco (*Sus scrofa*) sscHAS2 (NCBI NM_214053.1, GI:47522921), sscHas 3 (EMBLAB159675), peixe-zebra (*Danio rerio*) brHas1 (EMBL AY437407), brHas2 (EMBL AF190742.1) brHas3 (EMBL AF190743.1); *Pasteurella multocida* pmHas (EMBL AF036004.2); *Streptococcus pyogenes* spHas (EMBL, L20853.1, L21187.1, US 6,455,304, US 20030235893); *Streptococcus equis* seHas (EMBL AY347022.1, AY173078.1), *Streptococcus uberis* suHasA (EMBL AJ242946.2, US 30 20030235893), *Streptococcus equisimilis* seqHas (EMBL AF023876.1, US 20030235893); *Sulfolobus solfataricus* ssHAS (US 20030235893), *Sulfolobus tokodaii* stHas (AP000988.1), *Paramecium bursaria Chlorella Virus 1*,

cvHAS (EMBL U42580.3, PB42580, US 20030235893).

Pelo termo "UDP-glicose desidrogenase (UDP-Glc-DH)" (E.C. 1.1.1.22) no contexto da presente invenção, deve ser entendida uma proteína, que sintetiza [UDP glicose (UDP-GLc), NAD⁺ de ácido UDP glicurônico 5 (UDP-GLcA) e NADH]. Essa catálise segue, com isso, o seguinte esquema de reação:



O termo "atividade aumentada de uma proteína com a atividade (enzimática) de uma UDP-Glc-DH" no âmbito da presente invenção, significa 10 um aumento da expressão de genes endógenos, que codificam proteínas com a atividade de uma UDP-Glc-DH e/ou um aumento da quantidade de transcritos que codificam proteínas com a atividade de uma UDP-Glc-DH nas células e/ou um aumento da atividade enzimática de proteínas com a atividade de uma UDP-Glc-DH nas células.

Um aumento da expressão pode ser determinado, por exemplo, 15 pela medição da quantidade de transcritos, que codificam uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, por exemplo, através da análise de Northern-Blot ou RT-PCR. Nesse caso, um aumento significa preferentemente um aumento da quantidade de transcritos em comparação com células de 20 plantas de tipo silvestre correspondentes não geneticamente modificadas ou plantas de tipo silvestre não geneticamente modificadas em pelo menos 50%, especialmente em pelo menos 70%, preferentemente em pelo menos 85% e de modo particularmente preferido, em pelo menos 100%. Um aumento da quantidade de transcritos, que codificam uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH significa também, que plantas ou células de plantas, que não apresentam quantidades comprováveis de transcritos, que codificam uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, após modificação 25 genética de acordo com a invenção, apresentam quantidades comprováveis de transcritos, que codificam uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH.

O aumento da quantidade de proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, que tem como consequência uma atividade aumentada des-

sas proteínas nas respectivas células de plantas, pode ser determinado, por exemplo, através de métodos imunológicos, tais como análise de Western-Blot, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ou RIA (Radio Immune Assay). Métodos para a produção de anticorpos, que reagem especificamente com uma determinada proteína, isto é, que se ligam especificamente à dita proteína, são conhecidos pelo técnico (vide, por exemplo: Lottspeich und Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). A produção desses anticorpos é oferecida por algumas firmas (por exemplo, Eurogentec, Bélgica) como serviço de encomenda.

5 Nesse caso, um aumento da quantidade de proteína significa preferentemente um aumento da quantidade de proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH em comparação com células de plantas de tipo silvestre correspondentes não geneticamente modificadas ou de plantas de tipo silvestre não geneticamente modificadas em pelo menos 50%, especialmente em pelo

10 menos 70%, preferentemente em pelo menos 85% e de modo particularmente preferido, em pelo menos 100%. Um aumento da quantidade de proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH significa também, que plantas ou células de plantas, que não apresentam uma quantidade comprovável de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, após modificação genética

15 de acordo com a invenção, apresentam uma quantidade comprovável de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH.

20 25

O aumento da atividade de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH em extratos vegetais pode ser descrito por métodos conhecidos pelo técnico, tal como, por exemplo, descrito na WO 00 11192. Um método preferido para a determinação da quantidade de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH é citado em métodos gerais, ponto 5.

Um aumento da quantidade de atividade (enzimática) de proteínas com a atividade de uma UDP-Glc-DH, significa preferentemente um aumento da atividade dessas proteínas em pelo menos 50%, preferentemente em pelo menos 70%, de modo especialmente preferido em pelo menos 85% e de modo particularmente preferido, em pelo menos 100%, em comparação com células de plantas de tipo silvestre correspondentes não geneticamente

30

modificadas ou plantas não geneticamente modificadas. Um aumento da quantidade de atividade (enzimática) de proteínas com a atividade de uma UDP-Glc-DH, significa também, que plantas ou células de plantas, que não apresentam uma quantidade comprovável de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, após modificação genética de acordo com a invenção, apresentam uma quantidade comprovável de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH.

Pelo termo "genoma" no contexto da presente invenção, deve ser entendida a totalidade do material hereditário presente em uma célula vegetal. O técnico sabe, que além do núcleo da célula, também outros compartimentos (por exemplo, plastídeos, mitocôndrias) contêm material hereditário.

Pelo termo "molécula de ácido nucleico integrada de maneira estável" no contexto da presente invenção, deve ser entendida a integração de uma molécula de ácido nucleico no genoma da planta. Uma molécula de ácido nucleico integrada de maneira estável destaca-se pelo fato de ser multiplicada na replicação do ponto de integração correspondente junto com as sequências de ácido nucleico próprias do hospedeiro, que ladeiam o ponto de integração, de maneira que o ponto de integração no segmento de DNA filho replicado é envolvido pelas mesmas sequências de ácido nucleico, como no segmento mãe onde foi feita uma leitura, que serve como matriz para a replicação.

Para a integração estável de moléculas de ácido nucleico em uma célula hospedeira vegetal, há um sem-número de técnicas à disposição. Essas técnicas abrangem a transformação de células vegetais com T-DNA com a utilização de *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes* como meio de transformação, a fusão de protoplastos, a injeção, a eletroporação de DNA, a introdução do DNA por meio da preparação biolística, bem como outras possibilidades (sinopse em "Transgenic Plants", Leandro ed., Humana Press 2004, ISBN 1-59259-827-7). A utilização da transformação de células vegetais intermediada por agrobactérias foi intensamente pesquisada e suficientemente descrita na EP 120516; Hoekema, IN: The

Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V. Alblasserdam (1985), capítulo V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 e por An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287. Para a transformação de batata, vide, por exemplo, Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33, para a transformação de plantas de tomate, por exemplo, a US 5.565.347.

Foi descrita também a transformação de plantas monocotiledôneas por meio de vetores à base de *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, 10 (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al., Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Um sistema alternativo para a transformação de plantas monocotiledôneas é a transformação por meio da preparação biolística (Wan e Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 15 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), a transformação de protoplastos, a eletroporação de células parcialmente permeabilizadas, a introdução de DNA por meio de fibras de vidro. Especialmente, a transformação de milho é várias vezes descrita na literatura (compare, por exemplo, 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. A transformação de outras gramas, tal como, por exemplo, o milho perene (switchgrass, *Panicum virgatum*) também é descrito (Richards et al., 2001, Plant Cell Reporters 20, 48-54).

Já foi descrita, também, a transformação eficiente de outras espécies de cereais, por exemplo, para cereais (Wan e Lemaux, vide acima; Ritala et al., vide acima; Krens et al., Nature 296, (1982), 72-74 e para trigo (Nehra et al., Plant J 5, (1994), 285-297; Becker et al., 1994, Plant Journal 5, 30 299-307). Todos os métodos acima são apropriados no âmbito da presente invenção.

Células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a

invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, oferecem, em relação ao estado da técnica, a vantagem, de que elas produzem maiores quantidades de hialuronano do que plantas, que apresentam apenas a atividade de uma hialuronano sintase. Isso possibilita a produção de hialuronano com baixos custos, pois o isolamento de hialuronano a partir de plantas com teor de hialuronano mais elevado é menos dispendioso e de custos mais favoráveis. Além disso, são necessárias menores áreas de cultivo, para produzir hialuronano com plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção em comparação com plantas descritas no estado da técnica. Isso leva à possibilidade, de pôr hialuronano à disposição em quantidade suficiente também para aplicações técnicas, nas quais, devido a pouca disponibilidade e ao alto preço, não são utilizadas atualmente. Organismos vegetais do gênero *Chlorella*, que estão infectados com um vírus, não são apropriados para a produção de maiores quantidades de hialuronano.

Para a produção de hialuronano, as algas infectadas com vírus apresentam a desvantagem de não terem integrado os genes, que são necessários para a hialuronano sintase de maneira estável em seu genoma (Van Etten e Meints, 1999, Annu. Rev. Microbiol. 53, 447-494), de maneira que para a produção de hialuronano é preciso efetuar sempre de novo uma nova infecção por vírus. Por isso, não é possível, isolar células de *Chlorella* individuais, que sintetizam continuamente a qualidade e quantidade desejada de hialuronano. Além disso, a produção de hialuronano em algas de *Chlorella* infectadas com vírus realiza-se apenas por um tempo limitado e as algas são mortas através da lise provocada pelo vírus já cerca de 8 horas após a infecção (Van Etten et al., 2002, Arch Virol 147, 1479-1516). Por outro lado, a presente invenção oferece a vantagem de que células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção e plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção podem ser multiplicadas vegetativa ou sexualmente de maneira ilimitada e que elas produzem continuamente hialuronano.

As plantas transgênicas descritas na WO 05 012529, que apresentam uma molécula de ácido nucleico que codifica uma hialuronano sintase, sintetizam uma quantidade relativamente pequena de hialuronano. Por

outro lado, a presente invenção oferece a vantagem, de que células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção e plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, sintetizam quantidades nitidamente maiores de hialuronano.

5 Por conseguinte, o objetivo da presente invenção são também células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, que sintetizam hialuronano.

Visto que foi observado que o hialuronano se acumula durante o
10 tempo de desenvolvimento no tecido vegetal, a quantidade de hialuronano em relação ao peso fresco ou em relação ao peso seco em células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou em plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, deve ser determinada de modo particularmente preferido no momento da colheita ou em menos
15 dias (um a dois) antes da colheita das respectivas células de plantas ou das respectivas plantas. De modo especial, nesse caso, utiliza-se aquele material de plantas (por exemplo, tubérculos, sementes, folhas) em relação à quantidade de hialuronano, que deve ser cultivado para o processamento ulterior.

20 Células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, que sintetizam hialuronano, podem ser comprovadas pelo fato de se isolar o hialuronano sintetizado por elas e se comprovar sua estrutura.

Visto que o tecido vegetal apresenta a vantagem de não conter
25 hialuronidases, pode ser utilizado um método de isolamento simples e rápido para comprovar a presença de hialuronano em células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção. Para isso, acrescenta-se água ao tecido da planta a ser examinado, antes do tecido da planta ser mecanicamente triturado (por exemplo, com o auxílio de um moinho de bolas, moinho de percussão, um Waring Blender, um extrator de suco e outros). Em seguida, conforme a necessidade, pode acrescentar-se mais água à suspen-

são, antes que pedaços de células e componentes insolúveis em água sejam separados através de centrifugação ou peneiração. A detecção da presença de hialuronano pode ser efetuada, em seguida, no sobrenadante obtido após a centrifugação, por exemplo, por meio de uma proteína que se liga de maneira específica ao hialuronano. Um processo para a detecção de hialuronano com auxílio de uma proteína que se liga de maneira específica ao hialuronano é descrito, por exemplo, na US 5.019.498. Kits de testes, para a execução do método descrito na US 5.019.498, podem ser adquiridos no comércio (por exemplo, o kit de teste de ácido hialurônico (HA) da firma Cor-
5 genix, Inc., Colorado, EUA, Prod. nº 029-001; vide também os métodos ge-
10 rais ponto 4). Paralelamente a isso, uma alíquota do sobrenadante obtido da centrifugação pode ser inicialmente digerido com uma hialuronidase, antes de efetuar a detecção da presença de hialuronano com auxílio da proteína que se liga de maneira específica ao hialuronano, tal como descrito acima.
15 Pela ação da hialuronidase na preparação paralela, o hialuronano presente na mesma é degradado, de maneira que após a completa digestão, não são mais comprováveis quantidades significativas de hialuronano.

Além disso, a detecção da presença de hialuronano no sobrena-
dante da centrifugação também pode ser efetuada com outros métodos de
20 análise, tais como, por exemplo, da espectroscopia de IV, RMN ou massa.

Tal como já foi exposto, atualmente não está claro, qual proce-
ss0 de metabolismo (processo de metabolismo de fosfato de hexose ou de
mio-inositol oxidativo) é utilizado em células vegetais, principalmente para a
síntese do ácido UDP-glucurônico e se os dois processos de metabolismo
25 prestam uma contribuição quantitativa distinta de acordo com o tecido e/ou
estágio de desenvolvimento da planta em relação à síntese do ácido UDP-
glucurônico. Além disso, a superexpressão de uma UDP-Glc-DH em plantas
transgênicas não levou a resultados consistentes e o objetivo de aumentar o
teor de pectina na parede celular por meio de uma tal preparação não pôde
30 ser atingido. Adicionalmente, a regulação da atividade de proteínas com a
atividade de uma UDP-Glc-DH está sujeita a uma inibição através da UDP-
xilose. Essa foi demonstrada tanto para as respectivas proteínas, que são

procedentes de procariontes (Campbell et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(6), 3416-3422; Schiller et al., 1973, Biochim. Biophys Acta 293(1), 1-10), de organismos animais (Balduini et al., 1970, Biochem. J. 120(4), 719-724) e de plantas (Hinterberg, 2002, Plant Physiol. Biochem. 40, 1011-1017).

