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

(21) **PI0616845-0 A2**

BRPI0616845A2

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

(51) Int.Cl.:
C12N 15/82 2006.01
C12N 9/10 2006.01

(54) Título: **PLANTAS COM PRODUÇÃO DE HIALURONAN AUMENTADA**

(30) Prioridade Unionista: 05/10/2005 EP 05 090279.0, 11/10/2005 US 60/725,388

(73) Titular(es): BAYER CROPSCIENCE AG

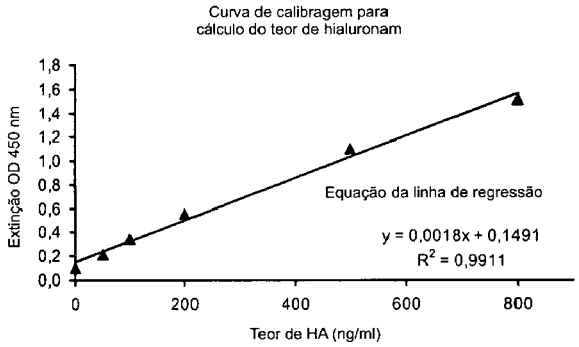
(72) Inventor(es): BERND ESSIGMANN, CLAUS FROHBER

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

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006009773 de 05/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/039314de 12/04/2007

(57) Resumo: PLANTAS COM PRODUÇÃO DE HIALURONAN AUMENTADA. A presente invenção refere-se a células de planta e plantas que sintetizam uma quantidade aumentada de hialuronan e a métodos para preparação de tais plantas, e também a métodos para preparação de hialuronan com o auxílio dessas células de planta ou plantas. Aqui, células de planta ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção têm atividade de hialuronan sintase e adicionalmente uma atividade de glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT) aumentada comparado com células de planta do tipo selvagem ou plantas do tipo selvagem. A presente invenção refere-se ainda ao uso de plantas tendo síntese de hialuronan aumentada para preparação de hialuronan e alimento e ração contendo hialuronan.



PI0616845-0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PLANTAS COM PRODUÇÃO DE HIALURONAN AUMENTADA".**

A presente invenção refere-se a células de planta e plantas que sintetizam uma quantidade aumentada de hialuronan, e a métodos para preparação de tais plantas, e também a métodos para preparação de hialuronan com auxílio dessas células de planta ou plantas. Aqui, células de planta ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção têm atividade de hialuronan sintase e adicionalmente uma atividade de glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT) aumentada comparado com células de planta do tipo selvagem ou plantas do tipo selvagem. A presente invenção refere-se ainda ao uso de plantas tendo síntese de hialuronan aumentada para preparação de hialuronan e alimento ou ração contendo hialuronan.

O Hialuronan é um mucopolissacarídeo linear, não-ramificado, (glicosaminoglucano) que é construído de moléculas alternadas de ácido glucurônico e N-acetil-glicosamina. O bloco de formação principal do hialuronan consiste no dissacarídeo ácido glucurônico-beta-1,3-N-acetil-glicosamina. Em hialuronan, essas unidades de repetição são ligadas umas às outras através de ligações beta-1,4. Em Farmácia, uso é freqüentemente feito do termo ácido hialurônico. Uma vez que hialuronan está na maioria dos casos presente como um poliânion e não como o ácido livre, aqui abaixo, o termo hialuronan é de preferência usado, mas cada termo deve ser entendido como compreendendo ambas formas moleculares.

O hialuronan tem propriedades físico-químicas incomuns, tal como, por exemplo, propriedades de polieletrólito, propriedades viscoelásticas, uma alta capacidade de ligar água, propriedades de formação de gel, que, em adição a propriedades adicionais do hialuronan, são descritas em um artigo de revisão de Lapcik e outros (1998, *Chemicals Reviews* 98(8), 2663-2684).

O hialuronan é um componente de tecido conectivo extracelular e fluidos do corpo de vertebrados. Em humanos, o ácido hialurônico é sintetizado pela membrana celular de todas as células do corpo, especialmente células mesenquimais, e ubiquitariamente presente no corpo com uma con-

centração particularmente alta nos tecidos conectivos, na matriz extracelular, no cordão umbilical, no fluido da junta, no tecido cartilaginoso, na pele e no corpo vítreo do olho (Bernhard Gebauer, 1998, Inaugural-Dissertation, Virchow-Klinikum Medizinische Fakultät Charité der Humboldt Universität zu Berlin; Fraser e outros, 1997, *Journal of International Medicine* 242, 27-33). Recentemente, o hialuronan foi encontrado em organismos animais não-vertebrados (moluscos) (Volpi e Maccari, 2003, *Biochimie* 85, 619-625). Ainda, algumas bactérias gram-positivas patogênicas (*Streptococcus* grupos A e C) e bactérias gram-negativas (*Pasteurella*) sintetizam hialuronan como exopolissacarídeos que protegem essas bactérias contra ataque pelo sistema imune de seu hospedeiro, uma vez que hialuronan é uma substância não-imunogênica. Vírus que infectam algas verdes de célula única do gênero *Chlorella*, alguns dos quais estão presentes como endossimbiontes em espécies *Paramecium*, conferem às algas verdes de célula única a habilidade em sintetizar hialuronan após infecção pelo vírus (Graves e outros, 1999, *Virology* 257, 15-23). No entanto, a habilidade em sintetizar hialuronan não é uma característica que caracterize as algas em questão. A habilidade das algas em sintetizar hialuronan é mediada por uma infecção com um vírus cujo genoma tem uma seqüência codificando hialuronan sintase (DeAngelis, 1997, *Science* 278, 1800-1803). Ainda, o genoma do vírus contém seqüências codificando uma glutamina: frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT). GFAT converte frutose 6-fosfato e glutamina em glicosamina 6-fosfato que é um metabólito importante no curso metabólico de síntese de hialuronan. Ambos genes codificam proteínas ativas que, tal como a hialuronan sintase do vírus, são transcritas simultaneamente na fase inicial da infecção viral (DeAngelis e outros, 1997, *Science* 278, 1800-1803, Graves e outros, 1999, *Virology* 257, 15-23). A atividade de uma proteína tendo atividade de glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT) não pôde ser detectada nem em extratos de células não-infectadas por um vírus nem em células infectadas com vírus (Landstein e outros, 1998, *Virology* 250, 388-396). Deste modo, o papel da expressão de GFAT em células de *Chlorella* infectadas com vírus para a síntese de hialuronan, e se elas são requeridas para sínte-

se de hialuronan, não é conhecido. As próprias plantas de ocorrência natural não têm quaisquer ácidos nucléicos em seu genoma que codifiquem proteínas catalisando a síntese de hialuronan e, embora um grande número de carboidratos de planta tenha sido descrito e caracterizado, não foi até agora possível detectar hialuronan ou moléculas relacionadas com hialuronan em plantas não-infectadas (Graves e outros, 1999, *Virology* 257, 15-23).