5 A literatura não contém nenhuma referência a respeito de que modo a quantidade de hialuronano sintetizado em células de plantas poderia ser limitada.

Por conseguinte, verificou-se surpreendentemente, que células de plantas geneticamente modificadas ou plantas geneticamente modificadas, que apresentam uma molécula de ácido nucleico, que codifica uma hialuronano sintase e que, adicionalmente, apresentam uma atividade aumentada de uma UDP-Glc-DH em comparação com células de plantas geneticamente modificadas ou plantas geneticamente modificadas, que apresentam (apenas) a atividade de uma hialuronano sintase, produzem quantidades 10 significativamente maiores de hialuronano.

15

Em uma forma de concretização preferida, a presente invenção refere-se a células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou a plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, caracterizadas pelo fato de que elas produzem uma quantidade aumentada de hialuronano em comparação com células de plantas geneticamente modificadas ou em comparação com plantas geneticamente modificadas, que apresentam (apenas) a atividade de uma hialuronano sintase ou em comparação com plantas geneticamente modificadas, que apresentam a atividade de uma hialuronano sintase e nenhuma atividade aumentada de 20 uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH.

25

Pelo termo "célula de planta ou planta, que apresenta (apenas) a atividade de uma hialuronano sintase" no contexto da presente invenção, deve ser entendida uma célula de planta geneticamente modificada ou uma planta geneticamente modificada, na qual a modificação genética consiste 30 em que ela apresenta uma molécula de ácido nucleico, que codifica uma hialuronano sintase em comparação com células de plantas de tipo silvestre correspondentes não geneticamente modificadas ou plantas de tipo silvestre

não geneticamente modificadas.

As "células de plantas ou plantas, que apresentam (apenas) a atividade de uma hialuronano sintase" destacam-se especialmente pelo fato de sintetizarem hialuronano e não apresentarem modificações genéticas adicionais, que ultrapassam a introdução de uma molécula de ácido nucleico, que codifica uma hialuronano sintase, em células de plantas de tipo silvestre não geneticamente modificadas ou em plantas de tipo silvestre não geneticamente modificadas. Preferivelmente, tais plantas não apresentam uma atividade aumentada de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH.

A quantidade de hialuronano, que é produzido por células de plantas ou plantas, pode ser determinada com auxílio dos métodos já descritos acima, por exemplo, com o emprego de um kit de teste que pode ser adquirido no comércio (por exemplo, o kit de teste de ácido hialurônico (HA) da firma Corgenix, Inc., Colorado, EUA, Prod. nº 029-001). Um método preferido no contexto da presente invenção para a determinação do teor de hialuronano em células de plantas ou plantas é descrito sob métodos gerais, ponto 4.

Em uma outra forma de concretização da presente invenção, trata-se no caso das células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, de células de plantas de uma planta terrestre verde ou de plantas terrestres verdes, que sintetizam hialuronano.

O termo "planta terrestre verde (embriofita)" no contexto da presente invenção deve ser entendido de maneira tal como é definido em S-
trasburger, „Lehrbuch der Botanik”, 34. Aufl., Spektrum Akad. Verl., 1999,
(ISBN 3-8274-0779-6).

Uma forma de concretização preferida da presente invenção refere-se às células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção de plantas multicelulares ou de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, que representam organismos multicelulares. No caso dessa forma de concretização trata-se, portanto, de células de plantas ou de plantas, que não são procedentes de plantas monocelulares (protistas)

ou não são protistas.

No caso das células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, pode tratar-se, em princípio, de células de plantas ou de plantas de qualquer espécie de planta desejada, isto é, tanto de plantas monocotiledôneas, como também de dicotiledôneas. De maneira preferida, trata-se de plantas úteis, isto é, de plantas, que são cultivadas pelo homem para fins de alimentar seres humanos e animais ou para a produção de biomassa ou para a produção de substâncias para fins técnicos, industriais (por exemplo, milho, arroz, trigo, centeio, aveia, cevada, mandioca, batata, tomate, milho perene (*Panicum virgatum*), sagu, feijão da China, ervilha, sorgo, cenoura, berinjela, rabano, colza, alfafa, soja, amendoim, pepino, abóbora, melão, alho-porão, alho, couve, espinafre, batata doce, aspargo, abobrinha, salada, alcachofra, milho doce, pastinaca, scorzonera, tupinambo, banana, beterraba doce, cana-de-açucar, beterraba, brócoli, couve, cebola, cenoura amarela, dente-de-leite, morango, maçã, damasco, ameixa, pêssego, uvas, couve-flor, aipo, pimentão, nabo, ruibarbo). De modo particularmente preferido, trata-se de plantas de tomate ou batata.

Em uma forma de concretização preferida, a presente invenção refere-se a células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou a plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, em que a molécula de ácido nucleico que codifica a hialuronano sintase é caracterizada pelo fato de codificar uma hialuronano sintase viral. Preferentemente, a molécula de ácido nucleico que codifica a hialuronano sintase codifica uma hialuronano sintase de um vírus, que infecta algas. Com relação a um vírus, que infecta algas, a molécula de ácido nucleico que codifica a hialuronano sintase codifica preferencialmente uma hialuronano sintase de um vírus que infecta *Chlorella*, de modo particularmente preferido uma hialuronano sintase de um *Paramecium bursaria Chlorella Virus 1* e de modo especialmente preferido, uma hialuronano sintase de um *Paramecium bursaria Chlorella Virus* de uma cepa H1.

Em uma outra forma de concretização preferida, a presente in-

venção refere-se a células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou a plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, em que a molécula de ácido nucleico que codifica a hialuronano sintase é caracterizada pelo fato de que os códons da molécula de ácido nucleico que codifica uma hialuronano sintase são modificados, em comparação com os códons da molécula de ácido nucleico, que codifica a hialuronano sintase do organismo original da hialuronano sintase. De modo particularmente preferido, os códons da hialuronano sintase são modificados de maneira tal, que eles são ajustados à frequência da utilização dos códons da célula de planta ou da planta, em cujo genoma eles são ou serão integrados.

Aminoácidos podem ser codificados, com base na degeneração do código genético, por um ou mais códons. Diferentes organismos utilizam os códons que codificam um aminoácido com diferente frequência. O ajuste dos códons a uma sequência de ácido nucleico codificadora à frequência de sua utilização na célula de planta ou na planta, em cujo genoma a sequência a ser expressa deve ser integrada, pode contribuir para uma quantidade aumentada de proteína transladada e/ou para a estabilidade do respectivo mRNA nas respectivas células de plantas ou plantas. O técnico pode determinar a frequência da utilização de códons nas respectivas células de plantas ou nas plantas, em que ele pesquisa tantas sequências de ácido nucleico codificadoras quanto possível do respectivo organismo de maneira tal como códons frequentemente determinados são utilizados para a codificação de um determinado aminoácido. A frequência da utilização de códons de determinados organismos é comum para o técnico pode ser efetuada de maneira simples e rápida com auxílio de programas de computador. Programas de computador correspondentes são publicamente acessíveis e entre outros, são livremente disponibilizados na internet (por exemplo,

<http://gcua.schoedl.de/>; <http://www.kazusa.or.jp/codon/>; <http://www.entelechon.com/eng/cutanalysis.html>).

O ajuste dos códons a uma sequência de ácido nucleico codificadora à frequência de sua utilização na célula de planta ou na planta, em cujo genoma deve ser integrada a sequência a ser expressa, pode ser efetuada por mutagênese *in vitro* ou preferentemente por nova síntese da sequência genética-

ca. Métodos para a nova síntese de sequências de ácido nucleico são conhecidos pelo técnico. Uma nova síntese pode ser efetuada, por exemplo, pelo fato de que inicialmente oligonucleotídeos de ácido nucleico individuais são sintetizados, esses são hibridizados com oligonucleotídeos complementares a esses, de maneira que eles formem um segmento duplo de DNA, antes que os oligonucleotídeos de segmentos duplos individuais sejam ligados uns com os outros de maneira tal que se obtém a sequência de ácido nucleico desejada. A nova síntese de sequências de ácido nucleico inclusive o ajuste da frequência de utilização dos códons a um determinado organismo alvo, também pode ser cedida como encomenda a empresas, que oferecem essa como prestação de serviço (por exemplo, Entelechon GmbH, Regensburg, Alemanha).

Preferentemente, a molécula de ácido nucleico que codifica hialuronano sintase é caracterizada pelo fato de codificar uma hialuronano sintase, cuja sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos representada sob SEQ ID nº 2 apresenta uma identidade de pelo menos 70%, preferentemente de pelo menos 80%, preferentemente de pelo menos 90% e de modo especialmente preferido, de pelo menos 95%. Em uma forma de concretização particularmente preferida, a molécula de ácido nucleico que codifica a hialuronano sintase é caracterizada pelo fato de codificar uma hialuronano sintase, que apresenta a sequência de aminoácidos representada sob SEQ ID nº 2.

Em uma outra forma de concretização, a molécula de ácido nucleico, que codifica uma hialuronano sintase com a sequência de ácido nucleico representada sob SEQ ID nº 1 ou SEQ ID nº 3, apresenta uma identidade de pelo menos 70%, preferentemente de pelo menos 80%, preferentemente de pelo menos 90% e de modo especialmente preferido de pelo menos 95%. Em uma forma de concretização particularmente preferida, a sequência de ácido nucleico que codifica a hialuronano sintase é caracterizada pelo fato de apresentar a sequência de ácido nucleico representada sob SEQ ID nº 3.

O plasmídeo IC 341-222, contendo uma molécula de ácido nu-

cleico sintética, que codifica uma hialuronano sintase do vírus *Paramecium bursaria Chlorella*, foi apresentado no dia 25 de agosto de 2004 sob o número DSM 16664 de acordo com o Contrato de Budapest na Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 5 38124 Braunschweig, Alemanha. A sequência de aminoácidos representada na SEQ ID nº 2 pode ser derivada na região codificadora da sequência de ácido nucleico integrada no plasmídeo IC 341-222 e codifica uma hialuronano sintase do vírus *Paramecium bursaria Chlorella*.

Por conseguinte, a presente invenção refere-se também a células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou a plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, em que a molécula de ácido nucleico que codifica a hialuronano sintase é caracterizada pelo fato de codificar uma proteína, cuja sequência de aminoácidos pode ser derivada da região codificadora da sequência de ácido nucleico inserida 10 no plasmídeo DSM 16664 ou que ela codifica uma proteína, cuja sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos, que pode ser derivada da região codificadora da sequência de ácido nucleico inserida no plasmídeo 15 DSM 16664, apresenta uma identidade de pelo menos 70%, preferentemente de pelo menos 80%, preferentemente de pelo menos 90% e de modo especialmente preferido de pelo menos 95%. 20

A presente invenção refere-se também a células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou a plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, em que a molécula de ácido nucleico que codifica a hialuronano sintase é caracterizada pelo fato de 25 apresentar a sequência de ácido nucleico que codifica a hialuronano sintase, integrada no plasmídeo DSM 16664 ou de apresentar com a sequência de ácido nucleico integrada no plasmídeo DSM 16664, uma identidade de pelo menos 70%, preferentemente de pelo menos 80%, preferentemente de pelo menos 90% e de modo especialmente preferido de pelo menos 95%.

30 Um outro objetivo da presente invenção refere-se a células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou a plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, caracterizadas pelo

fato de apresentarem uma molécula de ácido nucleico estranha integrada de maneira estável em seu genoma, em que a dita molécula de ácido nucleico estranha leva ao aumento da atividade de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, em comparação com células de plantas de tipo silvestre correspondentes não geneticamente modificadas ou com plantas de tipo silvestre correspondentes não geneticamente modificadas.

Pelo termo "molécula de ácido nucleico estranha" no contexto da presente invenção, entende-se uma tal molécula, que ou não ocorre naturalmente nas células de plantas de tipo silvestre correspondentes, ou que na disposição espacial concreta não ocorre naturalmente em células de plantas de tipo silvestre ou que está localizada em um ponto no genoma da célula de planta de tipo silvestre, no qual ela não ocorre naturalmente. De modo preferido, a molécula de ácido nucleico estranha é uma molécula recombinante, que se constitui de diversos elementos, cuja combinação ou disposição espacial específica não ocorre naturalmente em células vegetais.

Pelo temo "molécula de ácido nucleico recombinante" no contexto da presente invenção, deve ser entendida uma molécula de ácido nucleico, que apresenta diferentes moléculas de ácido nucleico, que não estão naturalmente presentes em uma combinação, tal como estão presentes em uma molécula de ácido nucleico recombinante. Dessa maneira, as moléculas de ácido nucleico recombinantes, por exemplo, além de moléculas de ácido nucleico, que codificam uma hialuronano sintase e/ou uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, podem apresentar sequências de ácido nucleico adicionais, que não estão naturalmente presentes em combinação com as moléculas de ácido nucleico mencionadas. As sequências de ácido nucleico adicionais mencionadas, que estão presentes em uma molécula de ácido nucleico recombinante em combinação com uma hialuronano sintase ou com uma proteína com a atividade de uma molécula de ácido nucleico que codifica UDP-Glc-DH, nesse caso, sequências desejadas. Elas podem representar, por exemplo, sequências de ácido nucleico genômicas e/ou vegetais. No caso das sequências de ácido nucleico adicionais, trata-se preferentemente de sequências reguladoras (promotores, sinais de terminação,

aumentadores), de modo particularmente preferido, de sequências reguladoras, que são ativas no tecido vegetal, de modo especialmente preferido, de sequências reguladoras específicas de tecidos que são ativas no tecido vegetal. Métodos para a produção de moléculas de ácido nucleico recombinantes são conhecidos pelo técnico e abrangem métodos genéticos, tais como, por exemplo, a ligação de moléculas de ácido nucleico através de ligação, recombinação genética ou a nova síntese de moléculas de ácido nucleico (vide por exemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3^a edição (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5th edition (2002),ISBN: 0471250929).