A catálise da síntese de hialuronan é realizada por uma enzima integrada à membrana ou associada à membrana única, hialuronan sintase. As hialuronan sintases que foram até agora estudadas podem ser classificadas em dois grupos: hialuronan sintases de Classe I e hialuronan sintases de Classe II (DeAngelis, 1999, *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences* 56, 670-682). As hialuronan sintases de vertebrados são distinguidas mais pelas isoenzimas identificadas. As isoenzimas diferentes são referidas na ordem de sua identificação usando números arábicos (por exemplo, hsHAS1, hsHAS2, hsHAS3).

O mecanismo da transferência de moléculas de hialuronan sintetizado através da membrana do citoplasma para o meio circundando a célula não foi ainda completamente elucidado. Hipóteses anteriores supunham que transporte através da membrana celular fosse realizado pela própria hialuronan sintase. No entanto, resultados mais recentes indicam que o transporte de moléculas de hialuronan através da membrana do citoplasma acontece através de transporte dependente de energia através de proteínas de transporte responsáveis por esta ação. Deste modo, cepas de *Streptococcus* foram geradas através de mutação onde a síntese de uma proteína de transporte ativa foi inibida. Essas cepas sintetizaram menos hialuronan do que as cepas bacterianas do tipo selvagem correspondentes (Ouskova e outros, 2004, *Glycobiology* 14(10), 931-938). Em fibroblastos humanos foi possível demonstrar, com o auxílio de agentes especificamente inibindo proteínas de transporte conhecidas, que é possível reduzir ambos a quantidade de hialuronan produzida e a atividade das hialuronan sintases (Prehm e Schumacher, 2004, *Biochemical Pharmacology* 68, 1401-1410). Em qual quantidade, se alguma, proteínas de transporte capazes de transporte de

hialuronan estão presentes em planta não é conhecida.

As propriedades incomuns de hialuronan oferecem uma riqueza de possibilidades para aplicação em vários campos, tal como, por exemplo, farmácia, na indústria cosmética, na produção de alimento e ração, em aplicações técnicas (por exemplo, como lubrificantes), etc. As aplicações mais importantes onde hialuronan está atualmente sendo usado são nos campos medicinal e cosmético (vide, por exemplo, Lapcik e outros, 1998, *Chemical Reviews* 98(8), 2663-2684, Goa e Benfield, 1994, *Drugs* 47(3), 536-566).

No campo médico, produtos contendo hialuronan são atualmente usados para o tratamento intra-articular de artrose e em oftálmicos usados para cirurgia do olho. Hialuronan é também usado para tratamento de distúrbios da junta em cavalos de raça. Ainda, ácido hialurônico é um componente de alguns rinológicos que, por exemplo, na forma de gotas para o olho e nasais, servem para umidificar as membranas mucosais secas. Soluções contendo hialuronan para injeção são usadas como analgésicos e antireumáticos. Emplastros compreendendo hialuronan ou hialuronan derivatizado são empregados em cicatrização de ferida. Como dermáticos, implantes em gel contendo hialuronan são usados para correção de deformações da pele em cirurgia plástica. Para aplicações farmacológicas, preferência é dada ao uso de hialuronan tendo um peso molecular alto. Em medicina cosmética, preparações de hialuronan estão dentre os materiais de carga de pele mais adequados. Através da injeção de hialuronan, por um período de tempo limitado, é possível suavizar rugas ou aumentar o volume dos lábios. Em produtos cosméticos, em particular em cremes e loções para a pele, hialuronan é freqüentemente usado como umidificante em virtude de sua capacidade de ligação com água grande.

Ainda, preparações contendo hialuronan são vendidas como os chamados nutracêuticos (suplementos alimentares) que podem ser também usados em animais (por exemplo, cachorros, cavalos) para a profilaxia e alívio de artrose.

Hialuronan usado para propósitos particulares é atualmente isolado de tecidos animais (*"roostercombs"*) ou preparado fermentativamente

usando culturas bacterianas. A US 4.141.973 descreve um processo para isolamento de hialuronan de *"roostercombs"* ou alternativamente de cordões umbilicais. Em adição a hialuronan, tecidos animais (por exemplo, *"roostercombs"*, cordões umbilicais) também contêm mucopolissacarídeos relacionados a hialuronan, tal como sulfato de condroitina, dermatan sulfato, queratan sulfato, heparan sulfato e heparina. Ainda, organismos animais contêm proteínas (hialadreninas) que se ligam especificamente a hialuronan e que são requeridas para as mais diferentes funções no organismo, tal como, por exemplo, a degradação de hialuronan no fígado, a função do hialuronan como estrutura principal para migração celular, a regulagem de endocitose, o ancoramento de hialuronan na superfície celular ou a formação de redes de hialuronan (Turley, 1991, *Adv Drug Delivery Rev* 7, 257 ff.; Laurent and Fraser, 1992, *FASEB J.* 6, 183 ff.; Stamenkovic and Aruffo, 1993, *Methods Enzymol.* 245, 195 ff; Knudson e Knudson, 1993, *FASEB 7*, 1233 ff.).

As cepas de *Streptococcus* usadas para a produção bacteriana de hialuronan são exclusivamente bactérias patogênicas. Durante cultivo, essas bactérias produzem exotoxinas (pirogênicas) e hemolisinas (estreptolisina (em particular alfa- e beta-hemosilina) (Kilian, M.: *Streptococcus and Enterococcus.* Em: *Medical Microbiology.* Greenwood, D.; Slack, RCA; Peutherer, J.F. (Eds.). Capítulo 16. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK: pp. 174-188, 2002, ISBN 0443070776) que são liberadas no meio de cultura. Isto torna purificação e isolamento do hialuronan preparado com o auxílio de cepas *Streptococcus* mais difíceis. Em particular para aplicação farmacêutica, a presença de exotoxinas e hemolisinas na preparação é um problema. A US 4.801.539 descreve a preparação de hialuronan através de fermentação de uma cepa bacteriana mutagenizada (*Streptococcus zooedemicus*). A cepa bacteriana mutagenizada usada não sintetiza mais beta-hemolisina. O rendimento conseguido foi 3,6 g de hialuronan por litro de cultura. A EP 0694616 descreve um método para cultivo de *Streptococcus zooedemicus* ou *Streptococcus equi*, onde, sob as condições de cultura empregadas, nenhuma estreptolisina, mas quantidades aumentadas de hialuronan são sintetizadas. O rendimento obtido foi de 3,5 g de hialuronan por litro de cultura.