Células de plantas geneticamente modificadas e plantas geneticamente modificadas, que apresentam uma molécula de ácido nucleico estranha integrada de maneira estável em seu genoma ou várias moléculas de ácido nucleico estranhas integradas de maneira estável em seu genoma, que codificam uma hialuronano sintase e que leva/levam ao aumento da atividade de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, em comparação com células de plantas de tipo silvestre correspondentes não geneticamente modificadas ou plantas de tipo silvestre não geneticamente modificadas, podem ser diferenciadas das células de plantas de tipo silvestre mencionadas ou das plantas de tipo silvestre mencionadas, entre outros, pelo fato de conterem uma molécula de ácido nucleico estranha, que não ocorre naturalmente nas células de plantas de tipo silvestre ou nas plantas de tipo silvestre ou pelo fato de que uma tal molécula se apresenta integrada em um ponto no genoma da célula da planta geneticamente modificada de acordo com a invenção ou no genoma da planta geneticamente modificada de acordo com a invenção, no qual não ocorre nas células de plantas de tipo silvestre ou nas plantas de tipo silvestre, isto é, em um outro meio genômico. Além disso, tais células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção e plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, podem ser diferenciadas das células de plantas de tipo silvestre não geneticamente modificadas ou das plantas de tipo silvestre não geneticamente

modificadas pelo fato de conterem pelo menos uma cópia da molécula de ácido nucleico estranha integrada de maneira estável em seu genoma, eventualmente, adicionalmente, às cópias de uma tal molécula que ocorrem naturalmente nas células de plantas de tipo silvestre ou plantas de tipo silvestre.

- 5 Se no caso da(s) molécula(s) de ácido nucleico estranha introduzida nas células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou a plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, tratar-se de cópias adicionais para moléculas que já ocorrem naturalmente nas células de plantas de tipo silvestre ou de plantas de tipo silvestre, então as células
10 de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção e as plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, podem diferenciar-se de células de plantas de tipo silvestre ou de plantas de tipo silvestre especialmente pelo fato de que a(s) cópia(s) adicional(acionais) está(estão) localizada(s) em pontos no genoma, nos quais não ocorre(m) nas
15 células de plantas de tipo silvestre ou de plantas de tipo silvestre.

A integração estável de uma molécula de ácido nucleico no genoma de uma célula de planta ou de uma planta pode ser comprovada através de métodos genéticos e/ou de biologia molecular. Uma integração estável de uma molécula de ácido nucleico no genoma de uma célula de planta
20 ou no genoma de uma planta destaca-se pelo fato de que a molécula de ácido nucleico integrada de modo estável na descendência, que herdaria a molécula de ácido nucleico mencionada, está presente no mesmo meio genômico como na geração dos pais.

A presença de uma integração estável de uma sequência de
25 ácido nucleico no genoma de uma célula de planta no genoma de uma planta pode ser comprovada através de métodos conhecidos pelo técnico, entre outros, com auxílio da análise de Southern-Blot da análise RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Nam et al., 1989, The Plant Cell 1, 699-705; Leister and Dean, 1993, The Plant Journal 4 (4), 745-750), através de
30 métodos à base de PCR, tais como, por exemplo, a análise do fragmento amplificado de diferenças de comprimento (Amplified Fragment Length Polymorphism, 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) ou através da utilização de fragmentos amplificados cortados com endonucleases de restrição (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, CAPS) (Konieczny e 5 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).

Em princípio, uma molécula de ácido nucleico estranha pode ser qualquer molécula de ácido nucleico desejada, que provoca um aumento da 10 atividade de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH na célula da planta ou na planta.

No contexto da presente invenção, células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção e plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, também podem ser produzidas através 15 da utilização da chamada mutagênese de inserção (artigo sinóptico: Thorneycroft et al., 2001, Journal of experimental Botany 52 (361), 1593-1601). Por mutagênese de inserção no contexto com a presente invenção, entende-se especialmente a inserção de transposons ou o chamado transfer DNA de transferência (T-DNA) para um gene ou para a proximidade de um gene, que 20 codifica uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, sendo que com isso, a atividade de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH na respectiva célula aumenta.

No caso dos transposons pode tratar-se tanto daqueles, que ocorrem naturalmente na célula (transposons endógenos), como também daqueles que não ocorrem naturalmente na célula mencionada, mas sim, foram introduzidos na célula por meio de métodos genéticos, tais como, por exemplo, transformação da célula (transposons heterólogos). A modificação da expressão de genes por meio de transponson é conhecida pelo técnico. Uma sinopse sobre a utilização de transposons endógenos e heterólogos 25 como ferramenta na biotecnologia de plantas é apresentada em Ramachandran e Sundaresan (2001, Plant Physiology and Biochemistry 39, 234-252).

A mutagênese de inserção de T-DNA baseia-se no fato de que

determinados segmentos (T-DNA) de plasmídeos Ti de *Agrobacterium* podem ser integrados no genoma de células vegetais. Nesse caso, o local da integração no cromossoma vegetal não é determinado, mas sim pode ser efetuado em qualquer local desejado. Caso o T-DNA entegre-se em um segmento ou na proximidade de um segmento do cromossomo que representa uma função de gene, então esse pode levar ao aumento da expressão do gene e com isso, também à modificação da atividade de uma proteína que codifica o respectivo gene.

As sequências inseridas no genoma (especialmente transposons ou T-DNA) destacam-se, nesse caso, pelo fato de conterem sequências, que levam a uma ativação das sequências reguladoras de um gene, que codifica uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH ativação marcada. Preferentemente, as sequências inseridas no genoma (especialmente transposons ou T-DNA) destacam-se pelo fato de serem integradas na proximidade de moléculas de ácido nucleico endógenas no genoma da célula de planta ou da planta, que codificam uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH.

Células de plantas geneticamente modificadas e plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção podem ser produzidas, por exemplo, com auxílio do método do chamado "ativação marcada" (vide, por exemplo, Walden et al., Plant J. (1991), 281-288; Walden et al., Plant Mol. Biol. 26 (1994), 1521-1528). Este método baseia-se na ativação de promotores endógenos através de sequências "aumentadoras", tais como, por exemplo, do aumentador do promotor RNA 35S do vírus mosaico da couve-flor ou do aumentador da octopina sintase.

Pelo termo ativação marcada por T-DNA no contexto da presente invenção, deve ser entendido um fragmento de T-DNA, que contém sequências acentuadoras e através de integração no genoma de uma célula de planta leva ao aumento da atividade de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH.

Pelo termo ativação marcada por transposons no contexto da presente invenção, deve ser entendido um transponson, que contém sequê-

cias acentuadoras e através de integração no genoma de uma célula de planta leva ao aumento da atividade de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH.

Uma forma de concretização particularmente preferida da presente invenção refere-se a células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou a plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, caracterizadas pelo fato de que uma molécula de ácido nucleico estranha codifica uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH.

De acordo com a invenção, a molécula de ácido nucleico estranha que codifica uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH pode ser proveniente de um organismo desejado, a molécula de ácido nucleico mencionada é preferentemente proveniente de bactérias, fungos, animais, plantas ou vírus, de modo particularmente preferido, de bactérias, plantas ou vírus, de modo especialmente preferido, de vírus.

Em relação aos vírus, a molécula de ácido nucleico estranha que codifica uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH pode ser preferentemente proveniente de um vírus, que infecta algas, preferentemente de um vírus, que infecta algas do gênero *Chlorella*, de modo particularmente preferido de um vírus *Paramecium bursaria Chlorella* e de modo especialmente preferido de um vírus *Paramecium bursaria Chlorella* de uma cepa H1.

Ao invés de uma molécula de ácido nucleico de origem natural, que codifica uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH, uma molécula de ácido nucleico produzida por meio de mutagênese também pode ser introduzida em células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou a plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, em que a molécula de ácido nucleico estranha que sofreu uma mutagênese mencionada destaca-se pelo fato de codificar uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH, que apresenta uma inibição reduzida através dos metabólitos do metabolismo (por exemplo, o metabolismo do ácido glucurônico).

Moléculas de ácido nucleico, que codificam uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, são descritas na literatura e conhecidas pelo técnico. Dessa maneira, as moléculas de ácido nucleico, que codificam uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, são descritas de vírus, por exemplo, para o vírus *Chlorella* 1 (NCBI acc No NC_000852.3), de bactérias, por exemplo, para *Escherichia coli* (EMBL acc No: AF176356.1), de fungos, por exemplo, para *Aspergillus niger* (EMBL acc No AY594332.1), *Cryptococcus neoformans* (EMBL acc AF405548.1), de insetos, por exemplo, para *Drosophila melanogaster* (EMBL acc No AF001310.1), de vertebrados, por exemplo, para *Homo sapiens* (EMBL acc No AF061016.1), *Mus musculus* (EMBL acc No AF061017.1), *Bos taurus* (EMBL acc No AF095792.1), *Xenopus laevis* (EMBL acc No AY762616.1) ou de plantas, por exemplo, para *Pappel* (EMBL acc No AF053973.1), *Colocasia esculenta* (EMBL acc No AY222335.1), *Dunaliella salina* (EMBL acc No AY795899.1), *Glycine max* (EMBL acc No U53418.1).

Em uma forma de concretização preferida, a presente invenção refere-se a células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou a plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, em que a molécula de ácido nucleico estranha, que codifica uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, é selecionada do grupo constando em:

- a) moléculas de ácido nucleico, que codificam uma proteína com a sequência de aminoácidos indicada sob SEQ ID nº 5.
- b) moléculas de ácido nucleico, que codificam uma proteína, cuja sequência apresenta uma identidade de pelo menos 60% em relação à sequência de aminoácidos indicada sob SEQ ID nº 5;
- c) moléculas de ácido nucleico, que abrangem a sequência de ácido nucleico representada sob SEQ ID nº 4 ou a sequência de ácido nucleico representada sob SEQ ID nº 6 ou uma sequência complementar,
- d) moléculas de ácido nucleico, que em relação às sequências de ácido nucleico descritas em a) ou c), apresentam uma identidade de pelo menos 70%;

e) moléculas de ácido nucleico, que hibridizam com pelo menos um segmento das moléculas de ácido nucleico descritas em a) ou c), sob condições estringentes;

5 f) moléculas de ácido nucleico, cuja sequência de nucleotídeos, com base na degeneração do código genético, desvia da sequência das moléculas de ácido nucleico mencionadas em a) ou c); e

g) moléculas de ácido nucleico, que representam fragmentos, variantes alélicas e/ou derivados das moléculas de ácido nucleico mencionadas em a), b), c), d), e) ou f).

10 O termo "hibridização" no âmbito da presente invenção, significa uma hibridização com condições de hibridização convencionais, preferentemente com condições estringentes, tais como são descritas, por exemplo, em Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). De modo 15 particularmente preferido, "hibridização" significa uma hibridização com as seguintes condições:

Tampão de Hibridização:

20 2xSSC; solução 10xDenhardt (Fikoll 400+PEG+BSA; proporção 1:1:1); 0,1% de SDS, EDTA a 5 mM, Na₂HPO₄ a 50 mM; 250 µg/ml de es- perma de arenque DNA; 50 µg/ml de tRNA; ou tampão de fosfato de sódio a 25 M pH 7,2; EDTA a 1 mM; 7% de SDS

Temperatura de Hibridização:

T=65 até 68°C

Tampão de Lavagem: 0,1xSSC; 0,1% de SDS

25 Temperatura de Lavagem: T=65 até 68°C.

Moléculas de ácido nucleico, que hibridizam com moléculas de ácido nucleico, que codificam uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, podem ser provenientes de um organismo desejado, por conseguinte, elas podem ser provenientes de bactérias, fungos, animais, plantas ou 30 elas podem ser provenientes de vírus.

Moléculas de ácido nucleico, que hibridizam com moléculas de ácido nucleico, que codificam uma proteína com a atividade de uma UDP-

Glc-DH, são preferentemente provenientes de um vírus, que infecta algas, preferentemente de um vírus, que infecta algas do gênero *Chlorella*, de modo particularmente preferido, de um vírus *Paramecium bursaria Chlorella* e de modo especialmente preferido, de um vírus *Paramecium bursaria Chlorella*.

5 *la* de uma cepa H1.

Moléculas de ácido nucleico, que hibridizam com as moléculas de ácido nucleico mencionadas, podem ser isoladas, por exemplo, de bibliotecas genômicas ou de cDNA. Nesse caso, a identificação e isolamento de tais moléculas de ácido nucleico, pode ser efetuada com a utilização das 10 moléculas de ácido nucleico mencionadas ou de partes dessas moléculas ou de complementos reversos dessas moléculas, por exemplo, por meio de hibridização por processos padronizados (vide, por exemplo, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou através de amplificação 15 por meio de PCR.