Durante cultivo, cepas de *Streptococcus* liberam a enzima hialuronidase no meio de cultura, como uma conseqüência do que, neste sistema de produção, também, o peso molecular é reduzido durante a purificação. O uso de cepas de *Streptococcus* negativas para hialuronidase ou de métodos para a produção de hialuronan onde a produção de hialuronidase durante cultivo é inibida são descritos na US 4.782.046. O rendimento obtido foi até 2,5 g de hialuronan por litro de cultura, e o peso molecular médio máximo atingido foi $3,8 \times 10^6$ Da, em uma distribuição de peso molecular de a partir de $2,4 \times 10^6$ a $4,0 \times 10^6$. A US 20030175902 e o WO 03 054163 descrevem a preparação de hialuronan com o auxílio de expressão heteróloga de uma hialuronan sintase de *Streptococcus equisimilis* em *Bacillus subtilis*. Para conseguir a produção de quantidades suficientes de hialuronan, em adição à expressão heteróloga de uma hialuronan sintase, expressão simultânea de uma UDP-glicose desidrogenase nas células *Bacillus* é também requerida. A US 20030175902 e o WO 03 054163 não declaram a quantidade absoluta de hialuronan obtido na produção com o auxilio de *Bacillus subtilis*. O peso molecular médio máximo obtido foi cerca de $4,2 \times 10^6$. No entanto, este peso molecular médio foi apenas obtido para a cepa de *Bacillus* recombinante onde um gene codificando o gene de hialuronan sintase de *Streptococcus equisimilis* e o gene codificando a UDP-glicose desidrogenase de *Bacillus subtilis* foram integrados no genoma de *Bacillus subtilis* sob o controle do promotor *amy*Q, onde ao mesmo tempo o gene *cxpY* endógeno de *Bacillus subtilis* (que codifica uma citocroma P450 oxidase) foi inativado.

O WO 05 012529 descreve a preparação de plantas de tabaco transgênicas que foram transformadas usando moléculas de ácido nucléico codificando hialuronan sintases de vírus infectando *Chlorella*. No WO 05 012529, foi feito uso, por outro lado, de seqüências de ácido nucléico codificando hialuronan sintase da cepa do vírus de *Chlorella* CVH1 e, por outro lado, da cepa do vírus de *Chlorella* CVKA1 para transformação de plantas de tabaco. A síntese de hialuronan poderia ser apenas demonstrada para uma planta transformada com um ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase isolada da cepa do vírus de *Chlorella* CVKA1. Para plantas de tabaco

transformadas com uma seqüência de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase isolada de cepa de vírus de *Chlorella* CVHI1, não foi possível detectar síntese de hialuronan nas plantas transgênicas correspondentes. A quantidade de hialuronan sintetizado pela única planta de tabaco transgênica produtora de hialuronan no WO 05 012529 é declarada como sendo cerca de 4,2 µg de hialuronan por ml de volume medido que, levando em conta a descrição para realizar o experimento em questão, corresponde aproximadamente a uma quantidade de no máximo 12 µg de hialuronan produzido por grama de peso fresco de material de planta.

Hialuronan sintase catalisa a síntese de hialuronan a partir dos materiais de partida UDP-N-acetil-glicosamina e UPD-ácido glucorônico. Ambos materiais de partida mencionados estão presentes em células de planta.

Para a síntese de UDP-N-acetil-glicosamina em células de planta, o WO 98 35047 descreve um curso metabólico onde glicosamina é convertida através de várias etapas de reação enzimaticamente catalisada sucessivas com formação dos metabólitos N-acetil-glicosamina, N-acetil-glicosamina 6-fosfato, N-acetil-glicosamina 1-fosfato em UDP-N-acetilglicosamina. Um curso metabólico alternativo compreende uma reação de frutose 6-fosfato e glutamina dando glicosamina 6-fosfato que é subsequentemente convertida por várias etapas de reação enzimaticamente catalisada sucessivas com formação dos metabólitos glicosamina 1-fosfato e N-acetil-glicosamina 1-fosfato em UDP-N-acetilglicosamina. A conversão de frutose 6-fosfato e glutamina em glicosamina 6-fosfato é catalisada por uma proteína tendo atividade de glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT) (Mayer e outros, 1968, *Plant Physiol.* 43, 1097-1107).

O WO 00 11192 descreve a superexpressão específica de endosperma de uma molécula de ácido nucléico de milho codificando uma proteína tendo uma atividade de enzima de uma GFAT em plantas de milho transgênicas com o objetivo de sintetizar um amido catiônico em plantas que tem moléculas de 2-amino-anidroglicose. O curso metabólico descrito que, de acordo com a descrição do WO 00 11192 deve resultar em 2-amino-

anidroglicose sendo incorporada ao amido, compreende *inter alia* a incorporação de UDP-glicosamina através de amido sintases e/ou glicogênio sintases no amido. É declarado que quantidades aumentadas de UDP-glicosamina poderiam ser detectadas em farinha de endosperma das plantas de milho transgênicas em questão superexpressando uma molécula de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT traducionalmente fundida com um peptídeo de sinal de plastídeo. Quando a proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT foi expressa sem peptídeo de sinal, foi possível detectar uma quantidade maior de glicosamina 1-fosfato nas farinhas correspondentes de tecido de endosperma de milho. Não foi possível detectar amido catiônico nas plantas transgênicas.

A produção de hialuronan pela fermentação de cepas bacterianas está associada com custos altos, uma vez que as bactérias têm que ser fermentadas em recipientes estéreis vedados sob condições de cultura controladas caras (vide, por exemplo, US 4.897.349). Ainda, a quantidade de hialuronan que pode ser produzida através de fermentação de cepas bacterianas é limitada pelas instalações de produção presentes em cada caso. Aqui, foi também levado em consideração que fermentadores, como uma conseqüência de leis físicas, não podem ser construídos para volumes de cultura excessivamente grandes. Menção particular pode ser feita aqui de mistura homogênea das substâncias alimentadas do exterior (por exemplo, fontes nutrientes essenciais para bactérias, reagentes para regulagem do pH, oxigênio) com o meio de cultura requerido para produção eficiente que, em fermentadores grandes, pode ser assegurada apenas com gasto técnico grande, se alguma.

A purificação de hialuronan a partir de organismos animais é complicada devido à presença, em tecidos de animal, de outros mucopolissacarídeos e proteínas que especificamente se ligam a hialuronan. Em pacientes, o uso de preparações medicinais contendo hialuronan contaminadas por proteínas animais pode resultar em reações imunológicas indesejadas do corpo (US 4.141.973), em particular se o paciente for alérgico a proteínas animais (por exemplo, ovo de galinha branca). Ainda, as quantidades (ren-

dimentos) de hialuronan que podem ser obtidas de tecidos de animal em qualidade e pureza satisfatórias são baixas (*roosterscomb*: 0,079% p/p, EP 0144019, US 4.782.046), que necessita do processamento de quantidades grandes de tecidos animais. Um problema adicional no isolamento de hialuronan a partir de tecidos animais consiste em efeito que o peso molecular do hialuronan durante a purificação é reduzido uma vez que tecidos animais também contêm uma enzima de degradação de hialuronan (hialuronidase).

Em adição às hialuronidases e exotoxinas mencionadas, cepas de *Streptococcus* também produzem endotoxinas que, quando presentes em produtos farmacológicos, apresentam risco para a saúde do paciente. Em um estudo científico, foi mostrado que mesmo produtos medicinais contendo hialuronan no mercado contêm quantidades detectáveis de endotoxinas bacteriana (Dick e outros, 2003, *Eur. J. Opthalmol.* 13(2), 176-184). Uma desvantagem adicional do hialuronan produzido como auxílio de cepas de *Streptococcus* é o fato de que o hialuronan isolado tem um peso molecular menor do que hialuronan isolado de *"roostercombs"* (Lapcik e outros 1998, *Chemical Reviews* 98(8), 2663-2684). A US 20030134393 descreve o uso de uma cepa de *Streptococcus* para produção de hialuronan que sintetiza uma cápsula de hialuronan particularmente pronunciada (supercapsulada). O hialuronan isolado após fermentação tinha um peso molecular de $9,1 \times 10^6$. No entanto, o rendimento foi apenas 350 mg por litro.

Algumas das desvantagens de produção de hialuronan através de fermentação bacteriana ou através de isolamento de tecidos animais podem ser evitadas através da produção de hialuronan usando plantas transgênicas; no entanto, as quantidades atualmente obtidas de hialuronan que podem ser produzidas usando plantas transgênicas requereriam uma área relativamente grande sob cultivo para produzir quantidades relativamente grandes de hialuronan. Ainda, o isolamento ou purificação de hialuronan a partir de plantas tendo um teor de hialuronan menor é consideravelmente mais complicado e custoso do que o isolamento ou purificação a partir de plantas tendo um teor de hialuronan maior.

Embora hialuronan tenha propriedades incomuns, ele é, devido à sua escassez e ao alto preço, raramente, se de algum modo, usado para aplicações industriais.

Deste modo, é um objeto da presente invenção prover meios e métodos que permitam a provisão de hialuronan em quantidades e qualidade suficientes e que tornem possível prover hialuronan mesmo para aplicações industriais e aplicações no campo de alimento e ração.

Este objetivo é alcançado pelas modalidades descritas nas reivindicações.

Deste modo, a presente invenção refere-se a células de planta geneticamente modificadas ou plantas geneticamente modificadas tendo uma molécula de ácido nucléico, estavelmente integrada ao seu genoma, codificando uma hialuronan sintase, caracterizado pelo fato de que as ditas células de planta ou ditas plantas têm adicionalmente atividade aumentada de uma proteína tendo uma atividade (enzimática) de glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT) comparado com células de planta do tipo selvagem correspondentes não-geneticamente modificadas ou plantas do tipo selvagem não-geneticamente modificadas.

Aqui, a modificação genética de células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção pode ser qualquer modificação genética resultando em uma integração estável de uma molécula de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase em uma célula de planta ou uma planta e aumento da atividade de uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT em células de planta geneticamente modificadas ou plantas geneticamente modificadas, comparado com células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificadas ou plantas do tipo selvagem não-geneticamente modificadas.

No contexto da presente invenção, o termo célula de planta do tipo selvagem deve ser compreendido como significando células de planta que servem como material de partida para a preparação das células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção, isto é, sua infor-

mação genética, sem considerar modificações genéticas introduzidas e resultando em uma integração estável de uma molécula de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase e aumentando a atividade de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT, corresponde àquela de uma célula de planta geneticamente modificada de acordo com a invenção.

No contexto da presente invenção, o termo planta do tipo selvagem deve ser compreendido como significando plantas que serviram como material de partida para a preparação das plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, isto é, sua informação genética, sem considerar as modificações genéticas introduzidas e resultando em uma integração estável de uma molécula de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase e aumentando a atividade de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT, corresponde àquela de uma célula de planta geneticamente modificada de acordo com a invenção.

No contexto da presente invenção, o termo correspondendo significa que quando uma pluralidade de objetos é comparada, os objetos em questão que são comparados uns com os outros foram mantidos sob as mesmas condições. No contexto da presente invenção, o termo correspondendo no contexto de células de planta do tipo selvagem ou plantas do tipo selvagem significa que as células de planta ou plantas comparadas umas com as outras foram cultivadas sob as mesmas condições de cultivo e que elas têm a mesma idade (cultura).