Como amostra de hibridização para o isolamento de uma sequência de ácido nucleico, que codifica uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, podem ser utilizadas, por exemplo, moléculas de ácido nucleico, que apresentam exatamente a ou essencialmente a sequência de 20 nucleotídios mencionada sob a SEQ ID nº 4 ou a SEQ ID nº 6 ou partes dessas sequências.

No caso dos fragmentos utilizados como amostra de hibridização, pode tratar-se também de fragmentos sintéticos ou de oligonucleotídeos, que foram produzidos com auxílio das técnicas de síntese usuais e 25 cuja sequência está essencialmente de acordo com a de uma molécula de ácido nucleico descrita no âmbito da presente invenção. Caso tenham sido identificados e isolados genes, que hibridizam com as sequências de ácido nucleico descritas no âmbito da presente invenção, deveria ser efetuada uma determinação da sequência e uma análise das características das proteínas codificadas por essa sequência, para determinar, se se trata de proteínas, que apresentam a atividade de uma UDP-Glc-DH. Métodos, tal como 30 pode ser determinado se uma proteína apresenta a atividade de uma proteí-

na com a atividade de uma UDP-Glc-DH, são conhecidos pelo técnico e suficientemente descritos na literatura (por exemplo, De Luca et al., 1976, *Tissue Research* 4, 247-254; Bar-Peled et al., 2004, *Biochem. J.* 381, 131-136; Turner und Botha, 2002, *Archives Biochem. Biophys.* 407, 209-216).

5 As moléculas que hibridizam as moléculas de ácido nucleico descritas no âmbito da presente invenção, abrangem especialmente fragmentos, derivados e variantes alélicas das moléculas de ácido nucleico mencionadas. O termo "derivado" no âmbito da presente invenção, significa que as sequências dessas moléculas se diferenciam das sequências das
10 moléculas de ácido nucleico descritas acima em uma ou mais posições e apresentam um alto grau de identidade para essas sequências. Nesse caso, os desvios para as moléculas de ácido nucleico descritas acima podem ser originadas, por exemplo, por deleção, adição, substituição, inserção ou recombinação.

15 O termo "identidade" no contexto da presente invenção, significa uma identidade de sequência sobre todo o comprimento da região codificadora de uma molécula de ácido nucleico ou todo o comprimento de uma sequência de aminoácidos, que codifica uma proteína, de pelo menos 60%, especialmente uma identidade de pelo menos 70%, preferentemente de pelo
20 menos 80%, de modo particularmente preferido, de pelo menos 90% e de modo especialmente preferido, de pelo menos 95%. Pelo termo "identidade" no contexto da presente invenção, significa o número dos aminoácidos/nucleotídeos (identidade) que estão de acordo com outras proteínas/ácidos nucleicos, expresso em por cento. Preferentemente, a identidade
25 em relação a uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH é determinada através de comparações da sequência de aminoácidos indicada sob a SEQ ID nº 5 ou a identidade em relação a uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, através de comparações das sequências de ácido nucleico indicadas sob a SEQ ID nº 4
30 ou SEQ ID nº 6, para outras proteínas/ácidos nucleicos com auxílio de programas de computador. Caso as sequências, que foram comparadas umas com as outras, apresentem diferentes comprimentos, a identidade deve ser

determinada de maneira tal que o número de aminoácidos, os quais têm em comum a sequência mais curta junto com a sequência mais longa, determine a fração percentual da identidade. Preferivelmente, a identidade é determinada por meio do programa de computador conhecido e disponibilizado publicamente ClustalW (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680). ClustalW é disponibilizado publicamente pela Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) e Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Alemanha). ClustalW também pode ser baixado de diversas páginas de internet, entre outras, no IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P. 163, 67404 Illkirch Cedex, França; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/>) e no EBI (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>), bem como em todas as páginas de internet refletidas do EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, Reino Unido). Preferivelmente, utiliza-se o programa de computador ClustalW da versão 1.8, para determinar a identidade entre as proteínas descritas no âmbito da presente invenção e outras proteínas. Nesse caso, devem ser ajustados os seguintes parâmetros: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAPOOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP. Preferivelmente, utiliza-se o programa de computador ClustalW da versão 1.8, para determinar a identidade entre, por exemplo, a sequência de nucleotídeos das moléculas de ácido nucleico descritas no âmbito da presente invenção e a sequência de nucleotídeos de outras moléculas de ácido nucleotídeos. Nesse caso, devem ser ajustados os seguintes parâmetros:

KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAPOOPEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: unweighted.

Além disso, identidade significa que há equivalência funcional e/ou estrutural entre as respectivas moléculas de ácido nucleico ou entre as proteínas codificadas por elas. No caso das moléculas de ácido nucleico, que são homólogas às moléculas descritas acima e representam derivados

dessas moléculas, trata-se, via de regra, de variações dessas moléculas, que representam modificações, que exercem a mesma função biológica. Nesse caso, pode tratar-se tanto de variações que ocorrem naturalmente, por exemplo, de sequências de outras espécies ou de mutações, sendo que 5 essas mutações podem ter ocorrido de maneira natural ou introduzidas por mutagênese visada. Além disso, no caso das variações pode tratar-se de sequências produzidas sinteticamente. No caso das variantes alélicas, pode tratar-se tanto de variantes que ocorrem naturalmente, como também de variantes produzidas sinteticamente ou produzidas por técnicas de DNA re-10 combinantes. As moléculas de ácido nucleico representam, por exemplo, uma forma especial de derivados que, com base na degeneração do código genético, desviam de moléculas de ácido nucleico descritas no âmbito da presente invenção.

As moléculas de ácido nucleico dos diversos derivados de molé-15 culas de ácido nucleico, que codificam uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, apresentam certas características comuns. Nestas podem ser incluídas, por exemplo, atividade biológica, especificidade do substrato, peso molecular, reatividade imunológica, conformação e outras, bem como caracte-20 rísticas físicas, tais como, por exemplo, comportamento do curso em ele- troforeses de gel, comportamento cromatográfico, coeficientes de sedimen- tação, solubilidade, características espectroscópicas, estabilidade, ótimo pH, ótima temperatura e assim por diante. Características preferidas de proteí-25 nas com a atividade de uma UDP-Glc-DH são conhecidas pelo técnico, já foram discutidas acima e devem ser aplicadas aqui correspondentemente.

Em uma outra forma de concretização preferida, a presente in-25 venção refere-se a células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou a plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, em que as moléculas de ácido nucleico que codificam uma proteí-30 na com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH são caracterizadas pelo fato de que os códons das moléculas de ácido nucleico mencionadas são modificadas, em comparação com os códons da atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH das moléculas de ácido nucleico, as quais codificam a

proteína mencionada com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH de um organismo original. Particularmente, preferem-se os códons das moléculas de ácido nucleico que codificam uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH de maneira tal que elas são ajustadas à frequência da utilização dos códons da célula de plantas ou da planta, em cujo genoma 5 eles são ou serão integrados.

Um outro objetivo da presente invenção refere-se a células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou a plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, caracterizadas pelo fato de que as moléculas de ácido nucleico estranhas integradas de maneira 10 estável no genoma da célula de planta ou da planta, que codificam uma hialuronano sintase e/ou que codificam uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH, são ligadas com elementos reguladores, que iniciam a transcrição em células de plantas (promotores). Pode tratar-se de promotores homólogos ou heterólogos. No caso dos promotores, pode tratar-se 15 de promotores constitutivos, específicos de tecidos, específicos de desenvolvimento ou de promotores regulados por influências externas (por exemplo, após a aplicação de substâncias químicas, pela ação de fatores abióticos, tais como calor e/ou frio, seca, aparecimento de doença e outros). Nesse caso, as moléculas de ácido nucleico, que codificam uma hialuronano sintase ou uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH, 20 que são integradas no genoma de uma célula de planta geneticamente modificada de acordo com a invenção ou planta geneticamente modificada de acordo com a invenção, podem estar ligadas em cada caso com o mesmo promotor, ou diversos promotores podem estar ligados com uma sequência 25 individual.

Uma forma de concretização preferida da presente invenção, refere-se a células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou a plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, em que pelo menos uma molécula de ácido nucleico estranha, de modo particularmente preferido, pelo menos duas moléculas de ácido nucleico estranhas, selecionadas do grupo de moléculas de ácido nucleico, que codifi- 30

cam uma hialuronano sintase ou uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH, está(estão) ligada(s) com um promotor específico de tecidos. Promotores específicos de tecidos preferidos representam promotores, que iniciam a iniciação da transcrição especificamente em células vegetais de tubérculos, folhas, frutos ou sementes.

Para a expressão de moléculas de ácido nucleico, que codificam uma hialuronano sintase ou uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH, essas são preferentemente ligadas com sequências de DNA reguladoras, que asseguram a transcrição nas células vegetais. Para isso, incluem-se especialmente promotores. Em geral, toma-se em consideração para a expressão, todo o promotor ativo em células vegetais. Nesse caso, o promotor pode ser selecionado de maneira tal que a expressão seja efetuada constitutivamente ou apenas em um determinado tecido, em um determinado momento do desenvolvimento da planta ou em um momento determinado pelas influências externas. Tanto em relação à planta, como também em relação à molécula de ácido nucleico a ser exprimida, o promotor pode ser homólogo ou heterólogo.

Promotores apropriados são, por exemplo, o promotor do vírus mosaico 35S RNA da couve-flor ou promotor ubiquitina do milho ou do *Cestrum YLCV* (Yellow Leaf Curling Virus; WO 01 73087; Stavolone et al., 2003, Plant Mol. Biol. 53, 703-713) para uma expressão constitutiva, o promotor Patatingen B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) para uma expressão específica do tubérculo em batatas ou um promotor específico de frutas para tomate; tal como por exemplo, o promotor Polygalacturonase do tomate (Montgomery et al., 1993, Plant Cell 5, 1049-1062) ou o promotor E8 do tomate (Metha et al., 2002, Nature Biotechnol. 20(6), 613-618) ou o promotor ACC Oxidase do pêssego (Moon e Callahan, 2004, J. Experimental Botany 55 (402), 1519-1528) ou um promotor, que assegura uma expressão meramente em tecidos fotossinteticamente ativos, por exemplo, o promotor ST-LS1 (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) ou o promotor HMWG do trigo para uma expressão específica do endosperma, o promotor USP, o

promotor faseolina, promotores de genes zein do milho (Pedersen et al., Cell 29 (1982), 1015-1026, Quattroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93), promotor 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), um promotor Shrunken-1 (Werr et al., EMBO J. 4 (1985), 1373-1380), um promotor globulina (Nakase et al., 1996, Gene 170(2), 223-226) ou um promotor prolamina (Qu e Takaiwa, 2004, Plant Biotechnology Journal 2(2), 113-125). No entanto, também podem ser utilizados promotores, que são ativados apenas em um momento determinado por influências externas (vide, por exemplo a WO 9307279). Nesse caso, os promotores de proteínas de choque térmico (heat-shock), que permitem uma indução simples, podem ter um interesse particular. Além disso, podem ser utilizados promotores específicos de semente, tais como, por exemplo, o promotor USP de *Vicia faba*, que assegura uma expressão específica de semente em *Vicia faba* e outras plantas (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679 Bäumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467). A utilização de promotores, que ocorrem no genoma de vírus infectados por algas, também é apropriada para a expressão de sequências de ácido nucleico em plantas (Mitra et al., 1994, Biochem. Biophys. Res Commun 204(1), 187-194; Mitra e Higgins, 1994, Plant Mol Biol 26(1), 85-93, Van Etten et al., 2002, Arch Virol 147, 1479-1516).

Pelo termo "específico do tecido" no contexto da presente invenção, deve ser entendida a principal limitação de um desenvolvimento (por exemplo, a iniciação da transcrição) sobre um determinado tecido.

Pelos termos "célula de tubérculo, fruto ou semente" no contexto da presente invenção, devem ser entendidas todas as células, que estão contidas em um tubérculo, fruto ou em uma semente.

Pelo termo "promotor homólogo" no contexto da presente invenção, deve ser entendido um promotor, que ocorre naturalmente em células de plantas ou plantas, que foram utilizadas para a produção de células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção (homólogas em rela-

ção à célula da planta ou da planta) ou um promotor, que regula a regulação da expressão de um gene no organismo, a partir do qual foi isolada a sequência (homóloga em relação à molécula de ácido nucleico a ser expressa).

5 Pelo termo "promotor heterólogo" no contexto da presente invenção, deve ser entendido um promotor, que não ocorre naturalmente em células de plantas ou plantas, que foram utilizadas para a produção de células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção (heterólogas em relação à célula da planta ou à planta) ou um promotor, que foi isolado naturalmente no organismo, a partir do qual foi isolada uma sequência de ácido nucleico a ser expressa, não para a regulação da expressão da sequência de ácido nucleico a ser expressa (heteróloga em relação à molécula de ácido nucleico a ser expressa).

10

15 Além disso, pode estar presente uma sequência de terminação (sinal de poliadenilação), que serve para a adição de uma cauda Poly-A ao transcrito. À cauda Poly-A é acrescentada uma função na estabilização dos transcritos. Tais elementos são descritos na literatura (compare Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) e são permutáveis quando desejado.

20 Entre o promotor e a região a ser codificada também podem estar presentes sequências de ítrons. Essas sequências ítron podem levar à estabilidade da expressão e a uma expressão aumentada nas plantas (Callis et al., 1987, Genes Devel. 1, 1183-1200; Luehrs and Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-93; Rethmeier et al., 1997, Plant Journal 12(4), 895-899; Rose e 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 nº 6, 561-569). Sequências ítron apropriadas são, por exemplo, o primeiro ítron do gene sh1 do milho, o primeiro ítron do gene poliubiquitina 1 do milho o primeiro ítron do gene EPSPS do arroz ou um dos dois primeiros ítrons do gene PAT1 de *Arabidopsis*.