No contexto da presente invenção, o termo hialuronan sintase (EC 2.4.1.212) deve ser compreendido como significando uma proteína que sintetiza hialuronan a partir de substratos UDP-ácido glucorônico (UDP-GlcA) e N-acetil glicosamina (UDP-GlcNAc). A síntese de hialuronan é catalisada de acordo com os esquemas de reação abaixo:

nUDP-GlcA + nUDP-GlcNAc→beta-1,4-[GlcA-beta-1,3-GlcNAc]$_n$ + 2 nUDP

Moléculas de ácido nucléico e seqüências de proteína correspondentes codificando hialuronan sintases foram descritas, *inter alia*, para os organismos que seguem: coelho (*Oryctolagus cuniculus*) ocHas2 (EMBL

AB055978.1, US 20030235893), ocHas3 (EMBL AB055979.1, US 20030235893); babuíno (*Papio anubis*) paHas1 (EMBL AY463695.1); sapo (*Xenopus laevis*) xlHas1 (EMBL M22249.1, US 20030235893), xlHas2 (DG42) (EMBL AF168465.1), xlHas3 (EMBL AY302252.1); humano (*Homo sapiens*) hsHAS1 (EMBL D84424.1, US 20030235893), hsHAS2 (EMBL U54804.1, US 20030235893), hsHAS3 (EMBL AF232772.1, US 20030235893); camundongo (*Mus musculus*), mmHas1 (EMBL D82964.1, US 20030235893), mmHAS2 (EMBL U52524.2, US 20030235893), mmHas3 (EMBL U86408.2, US 20030235893); gado (*Bos taurus*) btHas2 (EMBL AJ004951.1, US 20030235893); galinha (*Gallus gallus*) ggHas2 (EMBL AF106940.1, US 20030235893); rato (*Rattus norvegicus*) rnHas 1 (EMBL AB097568.1, Itano e outros, 2004, *J. Biol. Chem.* 279(18) 18679-18678), rnHas2 (EMBL AF008201.1); rnHas 3 (NCBI NM_172319.1, Itano e outros, 2004, *J. Biol. Chem.* 279(18) 18679-18678), cavalo (*Equus caballus*) e-cHAS2 (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 AF347022.1, AY173078.1), *Streptococcus uberis* suHasA (EMBL AJ242946.2, US 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).

No contexto da presente invenção, o termo glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT) (E.C. 2.6.1.16), na literatura especializada também referida como glicosamina sintase, deve ser compreendido como significando uma proteína que sintetiza, a partir dos substratos glutamina e frutose 6-fosfato (Fruc-6-P), glucosamina 6-fosfato (GlcN-6-P). Esta catálise acontece de acordo com o esquema de reação que segue:

Glutamina + Fruc-6-P→ GlcN-6-P + Glutamato

Em particular em organismos animais, foi possível demonstrar duas isoformas diferentes de proteínas tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT (referida como GFAT-1 e GFAT-2, respectivamente, na literatura). Hu e outros (2004), *J. Biol. Chem.* 279(29), 29988-29993 descrevem diferenças das respectivas proteínas do camundongo: em adição a diferenças na expressão específica de tecido das proteínas em questão tendo a atividade (enzimática) de uma glutamina:frutose 6-fosfato amidrotransferase 1 (GFAT-1) e uma glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase 2 (GFAT 2), foi possível mostrar que ambas isoformas são reguladas por fosforilação por uma proteína cinase dependente de cAMP. A atividade de uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT-1 é inibida pela fosforilação de um resíduo serina conservado (serina 205 na GFAT-1 do camundongo, Nº de Acesso no GenBank: AF334736.1) da seqüência de aminoácido em questão, enquanto a atividade de uma proteína tendo a atividade de GFAT-2 é aumentada pela fosforilação de um resíduo serina conservado (serina 202 na GFAT-2 do camundongo, Nº de Acesso no GenBank: NM_013529) da seqüência de aminoácido em questão. Ambas proteínas tendo a atividade de uma GFAT-1 e proteínas tendo a atividade de uma GFAT-2 são inibidas de uma maneira dependente da concentração pela UDP-N-acetilglicosamina; no entanto, para uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-2, a inibição pela UDP-N-acetilglicosamina é menor (redução máxima de atividade pela UDP-N-acetilglicosamina cerca de 15%) comparado com uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-1 (redução de atividade máxima pela UDP-N-acetilglicosamina cerca de 51% ou 80%). Existem indicações que a inibição de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-1 em organismos animais é baseada no fato de que em concentrações de UDP-N-acetilglicosamina elevadas há uma glicosilação de O-glicose-N-acetilglicosamina das proteínas em questão. Se uma regulagem da atividade de proteínas pela O-glicosilação também acontece em células de planta não é ainda completamente conhecido (Huber e Hardin, 2004, *Current Opinion in Plant Biotechnology* 7, 318-322).

No contexto da presente invenção: o termo glutamina:frutose 6-

fosfato amidotransferase-1 (GFAT-1)deve ser compreendido como significando uma proteína que tem a atividade de uma GFAT e cuja atividade é inibida pela fosforilação por uma proteína cinase dependente de cAMP.

No contexto da presente invenção, o termo glutamina: frutose 6-fosfato amidotransferase-2 (GFAT-2) deve ser compreendido como significando uma proteína que tem a atividade de uma GFAT e que é ativada por fosforilação por uma proteína cinases dependente de cAMP.

No contexto da presente invenção, o termo glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase -2 (GFAT-2) deve ser entendido como uma medida de proteína, a qual apresenta a atividade de um GFAT e, a qual é ativada por fosforilação por uma proteína quinase dependente de CAMP é usado como um termo compreensivo que inclui todas as proteínas tendo a atividade de uma GFAT. Deste modo, ele também compreende proteínas referidas na literatura como glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase-1 (GFAT-1) ou como glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase-2 (GFAT-2), mas não é limitado a essas.

No contexto da presente invenção, o termo atividade aumentada de uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT significa uma expressão aumentada de genes endógenos codificando proteínas tendo a atividade de uma GFAT e/ou uma quantidade aumentada de transcritos codificando proteínas tendo a atividade de uma GFAT e/ou uma quantidade aumentada de proteína tendo a atividade de uma GFAT nas células e/ou uma atividade enzimática aumentada de proteínas tendo a atividade de uma GFAT nas células.

Uma expressão aumentada pode ser determinada, por exemplo, através da medição da quantidade de transcritos codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT, por exemplo, através de análise *Northern blot* ou RT-PCR. Aqui, um aumento de preferência significa um aumento na quantidade de transcritos comparado com células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificadas correspondentes ou plantas do tipo selvagem não-geneticamente modificadas em pelo menos 50%, em particular em pelo menos 70%, de preferência pelo menos 85% e particularmente

de preferência em pelo menos 100%. Um aumento na quantidade de transcritos codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT também significa que plantas ou células de planta não tendo quaisquer quantidades detectáveis de transcritos codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT têm, após modificação genética de acordo com a invenção, quantidades detectáveis de transcritos codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT.