25

30

Um outro objetivo da presente invenção refere-se a plantas, contendo células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a inven-

ção. Tais plantas podem ser produzidas através da regeneração de células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção.

A presente invenção refere-se também a partes processáveis ou consumíveis de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, contendo células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção.

Pelo termo "partes processáveis" no contexto da presente invenção devem ser entendidas partes de plantas, que encontram utilização na produção de alimentos ou forragens, que são aplicadas como fonte de matéria-prima para processos industriais, como fonte de matéria-prima para a produção de produtos farmacêuticos ou como fonte de matéria-prima para a produção de produtos cosméticos.

Pelo termo "partes consumíveis" no contexto da presente invenção devem ser entendidas ramificações, que servem ao homem como alimento ou são utilizadas como forragem.

A presente invenção refere-se também ao material de crescimento de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, contendo células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção.

O termo "material de crescimento" abrange, nesse caso, aqueles elementos da planta, que são apropriados para a produção de descendentes por processo vegetativo ou sexual. Para a reprodução vegetativa prestam-se por exemplo, estacas, culturas de calo, rizomas ou tubérculos. Outro material de reprodução abrange, por exemplo, frutos, sementes, planta nascida de semente, protoplastos, culturas de células e outros. No caso do material de crescimento, trata-se preferentemente de tubérculos, frutos ou sementes.

Em uma outra forma de concretização, a presente invenção refere-se a partes de plantas colhíveis de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, tais como frutos, tubérculos de raízes, raízes, flores, brotos, rebentos, folhas ou caules, preferentemente sementes, frutos ou tubérculos, sendo que essas partes colhíveis contêm células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção.

Preferentemente, a presente invenção refere-se ao material de crescimento de acordo com a invenção ou a partes colhíveis de plantas de acordo com a invenção, contendo hialuronano. De modo particularmente preferido, trata-se nesse caso, de material de crescimento de acordo com a invenção ou de partes colhíveis de plantas de acordo com a invenção, que sintetizam hialuronano.

O termo "planta de batata" ou "batata" no contexto da presente invenção significa espécies de plantas do gênero *Solanum*, particularmente espécies produtoras de tubérculos do gênero *Solanum* e especialmente *Solanum tuberosum*.

O termo "planta de tomate" ou "tomate" no contexto da presente invenção significa espécies de plantas do gênero *Lycopersicon*, particularmente *Lycopersicon esculentum*.

Uma outra vantagem da presente invenção está em que partes colhíveis, material de crescimento, partes processáveis ou partes consumíveis de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção contêm mais hialuronano do que plantas transgênicas descritas na literatura que sintetizam hialuronano. Por isso, plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção não apenas são particularmente apropriadas para a utilização como matéria-prima, a partir da qual pode ser isolado o hialuronano, mas sim, também como utilização direta como alimentos/forragens ou para a produção de alimentos/forragens, as quais apresentam um caráter preventivo ou terapêutico (por exemplo, para a prevenção contra osteoartrite, US 6.607.745). Visto que plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção apresentam um teor de hialuronano maior do que plantas descritas na literatura, devem ser aplicadas menores quantidades de partes colhíveis, material de crescimento, partes processáveis ou partes consumíveis de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção para produzir esses alimentos/forragens. Caso as partes consumíveis de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção sejam consumidas por exemplo, diretamente como o chamado nutricêutico, então é possível obter um efeito positivo já através do consumo de menores quantidades de

substância. Essa pode obter, entre outros, um significado particular na produção de ração, pois a ração com um teor alto demais de componentes vegetais, não é apropriada como forragem para as mais diferentes espécies animais.

5 Devido a alta capacidade de hialuronano de ligar água, as partes colhíveis apresentam material de crescimento, partes processáveis ou partes consumíveis de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção apresentam, além disso, a vantagem de que na produção de alimentos/forragens ligados precisam ser aplicados menos espessantes. Dessa
10 maneira, por exemplo, na produção de géis é utilizado menos açúcar, o que traz consigo um efeito de saúde positivo adicional. Na produção de alimentos/forragens, no qual é necessário retirar água da matéria-prima vegetal, a vantagem na utilização de partes colhíveis, material de crescimento, partes processáveis ou partes consumíveis de plantas geneticamente modificadas
15 de acordo com a invenção é que é preciso retirar menos água do respectivo material da planta, o que leva a custos de produção mais baixos e através de processos de produção mais cuidadosos (por exemplo, menor e/ou mais curta adução de calor) é assegurado um valor nutritivo aumentado dos respectivos alimentos/forragens. Dessa maneira, por exemplo, na produção de
20 ketchup de tomates é preciso acrescentar menos energia, para obter a consistência desejada.

Um outro objetivo da presente invenção, refere-se a um processo para a produção de uma planta, que sintetiza hialuronano, em que:

a) uma célula de planta, é geneticamente modificada, em que a
25 modificação genética abrange os seguintes estágios i até ii

- i) introdução de uma molécula de ácido nucleico estranho, que codifica uma hialuronano sintase na célula da planta
- ii) introdução de uma modificação genética na célula da planta, sendo que a modificação genética leva ao aumento da atividade de uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH em comparação com células de plantas de tipo silvestre correspondentes não geneticamente modificadas,

sendo que os estágios i até ii podem ser efetuados na ordem desejada, individualmente ou simultaneamente em combinações desejadas dos estágios i até ii

- b) uma planta é regenerada a partir de células de plantas do estágio a);
- c) eventualmente outras plantas são produzidas com auxílio das plantas de acordo com o estágio b), sendo que eventualmente a partir de plantas obtidas do estágio b) i ou b) ii podem ser isoladas células de plantas e os estágios dos processos a) até c) são repetidos por tanto tempo, até que tenha sido produzida uma planta, que apresenta uma molécula de ácido nucleico estranha, que codifica uma hialuronano sintase e apresenta uma atividade aumentada de uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH em comparação com células de plantas de tipo silvestre correspondentes, não geneticamente modificadas.

Um objetivo preferido da presente invenção, refere-se ao processo para a produção de uma planta que sintetiza hialuronano, no qual:

- a) uma célula de planta, é geneticamente modificada, em que a modificação genética abrange os seguintes estágios i até ii na ordem desejada ou combinações desejadas dos seguintes estágios i até ii são efetuadas individual ou simultaneamente

- i) introdução de uma molécula de ácido nucleico estranha, que codifica uma hialuronano sintase na célula de planta
- ii) introdução de uma modificação genética na célula da planta, em que a modificação genética leva ao aumento da atividade de uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH, em comparação com células de plantas de tipo silvestre correspondentes não geneticamente modificadas

b) a partir de células de plantas contendo a modificação genética de acordo com os estágios

- | | | |
|----|------|---------------|
| 30 | i | a) i |
| | ii | a) ii |
| | iii) | a) i e a) ii, |

uma planta é regenerada

c) em células de plantas de acordo com o estágio é introduzida

i) b) i uma modificação genética de acordo com o estágio a) ii,

5 ii) b) ii uma modificação genética de acordo com o estágio a) i e uma planta é regenerada

d) eventualmente outras plantas são produzidas com auxílio das plantas, obtidas conforme um dos estágios b) iii ou c) i ou c) ii.

Para as modificações genéticas introduzidas na célula da planta 10 conforme o estágio a), vale que nesse caso pode tratar-se fundamentalmente de qualquer tipo de modificação, que leva ao aumento da atividade de uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH.

A regeneração das plantas de acordo com o estágio a) e eventualmente estágio c) dos processos de acordo com a invenção pode ser efetuada por métodos conhecidos pelo técnico (por exemplo, descritos em 15 "Plant Cell Culture Protocols", 1999, edt. by R. D. Hall, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2).

A produção de outras plantas (dependendo de processos de acordo com o estágio c) ou estágio d) dos processos de acordo com a invenção 20 pode ser efetuada, por exemplo, através de reprodução vegetativa (por exemplo, por meio de estacas, tubérculos ou cultura de calos e regeneração da planta inteira) ou através de reprodução sexual. Nesse caso, a reprodução sexual realiza-se preferentemente de maneira controlada, isto é, plantas selecionadas com determinadas características são cruzadas umas com as 25 outras e reproduzidas. Nesse caso, a seleção é preferentemente efetuada de maneira tal que as outras plantas (produzidas dependendo de processos de acordo com o estágio c) ou estágio d)) apresentem as modificações introduzidas nos estágios precedentes.

Em processos para a produção de plantas de acordo com a invenção, que sintetizam hialuronano, as modificações genéticas para a produção das células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção podem ser efetuadas simultaneamente ou em estágios subsequen-

tes. Nesse caso, é insignificante se para modificações genéticas subsequentes, que levam a uma atividade aumentada de uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH, for utilizado o mesmo método como para a modificação genética, que é utilizada para a introdução de uma molécula de 5 ácido nucleico estranha, que codifica uma hialuronano sintase na célula da planta.

Em uma outra forma de concretização de processos para a produção da planta, que sintetiza hialuronano, a modificação genética consiste na introdução de uma molécula de ácido nucleico estranha no genoma da 10 célula da planta, em que a presença ou a expressão da molécula de ácido nucleico estranha leva a uma atividade aumentada de uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH da célula da planta.

Tal como já foi descrito acima para moléculas de ácido nucleico estranhas introduzidas na célula da planta ou planta para a modificação genética, no caso do estágio a) dos processos para a produção de uma planta de acordo com a invenção, que sintetiza hialuronano, pode tratar-se de uma molécula de ácido nucleico individual ou de várias moléculas de ácido nucleico. Dessa maneira, as moléculas de ácido nucleico estranhas, que codificam uma hialuronano sintase ou codificam uma proteína com a atividade 15 enzimática de uma UDP-Glc-DH podem estar presentes em uma única molécula de ácido nucleico ou elas podem estar presentes nas moléculas de ácido nucleico separadas. Caso estejam presentes moléculas de ácido nucleico, que codificam uma hialuronano sintase e codificam uma proteína com a atividade em várias moléculas de ácido nucleico, então essas moléculas 20 de ácido nucleico podem ser simultaneamente introduzidas ou em estágios subsequentes em uma célula de planta.

Além disso, para a introdução de uma molécula de ácido nucleico estranha na execução de processos para a produção de uma planta, que sintetiza hialuronano, de acordo com a invenção, utilizam-se, além de uma 25 célula de planta de tipo silvestre ou de planta de tipo silvestre, células de mutantes ou mutantes, que se destacam pelo fato de já apresentarem uma atividade aumentada de uma proteína com a atividade enzimática de uma

UDP-Glc-DH. Caso a célula de mutante ou o mutante já apresente uma atividade aumentada de uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH em comparação com células de plantas de tipo silvestre correspondentes ou de plantas de tipo silvestre, então para efetuar um processo para a produção de uma planta, que sintetiza hialuronano, de acordo com a invenção, basta introduzir na célula de mutante mencionada ou no mutante, uma molécula de ácido nucleico estranha, que codifica uma hialuronano sintase.

As informações dadas mais acima para a utilização de mutantes para a produção de células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção devem ser aplicadas correspondentemente aqui.

Em formas de concretização preferidas, a presente invenção refere-se a processos para a produção de uma planta, que sintetiza hialuronano, de acordo com a invenção, em que a molécula de ácido nucleico, que codifica uma hialuronano sintase é selecionada no estágio a) do grupo constando em:

- a) moléculas de ácido nucleico, caracterizadas pelo fato de codificarem uma hialuronano sintase viral,
- b) moléculas de ácido nucleico, caracterizadas pelo fato de codificarem uma hialuronano sintase de um vírus que infecta *Chlorella*,
- c) moléculas de ácido nucleico, caracterizadas pelo fato de codificarem uma hialuronano sintase de um vírus de *Paramecium bursaria Chlorella 1*,
- d) moléculas de ácido nucleico, caracterizadas pelo fato de codificarem uma hialuronano sintase de um vírus de *Paramecium bursaria Chlorella 1* da cepa H1
- e) moléculas de ácido nucleico, caracterizadas pelo fato de que os códons da molécula de ácido nucleico, que codifica uma hialuronano sintase, são modificados, em comparação aos códons da molécula de ácido nucleico, que codifica a hialuronano sintase do organismo original da hialuronano sintase,

f) moléculas de ácido nucleico, caracterizadas pelo fato de que os códons da hialuronano sintase são modificados de maneira tal que eles são ajustados à frequência da utilização dos códons das células de plantas ou da planta, em cujo genoma eles estarão ou estão,

5 g) moléculas de ácido nucleico, caracterizadas pelo fato de codificarem uma hialuronano sintase com a sequência de aminoácidos representada sob a SEQ ID nº 2 ou de codificarem uma hialuronano sintase, cuja sequência de aminoácidos apresenta uma identidade de pelo menos 70%, preferentemente de pelo menos 80%, de modo particularmente preferido, de 10 pelo menos 90% e de modo especialmente preferido de pelo menos 95%,

15 h) moléculas de ácido nucleico, caracterizadas pelo fato de codificarem uma proteína, cuja sequência de aminoácidos pode ser derivada da região codificadora da sequência de ácido nucleico inserida no plasmídeo DSM 1664 ou de codificarem uma proteína, cuja sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos, que pode ser derivada da região codificadora da sequência de ácido nucleico inserida no plasmídeo DSM 16664, apresenta uma identidade de pelo menos 70%, preferentemente de pelo menos 80%, preferentemente de pelo menos 90% e de modo especialmente preferido de pelo menos 95%,

20 i) moléculas de ácido nucleico, que abrangem uma sequência de ácido nucleico representada sob a SEQ ID nº 1 ou SEQ ID nº 3 ou a sequência de ácido nucleico representada sob a SEQ ID nº 1 o SEQ ID nº 3 apresenta uma identidade de pelo menos 70%, preferentemente de pelo menos 80%, preferentemente de pelo menos 90% e de modo especialmente preferido de pelo menos 95%,

25 j) moléculas de ácido nucleico, que abrangem a sequência de ácido nucleico inserida no plasmídeo DSM 16664 ou que com a sequência de ácido nucleico inserida no plasmídeo DSM 16664 apresentam uma identidade de pelo menos 70%, preferentemente de pelo menos 80%, preferentemente de pelo menos 90% e de modo especialmente preferido, de pelo menos 95%,

k) moléculas de ácido nucleico, que codificam uma hialuronano

sintase, em que as sequências de ácido nucleico que codificam a hialuronano sintase estão ligadas com elementos reguladores (promotor), que iniciam a transcrição em células de plantas ou

- l) moléculas de ácido nucleico, de acordo com k), em que os
5 promotores representam promotores específicos de tecidos, de modo particularmente preferido, promotores, que iniciam a iniciação da transcrição especificamente em células de sementes vegetais de tubérculos, folha, fruto ou semente.

Em formas de concretização preferidas, a presente invenção
10 refere-se a processos para a produção de uma planta, que sintetiza hialuronano, de acordo com a invenção, em que a molécula de ácido nucleico estranha, que codifica uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, é selecionada do grupo constando em:

- a) moléculas de ácido nucleico, caracterizadas pelo fato de codificarem uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, a qual é proveniente de vírus, bactérias, animais ou plantas;
- b) moléculas de ácido nucleico, caracterizadas pelo fato de codificarem uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH de um vírus que infecta *Chlorella*;
- c) moléculas de ácido nucleico, caracterizadas pelo fato de codificarem uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH de um vírus *Paramecium bursaria Chlorella*;
- d) moléculas de ácido nucleico, caracterizadas pelo fato de que os códons da molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH são modificados, em comparação com os códons da molécula de ácido nucleico, a qual codifica a proteína correspondente com a atividade de uma UDP-Glc-DH do organismo original;
- e) moléculas de ácido nucleico, caracterizadas pelo fato de que os códons da molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH são modificados de maneira tal que eles são ajustados à frequência da utilização dos códons da célula de planta ou da planta, em cujo genoma eles serão ou estão integrados;

- f) moléculas de ácido nucleico, caracterizadas pelo fato de que os códons da proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH são modificados de maneira tal que eles são ajustados à frequência da utilização dos códons da célula de planta ou da planta, em cujo genoma eles serão ou estão integrados;
- 5 g) moléculas de ácido nucleico, que codificam uma proteína, cuja sequência apresenta uma identidade de pelo menos 70%, preferentemente de pelo menos 80%, preferentemente de pelo menos 90% e de modo especialmente preferido de pelo menos 95% em relação à sequência de aminoácidos mencionada sob a SEQ ID nº 5;
- 10 h) moléculas de ácido nucleico, que abrangem a sequência de nucleotídeos representada sob a SEQ ID nº 4 o sob a SEQ ID nº 6 ou uma sequência complementar;
- i) moléculas de ácido nucleico, que em relação às sequências de 15 ácido nucleico descritas sob h), apresentam uma identidade de pelo menos 70%, preferentemente de pelo menos 80%, preferentemente de pelo menos 90% e de modo especialmente preferido de pelo menos 95%;
- j) moléculas de ácido nucleico, que hibridizam com pelo menos um segmento das moléculas de ácido nucleico descritas sob f) ou h) com 20 condições estringentes;
- k) moléculas de ácido nucleico, cuja sequência de nucleotídeos, com base na degeneração do código genético, desvia da sequência das moléculas de ácido nucleico mencionadas sob f) ou h); e
- l) moléculas de ácido nucleico, que representam os fragmentos, 25 variantes alélicas e/ou derivados das moléculas de ácido nucleico mencionadas sob a), b), c), d), e), f) ou h);
- m) moléculas de ácido nucleico, que codificam uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH, em que as sequências de ácido nucleico que codificam uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH estão 30 ligadas com elementos reguladores (promotor), que iniciam a transcrição em células de plantas ou
- n) moléculas de ácido nucleico, de acordo com m), em que os

promotores representam promotores específicos de tecidos, de modo particularmente preferido, promotores, que iniciam a iniciação da transcrição especificamente em células vegetais de tubérculos, folhas, frutos ou sementes.

Em uma outra forma de concretização preferida, os processos para a produção de uma planta, que sintetiza hialuronano, de acordo com a invenção, são utilizados para a produção de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção.

Plantas obtêveis segundo processos para a produção de uma planta, que sintetiza hialuronano, de acordo com a invenção, são também objetivos da presente invenção.

Um outro objetivo da presente invenção refere-se a um processo para a produção de hialuronano, que abrange o estágio da extração de hialuronano de células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, de material de reprodução de acordo com a invenção, de partes de plantas colhíveis de acordo com a invenção ou de plantas ou partes dessas, obtêveis por um processo para a produção de plantas, que sintetizam hialuronano, de acordo com a invenção. Preferivelmente, um tal processo abrange também o estágio da colheita das células de plantas cultivadas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, das plantas cultivadas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, do material de reprodução de acordo com a invenção, das partes de plantas colhíveis de acordo com a invenção, das partes de plantas processáveis de acordo com a invenção antes da extração do hialuronano e de modo particularmente preferido, além disso, o estágio do cultivo de células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção antes da colheita.

Ao contrário de tecidos bacterianos ou animais, os tecidos vegetais não apresentam hialuronidases e não contêm hialaderinas. Por isso, tal como já foi descrito acima, a extração de hialuronano de tecidos vegetais é possível com auxílio de processos relativamente simples. Os extratos aquosos de células vegetais ou tecidos, contendo hialuronano, descritos acima,

podem ser ulteriormente purificados conforme a necessidade, com métodos conhecidos pelo técnico, tais como, por exemplo, de várias precipitações subsequentes com etanol. Um método preferido para a purificação de hialuronano é descrito sob os métodos gerais ponto 3.

5 Os processos já descritos para a extração de hialuronano de células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, são aplicáveis também para o isolamento de hialuronano de material de reprodução de acordo com a invenção, de partes de plantas colhíveis de acordo com a
10 invenção ou de plantas ou partes dessas plantas, obtêveis por um processo para a produção de plantas, que sintetizam hialuronano, de acordo com a invenção.

15 O objeto da presente invenção é também a utilização de células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, de material de reprodução de acordo com a invenção, partes de plantas colhíveis de acordo com a invenção, partes de plantas processáveis de acordo com a invenção ou de plantas, obtêveis por um processo de acordo com a invenção para a produção de hialuronano.

20 Um outro objeto da presente invenção refere-se a composições, contendo células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção. Nesse caso, é indiferente, se as células de plantas estão intactas ou não mais intactas, pois elas foram destruídas, por exemplo, através de processos de processamento. De modo preferido, trata-se no caso das composições, de alimentos ou forragens, de produtos farmacêuticos ou de produtos cosméticos.

25 Um objetivo preferido da presente invenção refere-se a composições, contendo elementos de partes de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, de material de reprodução de acordo com a invenção, de partes de plantas colhíveis de acordo com a invenção ou de plantas, obtêveis por um processo de acordo com a invenção e contendo moléculas de

ácido nucleico recombinantes, em que as moléculas de ácido nucleico recombinantes são caracterizadas pelo fato de abrangearem moléculas de ácido nucleico, que codificam uma hialuronano sintase e uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH.

5 Uma integração estável de moléculas de ácido nucleico estranhas no genoma de uma célula de planta ou planta faz com que as moléculas de ácido nucleico estranhas, após a integração no genoma da célula de planta ou planta, sejam ladeadas por sequências vegetais genômicas de ácido nucleico.

10 Por conseguinte, em uma forma de concretização preferida, as composições de acordo com a invenção, são caracterizadas pelo fato de que as moléculas de ácido nucleico recombinantes, contidas na composição de sequências vegetais genômicas de ácido nucleico de acordo com a invenção, são ladeadas.

15 Nesse caso, as sequências de ácido nucleico vegetais genômicas podem ser sequências desejadas, que se apresentam naturalmente no genoma da célula de planta ou planta, que foi utilizada para a produção da composição.

20 No caso das moléculas de ácido nucleico recombinantes contidas nas composições de acordo com a invenção pode tratar-se de moléculas de ácido nucleico recombinantes individuais ou diferentes, nas quais moléculas de ácido nucleico, que codificam uma hialuronano sintase e proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH, estão presentes em uma única molécula de ácido nucleico, ou daquelas, nas quais as moléculas de ácido nucleico mencionadas estão presentes em moléculas de ácido nucleico recombinantes separadas. Dependendo de que maneira as moléculas de ácido nucleico, que codificam uma hialuronano sintase ou que codificam uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-Glc-DH estão presentes em uma composição de acordo com a invenção, elas podem ser ladeadas por sequências de ácido nucleico vegetais genômicas idênticas ou diferentes.

30 O fato de que composições de acordo com a invenção contêm

moléculas de ácido nucleico recombinantes, pode ser comprovado com métodos conhecidos pelo técnico, tal como, por exemplo, de métodos à base de hibridização ou preferentemente de métodos à base de PCR (Polymerase Chain Reaction).

5 Preferivelmente, as composições de acordo com a invenção contêm pelo menos 0,005%, preferentemente pelo menos 0,01%, de modo particularmente preferido, pelo menos 0,05%, de modo especialmente preferido, pelo menos 0,1% de hialuronano.

Tal como já foi mostrado acima, as células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, material de reprodução de acordo com a invenção, partes de plantas colhíveis de acordo com a invenção, partes de plantas processáveis de acordo com a invenção, partes de plantas consumíveis de acordo com a invenção ou plantas, obtêveis por um processo de acordo com a invenção podem ser utilizadas para produzir alimentos ou forragens. Mas também é possível a utilização como matéria-prima para aplicações técnicas, sem precisar isolar o hialuronano. Dessa maneira, por exemplo, plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou partes de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção podem ser aplicadas em áreas de cultivo, para obter uma maior ligação de água do solo. Além disso, a utilização de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou de células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, é possível para a produção de agentes de secagem (por exemplo, para a utilização no transporte de objetos, que reagem de maneira sensível à umidade) ou com absorvedores de umidade (por exemplo, em fraldas para bebês ou para absorver líquidos aquosos escoados). Para essas aplicações podem ser utilizadas, conforme a necessidade, plantas inteiras geneticamente modificadas de acordo com a invenção, partes de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção trituradas (por exemplo, moídas) ou partes de plantas de acordo com a invenção. Especialmente em campos, nos quais são aplicadas plantas ou partes de plantas

moídas, são partes de plantas, que contêm hialuronano, no entanto, que apresentam mesmo uma pequena fração de água. Nesse caso, trata-se preferencialmente de grãos de plantas de cereais (milho, arroz, trigo, centeio, aveia, cevada, sago ou sorgo). Visto que células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção e plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção apresentam um teor de hialuronano maior do que plantas transgênicas descritas na literatura, é preciso aplicar menos material para aplicações técnicas em comparação com aquelas, quando são utilizadas células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção.

Além disso, são objetos da presente invenção os processos para a produção de uma composição de acordo com a invenção, em que são utilizadas células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, material de reprodução de acordo com a invenção, partes de plantas colhíveis de acordo com a invenção, partes de plantas processáveis de acordo com a invenção, partes de plantas consumíveis de acordo com a invenção ou plantas, obtêveis por um processo para a produção de uma planta, que sintetiza hialuronano, de acordo com a invenção. Preferentemente no caso dos processos para a produção de uma composição de acordo com a invenção, trata-se de processos para a produção de alimentos ou forragens, processos para a produção de um produto farmacêutico ou processos para a produção de um produto cosmético.

Processos para a produção de alimentos ou forragens são conhecidos pelo técnico. Processos para a utilização de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou de partes de plantas de acordo com a invenção, em campos técnicos, também são conhecidos pelo técnico e abrangem, entre outros, mas não são exclusivamente restritos à Trituração ou à moagem de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou de partes de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção. Algumas vantagens, que resultam da utilização de objetos para a produção de alimentos/forragens de acordo com a invenção ou para a apli-

cação em campos técnicos, já são ou foram descritas.

De modo particularmente preferido, trata-se no caso de um processo para a produção de uma composição, de um processo para a produção de uma composição, que contém hialuronano.

5 Composições obtêveis por um processo para a produção de uma composição de acordo com a invenção, são igualmente objeto da presente invenção.

A presente invenção refere-se também à utilização de células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, material de reprodução de acordo com a invenção, partes de plantas colhíveis de acordo com a invenção, partes de plantas processáveis de acordo com a invenção, partes de plantas consumíveis de acordo com a invenção ou plantas obtêveis por um processo para a produção de uma planta, que sintetiza hialuronano, de acordo com a invenção para a produção de uma composição de acordo com a invenção. Preferivelmente, trata-se da utilização de células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, material de reprodução de acordo com a invenção, partes de plantas colhíveis de acordo com a invenção, partes de plantas processáveis de acordo com a invenção, partes de plantas consumíveis de acordo com a invenção ou plantas obtêveis por um processo para a produção de uma planta, que sintetiza hialuronano, de acordo com a invenção para a produção de alimentos ou forragens, para a produção de um produto farmacêutico ou para a produção de um produto cosmético.