Um aumento na quantidade de proteína tendo a atividade de uma GFAT resultando em uma atividade aumentada dessas proteínas nas células de planta em questão pode ser determinado, por exemplo, através de métodos imunológicos, tal como análise *Western blot*, ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) ou RIA (*Radio Immune Assay*). Métodos para preparação de anticorpos reagindo especificamente com uma proteína particular, isto é, se ligando especificamente à dita proteína, são conhecidos da pessoa versada na técnica (vide, por exemplo, Lottspeich e Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik [Bioanalysis]; Spektrum akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Algumas companhias (por exemplo, Eurogentec, Bélgica) oferecem a preparação de tais anticorpos como um serviço sob encomenda. Aqui, um aumento na quantidade de proteína de preferência significa um aumento na quantidade de proteína tendo uma atividade de uma GFAT comparado com células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificadas ou plantas do tipo selvagem não-geneticamente modificadas em pelo menos 50%, em particular em pelo menos 70%, de preferência em pelo menos 85% e particularmente de preferência em pelo menos 100%. Um aumento na quantidade de proteína tendo uma atividade de uma GFAT também significa que plantas ou células de planta não tendo nenhuma quantidade detectável de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT têm, após modificação genética de acordo com a invenção, uma quantidade detectável de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT.

A atividade aumentada de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT em extratos de planta pode ser determinada através de métodos conhecidos da pessoa versada na técnica conforme descrito, por exemplo,

em Samac e outros (2004, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113-116, Humana Press, Editor Ashok Mulehandani, 1167-1182, ISSN 0273-2289). Um método preferido para determinação da quantidade da atividade de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT é dado em Métodos Gerais, item 5.

Uma quantidade aumentada de atividade (enzimática) de proteínas tendo a atividade de uma GFAT significa de preferência um aumento da atividade de tais proteínas em pelo menos 50%, de preferência pelo menos 70%, especialmente de preferência pelo menos 85% e particularmente de preferência pelo menos 100% comparado com células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificadas ou plantas do tipo selvagem não-geneticamente modificadas. Um aumento na quantidade de atividade enzimática de proteínas tendo a atividade de uma GFT também significa que plantas ou células de planta não tendo nenhuma quantidade detectável de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT têm, após modificação genética de acordo com a invenção, uma quantidade detectável de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT.

No contexto da presente invenção, o termo genoma deve ser compreendido como significando todo o material genético presente em uma célula de planta. A pessoa versada na técnica sabe que, em adição ao núcleo, outros compartimentos (por exemplo, plastídeos, mitocôndria) também contêm material genético.

No contexto da presente invenção, o termo molécula de ácido nucléico estavelmente integrada deve ser compreendido como significando a integração de uma molécula de ácido nucléico no genoma da planta. Uma molécula de ácido nucléico estavelmente integrada é caracterizada pelo fato de que, durante a replicação do sítio de integração correspondente, ela é multiplicada junto com as seqüências de ácido nucléico do hospedeiro que delimitam o sítio de integração, de modo que o sítio de integração no filamento de DNA replicado é circundando pelas mesmas seqüências de ácido nucléico que no filamento de leitura que serve como uma matriz para a replicação.

Um grande número de técnicas para integrar estavelmente mo-

léculas de ácido nucléico em uma célula hospedeiro de planta está disponível. Essas técnicas incluem a transformação de células de planta com T-DNA usando *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes* como meio de transformação, fusão de protoplasto, injeção, eletroporação de DNA, introdução de DNA através da abordagem biolística e também opções adicionais (revisto em Transgenic Plants, Leandro ed., Humana Press 2004, ISBN 1-59259-827-7). O uso de transformação mediada por *agrobacterium* de células de planta foi submetido a estudos minuciosos e foram descritos exaustivamente na EP 120516; Hoekema, Em: *The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V. Alblasserdam* (1985), Capítulo V; Fraley e outros, *Crit. Rev. Plant Sci.* 4, 1-46 e em An e outros *EMBO J.* 4, (1985), 277-287. Para a transformação de batatas vide, por exemplo, Rocha-Sosa e outros, *EMBO J.* 8, (1989), 29-33), para a transformação de plantas de tomate vide, por exemplo, US 5.565.347.

A transformação de plantas monocotiledôneas usando vetores baseados em transformação de *Agrobacterium* foi descrita, também (Chan e outros, *Plant Mol. Biol.* 22, (1993), 491-506; Hiei e outros, *Plant J.* 6, (1994) 271-282; Deng e outros, *Science in China* 33, (1990), 28-34; Wilmink e outros, *Plant Cell Reports* 11, (1992), 76-80; May e outros, *Bio/Technology* 13, (1995), 486-492; Conner e Domisse, *Int. J. Plant Sci.* 153 (1992), 550-555; Ritchie e outros, *Transgenic Res.* 2, (1993), 252-265). Um sistema alternativo para transformação de plantas monocotiledôneas é a transformação usando a abordagem biolística (Wan e Lemaux, *Plant Physiol.* 104, (1994), 37-48; Vasil e outros, *Bio/Technology* 11 (1993), 1553-1558; Ritala e outros, *Plant Mol. Biol.* 24, (1994), 317-325; Spencer e outros, *Theor. Appl. Genet.* 79, (1990), 625-631), a transformação de protoplasto, a eletroporação de células parcialmente permeabilizadas, a introdução de DNA usando fibras de vidro. Em particular, a transformação de milho foi descrita várias vezes na literatura (cf., por exemplo, WO95/06128, EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm e outros, *Biotechnology* 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm e outros, *Plant Cell* 2, (1990), 603-618; Koziel e outros, *Biotechnology* 11 (1993), 194-200; Moroc e outros, *Theor. Appl. Genet.* 80, (1990),

721-726). A transformação de outras gramas, tal como *"switchgrass"* (*Panicum virgatum*) foi também descrita (Richards e outros, 2001, *Plant Cell Reporters* 20, 48-54). A transformação bem sucedida de outras espécies de cereal foi também descrita, por exemplo, para cevada (Wan e Lemaux, s.o.; Ritala e outros, s.o.; Krens e outros, *Nature* 296, (1982), 72-74) e para trigo (Nehra e outros, *Plant J.* 5, (1994), 285-297; Becker e outros, 1994, *Plant Journal* 5, 299-307). Todos os métodos acima são adequados no contexto da presente invenção.