Descrição das Sequências

SEQ ID nº 1: sequência de ácido nucleico, que codifica uma hialuronano sintase do vírus *Paramecium bursaria Chlorella 1*.

SEQ ID nº 2: sequência de aminoácidos de uma hialuronano sintase do vírus *Paramecium bursaria Chlorella 1*. A sequência de aminoácidos representada pode derivar-se da SEQ ID nº 1.

SEQ ID nº 3: sequência de ácido nucleico sintética, que codifica uma hialu-

ronano sintase do vírus *Paramecium bursaria Chlorella* 1. A síntese dos códons da sequência representada foi efetuada de maneira tal que ela é ajustada à utilização de códons em células de plantas. A sequência de ácido nucleico representada codifica uma proteína com a sequência de aminoácidos

5 representada sob SEQ ID nº 2.

SEQ ID nº 4: sequência de ácido nucleico, que codifica uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH do vírus *Paramecium bursaria Chlorella* 1.

SEQ ID nº 5: sequência de aminoácidos de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH do vírus *Paramecium bursaria Chlorella* 1. A sequência de

10 aminoácidos representada pode derivar-se da SEQ ID nº 4.

SEQ ID nº 6: sequência de ácido nucleico sintética, que codifica uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH do vírus *Paramecium bursaria Chlorella* 1. A síntese dos códons da sequência representada foi efetuada de maneira tal que ela é ajustada à utilização de códons em células de plantas.

15 A sequência de ácido nucleico representada codifica uma proteína com a sequência de aminoácidos representada sob SEQ ID nº 5.

SEQ ID nº 7: oligonucleotídeo sintético, que foi utilizado no exemplo 1.

SEQ ID nº 8: oligonucleotídeo sintético, que foi utilizado no exemplo 1.

Descrição das Figuras

20 Figura 1: representa uma curva de calibração e a respectiva equação da linha reta de regressão, a qual foi utilizada para o cálculo do teor de hialuronano no tecido vegetal. A curva de calibração foi criada com auxílio do kit de teste comercial kit de teste ácido hiawrônico (HA) da Firma Cor-
genix, Inc., Colorado, USA. Prod. Nr. 029-001) e com as soluções padroni-
genix, Inc., Colorado, USA. Prod. Nr. 029-001) e com as soluções padroni-
25 zadas acompanhantes.

Métodos Gerais

A seguir, são descritos métodos, que podem ser utilizados no contexto da presente invenção. Esses métodos representam formas de concretização concretas, no entanto, na restringem a presente invenção a esses

30 métodos. O técnico sabe, que através da modificação dos métodos descritos e/ou através da substituição de métodos individuais ou partes de métodos por métodos alternativos ou por partes de métodos alternativos, ele pode

executar a invenção da mesma maneira.

1. Transformação de Plantas de Batata

Plantas de batata foram transferidas com auxílio de *Agrobacterium*, tal como descrito por Rocha-Sosa et al., (EMBO J. 8, (1989), 23-29).

5 2. Isolamento de Hialuronano de Tecido Vegetal

Material de plantas para comprovar a presença de hialuronano e para determinar o teor de hialuronano em tecido vegetal foi processado da seguinte maneira: a cerca de 0,3 g de material de tubérculo foram acrescendados 200 µl de água (desmineralizada, condutibilidade $\geq 18 \text{ M}\Omega$) e triturado com um moinho de bolas oscilante de laboratório (MM200, Firma Retsch, Alemanha) (por 30 segundos a 30 HZ). Em seguida, foi efetuada uma outra adição de 800 µl de água (desmineralizada, condutibilidade $\geq 18 \text{ M}\Omega$) e uma boa mistura (por exemplo, com auxílio de um Vortex). Os pedaços de células e elementos insolúveis foram separados do sobrenadante através de centrifugação por 5 minutos a 16000xg.

15 3. Purificação de Hialuronano

Cerca de 100 gramas de tubérculos foram descascados, cortados em pequenos pedaços de cerca de 1 cm³ e após adição de 100 ml de água (desmineralizada, condutibilidade $\geq 18 \text{ M}\Omega$), triturados em um Warring Blender por cerca de 30 segundos a velocidade máxima. Em seguida, os pedaços de células foram separados através de uma peneira de chá. Os pedaços de células separadas foram novamente suspensas com 300 ml de água (desmineralizada, condutibilidade $\geq 18 \text{ M}\Omega$) e outra vez separadas através de uma peneira de chá. As duas suspensões obtidas (100 ml + 300 ml) foram combinadas e centrifugadas por 15 minutos a 13000xg. Ao sobre-nadante de centrifugação obtido foi acrescentado NaCl até uma concentração final de 1%. Depois que o NaCl foi dissolvido, realizou-se uma precipitação, através da adição do volume duplo de etanol, em seguida, boa mistura e incubação durante a noite a -20°C. Em seguida, efetuou-se uma centrifugação por 15 minutos a 13000xg. O precipitado sedimentado, obtido após essa centrifugação foi dissolvido em 100 ml de tampão (TrisHCl a 50 mM, pH 8, CaCl₂ a 1 mM), antes de acrescentar proteinase K até uma concentra-

ção final de 100 µg/ml e incubar a solução por 2 horas a 42°C. Seguiu-se uma incubação por 10 minutos a 95°C. Novamente foi acrescentado NaCl a essa solução até uma concentração final de 1%. Após a dissolução do NaCl, realizou-se mais uma precipitação, através da adição do volume duplo de etanol, boa mistura e incubação por cerca de 96 horas a -20°C. Em seguida, realizou-se uma centrifugação por 15 minutos a 13000xg. O precipitado sedimentado, obtido após essa centrifugação foi dissolvido em 30 ml de água (desmineralizada, condutibilidade $\geq 18 \text{ M}\Omega$) e outra vez adicionado com NaCl até uma concentração final de 1%. Através da adição do volume duplo de etanol, boa mistura e incubação durante a noite a -20°C, realizou-se uma nova precipitação. O precipitado obtido após uma centrifugação por 15 minutos a 13000xg, foi dissolvido em 20 ml de água (desmineralizada, condutibilidade $\geq 18 \text{ M}\Omega$).

Uma outra purificação foi efetuada por meio de filtração por centrifugação. Para isso, em cada caso 5 ml do precipitado dissolvido foram colocados em um filtro de membrana (CentriconAmicon, largura dos poros 10000 NMWL, Prod. n° UCF8 010 96) e centrifugados a 2200xg por tanto tempo, até restarem ainda cerca de 3 ml da solução acima do filtro. Em seguida, acrescentaram-se ainda 2 vezes em cada caso 3 ml de água (desmineralizada, condutibilidade $\geq 18 \text{ M}\Omega$) à solução encontrada sobre a membrana e em cada caso centrifugou-se outra vez com as mesmas condições, até que ao final, ainda restassem cerca de 3 ml da solução acima do filtro. As soluções presentes ainda sobre a membrana após a filtração por centrifugação foram removidas e a membrana ainda foi lavada várias vezes (três a cinco vezes) com cerca de 1,5 ml de água (desmineralizada, condutibilidade $\geq 18 \text{ M}\Omega$). Todas as soluções e as soluções de lavagem ainda presentes sobre a membrana são combinadas, adicionadas com NaCl até uma concentração final de 1%, após a dissolução do NaCl são providas com o volume duplo de etanol, misturadas e precipitadas durante a noite mediante armazenamento a -20°C. O precipitado obtido após uma centrifugação por 15 minutos a 13000xg foi dissolvido em 4 ml de água (desmineralizada, condutibilidade $\geq 18 \text{ M}\Omega$) e em seguida, liofilizado (24 horas com uma pressão de

0,037 KPa (0,37 mbar), instalação de liofilização Christ Alpha 1-4, Firma Christ, Osterode).

4. Comprovação de Hialuronano e Determinação do Teor de Hialuronano

A comprovação de hialuronano foi efetuada com auxílio de um teste que pode ser adquirido no comércio (kit de teste de ácido hialurônico (HA) da firma Corgenix, Inc., Colorado, EUA, Prod. nº 029-001) conforme os dados do fabricante, que através de referência são admitidos, por este meio, como objetivo no relatório descritivo. O princípio do teste baseia-se na disponibilidade de uma proteína que se liga especificamente ao hialuronano (HABP) e é efetuado de modo semelhante a um ELISA, em que uma reação colorida indica o teor de hialuronano na amostra pesquisada. Portanto, as amostras a serem medidas devem ser aplicadas para a determinação quantitativa de hialuronano em uma tal concentração (por exemplo: diluição da respectiva amostra ou utilização de menos água para a extração de hialuronano de tecido vegetal, dependendo se um valor limite foi ultra- ou infrapassado), que elas se encontram dentro dos limites indicados.

Em preparações paralelas, alíquotas das amostras a serem determinadas foram inicialmente submetidas a uma digestão de hialuronano, antes de terem sido medidas com o teste que pode ser adquirido no comércio (kit de teste de ácido hialurônico (HA) da firma Corgenix, Inc., Colorado, EUA, Prod. nº 029-001). A digestão de hialuronano foi efetuada com 400 µl de extrato de tubérculos de batata em tampão de hialuronidase (tampão de potássio fósforo a 0,1 M, pH 5,3, NaCl a 150 mm) mediante adição de 5 µg (~ 3 unidades) de hialuronidase (Hialuronidase Tipo III de Sigma, Prd. Nr. H2251), com uma incubação de 30 minutos a 37°C. Em seguida, todas as amostras foram aplicadas em cada caso em uma diluição de 1:10 para a determinação do teor de hialuronano.

5. Determinação da Atividade de uma UDP-Glc-DH

A determinação da atividade de uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH é efetuada tal como descrito por Spicer et al. (1998, J. Bacteriol. 273 (39), 25117-25124.

Exemplos

1. Produção do Votor de Expressão Vegetal IR 47-71

O plasmídeo pBinAr é um derivado do plasmídeo do vetor binário pBin19 (Bevan, 1984, Nucl. Acid Res 12: 8711-8721), que foi construído da seguinte maneira:

5 um fragmento longo com 529 p.b., que abrange os nucleotídeos 6909-7437 do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, foi isolado como fragmento EcoR I / Kpn I do plasmídeo pDH51 (Pietrzak et al., 1986 Nucleic Acids Res. 14, 5858) e ligado entre os locais de corte de restrição EcoR I e Kpn I do poliligador de pUC18. Com isso, forma-se o plasmídeo 10 pUC18-35S. A partir do plasmídeo pAGV40 (Herrera-Estrella et al., 1983 Nature, 303, 209-213), com auxílio das endonucleases de restrição Hind III e Pvu II, foi isolado um fragmento comprido com 192 p.b., que abrange o sinal de poliadenilação (extremidade 3') do gene octopina sintase (gene 3) do T-DNA do plasmídeo Ti pTiACH5 (Gielen et al., 1984, EMBO Journal 3, 835- 15 846) (Nucleotide 11749-11939). Após a adição de ligantes Sph I ao ponto de corte Pvu II, o fragmento foi ligado entre os pontos de corte Sph I e Hind III de pUC18-35S. Disto resulta o plasmídeo pA7. Aqui, todo o poliligador contendo o promotor 35S e terminador Ocs com EcoR I e Hind III foi recortado e ligado no votor pBin19 correspondentemente cortado. Com isso, formou-se o 20 votor de expressão vegetal pBinAr (Höfgen e Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230).

O promotor do gene patatina B33 de *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., 1989, EMBO J. 8, 23-29) foi ligado como fragmento Dra I (nucleotídeos -1512- +14) no votor pUC19 cortado com Sst I, cujas extremidades foram alisadas com auxílio da T4-DNA polimerase. Disto formou-se o 25 plasmídeo pUC19-B33. Deste plasmídeo foi recortado o promotor B33 com EcoR I e Sma I e ligado no votor pBinAr correspondentemente cortado. Daí formou-se o votor de expressão vegetal pBinB33.

Para facilitar outros estágios de clonagem, o MCS (Multiple Cloning Site) foi ampliado. Para isso, foram sintetizados dois oligonucleotídeos complementares, aquecidos por 5 minutos a 95°C, lentamente resfriados à 30 temperatura ambiente, para possibilitar uma boa fixação (enrijecimento) e

clonar nos pontos de corte Sal I e Kpn I de pBinB33. Os oligonucleotídeos utilizados para esse fim apresentaram a seguinte sequência:

5'-TCg ACA ggC CTg gAT CCT TAA TTA AAC TAg TCT CgA ggA gCT Cgg TAC-3'

5 5'-CgA gCT CCT CgA gAC TAg TTT AAT TAA ggA TCC Agg CCT g-3'

O plasmídeo obtido foi designado com IR 47-71.

2. Produção do Vetor de Expressão Vegetal pBinARHyg

O fragmento, contendo o promotor 35S, o terminador Ocs e todo o Sítio de Clonagem Múltipla foi recortado por meio das endonucleases de restrição EcoR I e Hind III do pA7 e clonado com no vetor pBIBHyg cortado com as mesmas endonucleases de restrição (Becker, 1990, Nucleic Acids Res. 18, 203). O plasmídeo obtido foi designado com pBinARHyg.

3. Síntese de Moléculas de Ácido Nucléico

a) Síntese de moléculas de ácido nucleico que codificam uma hialuronano sintase do vírus *Paramecium bursaria Chlorella* 1.