Comparado com a técnica anterior, células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção oferecem a vantagem de que elas produzem quantidades maiores de hialuronan do que plantas tendo apenas a atividade de uma hialuronan sintase. Isto permite que hialuronan seja produzido com pouco gasto uma vez que o isolamento de hialuronan de plantas tendo um teor de hialuronan maior é menos complicado e de custo mais eficiente. Ainda, comparado com as plantas descritas na técnica anterior, áreas de cultivo menores são requeridas para produzir hialuronan usando as plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção. Isto leva à possibilidade de prover hialuronan em quantidades suficientes mesmo para aplicação industrial onde ele não é atualmente usado devido à sua escassez e o alto preço. Organismos de planta infectados com vírus do gênero *Chlorella* são inadequados para produção de quantidades relativamente grandes de hialuronan. Na produção de hialuronan, algas infectadas com vírus têm a desvantagem de que os genes requeridos para síntese de hialuronan não são estavelmente integrados ao seu genoma (Van Etten and Meints, 1999, Annu. *Rev. Microbiol.* 53, 447-494), de modo que, para produção de hialuronan, a infecção com vírus tem que ser repetida. Deste modo, não é possível isolar células de *Chlorella* individuais que sintetizem continuamente a qualidade e a quantidade desejadas de hialuronan. Ainda, em algas *Chlorella* infectadas com vírus, hialuronan é apenas produzido por um período de tempo limitado, e como um resultado da lise causada pelo vírus, as algas são mortas apenas cerca de 8 horas após a infecção (Van Etten e outros,

2002, *Arch. Virol.* 147, 1479-1516). Em contraste, a presente invenção oferece a vantagem que as células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção e as plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção podem ser propagadas de uma maneira ilimitada vegetativamente ou sexualmente e que elas produzem hialuronan continuamente. As plantas transgênicas descritas no WO 05 012529, que têm uma molécula de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase, sintetizam uma quantidade relativamente pequena de hialuronan. Em contraste, a presente invenção oferece a vantagem de que células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção e plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção sintetizam quantidades consideravelmente maiores de hialuronan.

Deste modo, a presente invenção também provê células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção que sintetizam hialuronan. De preferência células de planta de acordo com a invenção ou plantas de acordo com a invenção sintetizam pelo menos 500 µg de hialuronan por grama de peso fresco, com preferência pelo menos 1500 µg de hialuronan por grama de peso fresco, particularmente de preferência pelo menos 3500 µg de hialuronan por grama de peso fresco, especialmente de preferência pelo menos 4000 µg de hialuronan por grama de peso fresco e com mais preferência ainda pelo menos 5500 µg de hialuronan por grama de peso fresco. De preferência células de planta de acordo com a invenção ou plantas de acordo com a invenção sintetizam no máximo 25000 µg de hialuronan por grama de peso fresco, com preferência no máximo 20000 µg de hialuronan por grama de peso fresco, particularmente de preferência no máxima 15000 µg de hialuronan por grama de peso fresco, especialmente de preferência no máximo 10000 µg de hialuronan por grama de peso fresco e com mais preferência no máximo 6500 µg de hialuronan por grama de peso fresco.

Foi observado que, durante o tempo de desenvolvimento, hialuronan acumula em tecido de planta; deste modo, a quantidade de hialuronan

com relação ao peso fresco ou com relação ao peso seco nas células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou nas plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção deve ser determinada com preferência particular durante coleta ou (um ou dois) dias antes da coleta das células de planta em questão ou das plantas em questão. Aqui, é feito uso em particular de material de planta (por exemplo, bulbos, sementes, folhas) com relação à quantidade de hialuronan que deve ser usada para processamento adicional.

Células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção que sintetizam hialuronan podem ser identificadas através de isolamento do hialuronan que é sintetizado por elas e provisão de sua estrutura. Uma vez que tecido de planta tem a vantagem que ele não contém hialuronidases, um método de isolamento simples e rápido pode ser usado para confirmação da presença de hialuronan em células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção. Para esta finalidade, água é adicionada ao tecido de planta a ser examinado e o tecido de planta é então mecanicamente cominuído (com o auxílio de, por exemplo, um moinho de conta, um *moinho de braço*, um misturador Warring, um extrator de suco, etc). Se necessário, mais água pode então ser adicionada à suspensão, e os restos celulares e componentes insolúveis em água são então removidos através de centrifugação ou peneiramento. A presença de hialuronan no sobrenadante obtido após centrifugação pode ser então demonstrada usando, por exemplo, uma proteína que se liga especificamente a hialuronan. Um método para detecção de hialuronan com o auxílio de uma proteína que se liga especificamente a hialuronan é descrito, por exemplo, na US 5.019.498. Estojos de teste (por exemplo, o *Hyaluronic acid (HA) test kit* da Corgenix, Inc., Colorado, USA, Nº do Produto 029-001); vide também Métodos Gerais item 4). Em paralelo, é possível inicialmente digerir uma alíquota do sobrenadante de centrifugação obtido com hialuronidase e então confirmar a presença de hialuronan com o auxílio de uma proteína que se liga especificamente a hialuronan, conforme

acima descrito. Através da ação da hialuronidase na batelada paralela, o hialuronan presente nela é degradado, de modo que após digestão completa não é mais possível detectar quantidades significantes de hialuronan. A presença de hialuronan no sobrenadante de centrifugação pode então ser também confirmada usando outros métodos de análise, tal como, por exemplo, IR, RMN ou espectroscopia de massa.

A superexpressão, em milho, de uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT fundida traducionalmente com um peptídeo de sinal de plastídeo resultou em um teor de UDP-glicosamina aumentado, e a superexpressão citosólica, em milho, de uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT resultou em um teor de glicosamina 1-fosfato aumentado em tecido de endosperma moído. No entanto, UDP-glicosamina e glicosamina 1-fosfato não são substratos para a síntese de hialuronan através de hialuronan sintase. Ainda, sabe-se que glicosamina tem um efeito citotóxico sobre células de planta (Roberts e outros, 1971, *Plant Physiol.* 48, 36-42) e que, se concentrações relativamente altas estiverem presentes em células de planta, ela é convertida em glicosamina 6-fosfato. Glicosamina 6-fosfato é da mesma maneira tóxica para células de planta (WO 98 35047, US 6.444.878). Ainda, sabe-se que proteínas tendo a atividade de uma GFAT podem ser reguladas de uma maneira inibidora por metabólitos que são formados no curso metabólico adicional para a síntese de UDP-N-acetil-glicosamina. Proteínas tendo a atividade de uma GFAT, isoladas de eucariotes (ambos com organismos animais e planta), são inibidas, por exemplo, pela UDP-N-acetil-glicosamina, que é um dos dois substratos para hialuronan sintase (Kornfeld, 1967, *J. Biol. Chem.* 242(13), 3135-3141; Graack e outros, 2001, *Biochem. J.* 360, 401-412; Mayer e outros, 1968, *Plant Physiol.* 43, 1097-1107). Proteínas bacterianas tendo a atividade de uma GFAT são inibidas por glicosamina 6-fosfato, um produto de reação direta da reação catalisada por GFAT (Deng e outros, 2005, *Metabolic Engineering* 7, 201-214). Não há quaisquer indicações na literatura do que pode limitar a quantidade de hialuronan sintetizado em células de planta. Deste modo, foi surpreendentemente verificado que células de planta geneticamente modifica-