A sequência de ácido nucleotídeo, que codifica uma hialuronano sintase do vírus *Paramecium bursaria Chlorella* 1, foi sintetizada pela firma Medigenomix GmbH (Munique, Alemanha) e clonada no vetor pCR2.1 da Firma Invitrogen (Prod. nº K2000-01). O plasmídeo obtido foi designado com

20 IC 323-215. A sequência de ácido nucleico sintética, que codifica a proteína HAS do vírus *Paramecium bursaria Chlorella* 1, é representada sob SEQ ID nº 3. A sequência de ácido nucleico correspondente, originalmente isolada do vírus *Paramecium bursaria Chlorella* 1, é representado sob SEQ ID nº 1.

b) Síntese de moléculas de ácido nucleico que codificam uma proteína com 25 a atividade de uma UDP-Glc-DH do vírus *Paramecium bursaria Chlorella* 1.

A sequência de ácido nucleico, que codifica uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH do vírus *Paramecium bursaria Chlorella* 1, foi sintetizada pela Firma Entelechon GmbH e clonada no vetor pCR4Topo da Firma Invitrogen (Prod. nº K4510-20). O plasmídeo obtido foi designado com

30 IC 339-222. A sequência de ácido nucleico sintética que codifica a proteína UDP-Glc-DH do vírus *Paramecium bursaria Chlorella* 1, é representada sob SEQ ID nº 6. A sequência de ácido nucleico correspondente, originalmente

isolada do vírus *Paramecium bursaria Chlorella 1*, é representada sob SEQ ID nº 4.

4. Produção do vetor de expressão vegetal IC 341-222, que abrange uma sequência de ácido nucleico codificadora para uma hialuronano sintase do

5 vírus *Paramecium bursaria Chlorella 1*.

A partir do plasmídeo IC 323-215, por meio de digestão de restrição com BamH I e Xho I, foram isoladas moléculas de ácido nucleico, que abrangem a sequência codificadora da hialuronano sintase e clonadas nos pontos de corte BamH I e Xho I do plasmídeo IR 47-71. O vetor de expressão vegetal obtido foi designado com IC 341-222.

5. Produção do vetor de expressão vegetal IC 349-222, que abrange sequências de ácido nucleico codificadoras para uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH do vírus *Paramecium bursaria Chlorella 1*.

A partir do plasmídeo IC 339-222, por meio de digestão de restrição com BamH I e Kpn I, foram isoladas moléculas de ácido nucleico, que abrangem a sequência codificadora para uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH do vírus *Paramecium bursaria Chlorella 1* e clonadas no plasmídeo pA7 cortado pelas mesmas endonucleases de restrição. O plasmídeo obtido foi designado com IC 342-222. Do plasmídeo IC 342-222, por meio de digestão de restrição com Xba I e Kpn I foram isoladas moléculas de ácido nucleico, que abrangem a sequência codificadora para uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH do vírus *Paramecium bursaria Chlorella 1* e clonadas no vetor de expressão pBinAr Hyg cortado com Xba I e Kpn I. O plasmídeo obtido foi designado com IC 349-222.

25 6. Transformação de plantas, com vetores de expressão vegetal que contêm moléculas de ácido nucleico, que codificam uma hialuronano sintase.

Plantas de batata (cv Désirée) foram transformadas com o vetor de expressão vegetal IC 341-222, que contém uma sequência de ácido nucleico codificadora para uma hialuronano sintase do vírus *Paramecium bursaria Chlorella 1* com o controle do promotor do gene patatina B33 de *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., 1989, EMBO J. 8, 23-29) de acordo com o método mencionado sob métodos gerais ponto 1. As plantas de batata

transgênicas obtidas, que foram transformadas com o plasmídeo IC 341-222, foram designadas com 365 ES.

7. Análise das plantas transgênicas, que foram transformadas com vetores de expressão vegetais, que abrangem moléculas de ácido nucleico, que codificam uma hialuronano sintase.

a) Criação de uma Série de Calibração

Uma série de calibração foi criada com a utilização das soluções padronizadas que acompanham o kit de teste comercial (Kit de Teste Ácido Hialurônico (HA) da Firma Corgenix, Inc., Colorado, EUA, prod. nº 029-001), de acordo com os processos mencionados pelo fabricante. Para a determinação da extinção de 1600 ng/ml de hialuronano, foi empregada a quantidade dupla, em relação à quantidade determinada pelo fabricante, do padrão acompanhante, contendo 800 ng/ml de hialuronano. Foram efetuadas três séries de medição cada independentes e determinado o respectivo valor médio. Foi obtida a seguinte série de calibração:

Concentração de hialuronano	Medições individuais independentes			Valor médio	Stabw
	E _{450nm}	E _{450nm}	E _{450nm}		
0 ng/ml	0,100	0,096	0,096	0,097	0,002
50 ng/ml	0,224	0,183	0,222	0,210	0,023
100 ng/ml	0,396	0,263	0,377	0,345	0,072
200 ng/ml	0,554	0,443	0,653	0,550	0,105
500 ng/ml	1,231	0,850	1,221	1,101	0,217
800 ng/ml	1,465	1,265	1,795	1,508	0,268
1600 ng/ml	2,089	2,487	3,170	2,582	0,547

Tabela 3: Valores de medição para a determinação de uma curva de calibração para a determinação quantitativa do teor de hialuronano no tecido vegetal. Com auxílio do software (Microsoft Office Excel 2002, SP2), os valores de medição obtidos foram registrados em um diagrama e determinada a equação em função da tendência linha de (vide figura 1). E_{450nm} designa a extinção com um comprimento de onda de 450 nm, Des. Pad. designa o desvio padrão do valor médio calculado dos valores individuais.

b) Análise de tubérculos de batata, das linhas 365 ES

Plantas individuais da linha 365 ES foram cultivadas em terra na estufa em vasos de 6 cm. Cerca de 0,3 g de material de tubérculos de batata das plantas individuais foi processado em cada caso de acordo com o método descrito sob métodos gerais ponto 2. A quantidade do hialuronano contido nos respectivos extratos de plantas, foi determinado com o método descrito sob métodos gerais ponto 4 e com auxílio da curva de calibração representada no exemplo 7a) e figura 1. Nesse caso, o sobrenadante obtido após a centrifugação foi utilizado em uma diluição de 1:10 para a determinação do teor de hialuronano. Para plantas selecionadas foram obtidos os seguintes resultados:

Designação da planta	Peso do material de planta aplicado [g]	Extinção E450	Quantidade de hialuronano	Hialuronano em relação ao peso fresco do material de planta [$\mu\text{g/g}$]
365 ES 13	0,297	2,746	14038	47
365 ES 74	0,306	4,000	20816	68
Tipo silvestre	0,305	0,111	n.d.	n.d.

Tabela 4: Quantidade de hialuronano (em μg de hialuronano por grama de peso fresco), que foi produzido por plantas transgênicas selecionadas, independentes, da linha 365 ES. A coluna 1 designa a planta, da qual foi colhido material de tubérculo („tipo silvestre” designa, nesse caso, plantas, que não são transformadas, no entanto, apresentam o genótipo, que foi utilizado como material de partida para a transformação). A coluna 2 indica a quantidade do material de tubérculo, que foi aplicado para a determinação do teor de hialuronano. A coluna 3 contém a extinção medida de uma diluição 1:10 do respectivo extrato de planta. A coluna 4 foi calculada com auxílio da equação linear de regressão (vide figura 1) considerando-se o fator de diluição, tal como segue: $((\text{valor coluna 3} - 0,149)/0,00185) \times 10$. Coluna 5 indica a quantidade do hialuronano em relação ao peso seco aplicado e foi calculada tal como segue: $(\text{valor coluna 4} / \text{valor coluna 2}) / 1000$. „n.d.” designa quantidades não comprováveis.

8. Transformação de plantas, que sintetizam hialuronano, com vetores de expressão vegetais, que abrangem sequências de ácido nucleico codificadoras para uma proteína com a atividade de uma UDP-Glc-DH.

Plantas de batata das linhas 365 ES 13 e 365 ES 74 foram
5 transformadas, em cada caso, com o vetor de expressão vegetal 349-222,
de acordo com o método indicado sob métodos gerais ponto 1.

REIVINDICAÇÕES

1. Célula de planta geneticamente modificada, que apresenta uma molécula de ácido nucleico integrada de maneira estável em seu genoma, que codifica uma hialuronano sintase, caracterizada pelo fato de que a célula de planta mencionada apresenta adicionalmente uma atividade aumentada de uma proteína com a atividade de uma UDP-glicose-desidrogenase (UDP-Glc-DH), em comparação com células de plantas de tipo silvestre correspondentes não geneticamente modificadas.
2. Célula de planta geneticamente modificada de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a atividade aumentada de uma proteína com a atividade de uma UDP-glicose-desidrogenase (UDP-Glc-DH) é causada pela introdução de uma molécula de ácido nucleico estranha na célula da planta.
3. Célula de planta geneticamente modificada de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a molécula de ácido nucleico estranha codifica uma proteína com a atividade de uma UDP-glicose-desidrogenase (UDP-Glc-DH).
4. Célula de planta geneticamente modificada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que sintetiza uma quantidade aumentada de hialuronano em comparação com células de plantas, que apresentam a atividade de uma hialuronano sintase e não apresentam uma atividade aumentada de uma UDP-glicose-desidrogenase (UDP-Glc-DH).
5. Planta, caracterizada pelo fato de que contem células de plantas geneticamente modificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.
6. Material de reprodução de plantas como definido na reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que contem células de plantas geneticamente modificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.
7. Partes de plantas colhíveis de plantas como definidas na reivindicação 5, caracterizadas pelo fato de que contem como definidas em

qualquer células de plantas geneticamente modificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

8. Processo para a produção de uma planta, que sintetiza hialuronano, caracterizado pelo fato de que

- 5 a) uma célula de planta, é geneticamente modificada, sendo que a modificação genética abrange os seguintes estágios i até ii:
ii: i) introdução de uma molécula de ácido nucleico estranha, que codifica uma hialuronano sintase na célula de planta
10 ii) introdução de uma modificação genética na célula da planta, sendo que a modificação genética leva ao aumento da atividade de uma proteína com a atividade enzimática de uma UDP-glicose-desidrogenase (UDP-Glc-DH) em comparação com células de plantas de tipo silvestre correspondentes não geneticamente modificadas,
15 em que os estágios i até ii podem ser efetuados na ordem desejada, individualmente ou combinações desejadas dos estágios i até ii podem ser efetuadas simultaneamente
 b) uma planta é regenerada de células de plantas do estágio a);
20 c) eventualmente outras plantas são produzidas com auxílio das plantas de acordo com o estágio b), em que células de plantas eventualmente obtidas de plantas do estágio b) ou b) ii são isoladas e os estágios dos processos a) até c) são repetidos por tanto tempo, até ser produzida uma planta, que apresenta uma molécula de ácido nucleico estranha, que codifica uma hialuronano sintase e que apresenta uma atividade aumentada de uma proteína com a atividade enzimática de uma GFAT em comparação com células de plantas de tipo silvestre correspondentes não geneticamente modificadas.

9. Processo para a produção de hialuronano, caracterizado pelo fato de que abrange o estágio da extração de hialuronano de células de plantas geneticamente modificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, de plantas como definidas na reivindicação 5, de mate-

rial de reprodução como definida na reivindicação 6, de partes de plantas colhíveis como definidas na reivindicação 7 ou de plantas obteníveis conforme um processo como definida na reivindicação 8.

10. Uso de uma célula de planta geneticamente modificada como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, de uma planta como definida na reivindicação 5, de material de reprodução como definida na reivindicação 6, de partes de plantas colhíveis como definidas na reivindicação 7 ou de plantas, obteníveis conforme um processo de acordo com a reivindicação 8 o referido uso caracterizado pelo fato de que é para a produção de hialuronano.

11. Composição caracterizada pelo fato de que contém células de plantas geneticamente modificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

12. Processo para a produção de uma composição contendo hialuronano, caracterizado pelo fato de que são utilizadas células de plantas geneticamente modificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, plantas como definidas na reivindicação 5, material de reprodução como definido na reivindicação 6, partes de plantas colhíveis como definidas na reivindicação 7 ou plantas obteníveis conforme um processo como definido na reivindicação 8.

13. Uso de células de plantas geneticamente modificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, de uma planta como definida na reivindicação 5, de material de reprodução como definidas na reivindicação 6, de partes de plantas colhíveis de acordo com a reivindicação 7 ou de plantas, obteníveis conforme um processo com definido na reivindicação 8 o referido uso caracterizado pelo fato de que é para a produção de uma composição como definida na reivindicação 11.

RESUMO

Patente de Invenção: "CÉLULA DE PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA, USO DA MESMA, PLANTA, PROCESSO PARA PRODUÇÃO DA MESMA, MATERIAL DE REPRODUÇÃO DE PLANTAS, PARTES DE 5 PLANTAS COLHÍVEIS, PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE HIALURO-NANO, COMPOSIÇÃO, BEM COMO SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO".

A presente invenção refere-se a células de plantas e plantas, que sintetizam uma quantidade aumentada de hialuronano, bem como processos para a produção dessas plantas, como também processos para a 10 produção de hialuronano com auxílio dessas células de plantas ou plantas. Nesse caso, as células de plantas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas apresentam a atividade de uma hialuronano sintase e, adicionalmente, uma atividade aumentada de uma UDP-glicose-desidrogenase (UDP-Glc-DH) em comparação com células de plantas de 15 tipo silvestre ou plantas de tipo silvestre. Além disso, a presente invenção refere-se à utilização de plantas com síntese de hialuronano aumentada para a produção de hialuronano e alimentos ou forragens, que contêm hialuronano.