das ou plantas geneticamente modificadas tendo uma molécula de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase e tendo atividade de GFAT adicionalmente aumentada comparado com células de planta geneticamente modificadas ou plantas geneticamente modificadas tendo (apenas) atividade de hialuronan sintase produzem quantidades significantemente altas de hialuronan.

Em uma modalidade preferida, a presente invenção refere-se a células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, caracterizado pelo fato de que elas produzem uma quantidade aumentada de hialuronan comparado com células de planta geneticamente modificadas ou comparado com plantas geneticamente modificadas que (apenas) têm a atividade de uma hialuronan sintase ou comparado com células de planta geneticamente modificadas ou comparado com plantas geneticamente modificadas tendo a atividade de uma hialuronan sintase e nenhuma atividade aumentada de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT.

No contexto da presente invenção, o termo célula de planta ou planta (apenas) tendo a atividade de uma hialuronan sintase deve ser compreendido como significando uma célula de planta geneticamente modificada ou uma planta geneticamente modificada onde a modificação genética consiste em que ela compreende uma molécula de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase, comparado com células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificada ou plantas do tipo selvagem não-geneticamente modificadas. Em particular, células de planta ou plantas (apenas) tendo a atividade de uma hialuronan sintase são caracterizadas pelo fato de que elas sintetizam hialuronan e que elas não têm quaisquer modificações genéticas adicionais outras que não a introdução de uma molécula de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase em células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificadas ou plantas do tipo selvagem não-geneticamente modificadas. De preferência, tais plantas não têm uma atividade aumentada de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT.

A quantidade de hialuronan produzido por células de planta ou

plantas pode ser determinada com o auxílio dos métodos que já foram descritos acima, por exemplo, usando um estojo de teste comercial (por exemplo, o *Hyaluronic acid (HA) test kit* da Corgenix, Inc., Colorado, USA, Nº do produto 029-001). Um método que é preferido no contexto da presente invenção para determinação do teor de hialuronan em células de planta ou plantas é descrito sob Métodos Gerais, item 4.

Em uma modalidade adicional da presente invenção, as células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou as plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção são células de planta de uma planta terrestre verde ou plantas terrestres verdes, respectivamente, que sintetizam hialuronan.

No contexto da presente invenção, o termo planta terrestre verde (*Embryophyta*) deve ser compreendido como definido em Strasburger, Lehrbuch der Botanik [Textbook of Botanyuma], 34ª Ed., Spektrum Akad. Verl., 1999, (ISBN 3-8274-0779-6)

Uma modalidade preferida da presente invenção refere-se a células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção de plantas multicelulares ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção que são organismos multicelulares. Deste modo, a presente modalidade refere-se a células de planta ou plantas que não se originam de plantas de célula única (protistas) ou que não são protistas.

As células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou as plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção podem, a princípio, ser células e plantas, respectivamente, ou qualquer espécie de planta, isto é, ambas plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. Elas são de preferência plantas de cultura, isto é, plantas cultivadas pelo homem para o propósito de alimentação do homem e animal ou para produção de biomassa e/ou para preparação de substâncias para propósitos técnicos, industriais (por exemplo, milho, arroz, trigo, alfalfa, centeio, aveias, cevada, mandioca, batata, tomate, *"switchgrass"* (*Panicum virgatum*), sagu, *feijões mung*, **ervilhas**, sorgo, cenouras, beringela, rabanete, semente de colza, sojas, amendoins, pepinos, abóboras, melões, alho-poró, alho, repo-

lho, espinafre, batata doce, aspargo, abobrinhas, alface, alcachofras, milho verde, pastinaca, escorcinoeira, alcachofra de Jerusalém, banana, beterraba açucareira, cana-de-açúcar, raiz de beterraba, brócolis, repolho, cebola, beterraba amarela, dente-de-leão, morango, maçã, abricó, ameixa, pêssego, videiras, couve-flor, aipo, pimentões vermelhos, nabo, ruibarbo). Particularmente preferidas são plantas de arroz, tomate ou batata.

Em uma modalidade preferida, a presente invenção refere-se a células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção onde a molécula de ácido nucléico codificando hialuronan sintase é caracterizada pelo fato de que ela codifica hialuronan sintase viral. A molécula de ácido nucléico codificando a hialuronan sintase codifica de preferência uma hialuronan sintase de um vírus que infecta algas. Com relação a um vírus de infecção de alga, a molécula de ácido nucléico que codifica uma hialuronan sintase codifica de preferência uma hialuronan sintase de um vírus de infecção de *Chlorella*, particularmente de preferência uma hialuronan sintase de um *Paramecium bursaria Chlorella* Virus 1 e especialmente de preferência uma hialuronan sintase de um vírus de *Paramecium bursaria Chlorella* de uma linhagem H1.

Em uma modalidade preferida adicional, a presente invenção refere-se a células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção onde a molécula de ácido nucléico que codifica hialuronan sintase é caracterizada pelo fato de que os códons da molécula de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase são modificados comparado com os códons da molécula de ácido nucléico codificando a hialuronan sintase do organismo do qual a hialuronan sintase se origina. Com preferência particular, os códons da hialuronan sintase foram modificados de modo que eles são adaptados para a freqüência de uso dos códons da célula de planta ou planta no genoma da qual eles são integrados ou devem ser integrados.

Devido à degeneração do código genético, aminoácidos podem ser codificados por um ou mais códons. Em organismos diferentes, os có-

dons codificando um aminoácido são usados em frequências diferentes. Adaptação do códon de uma seqüência de ácido nucléico de codificação à freqüência de seu uso na célula de planta na planta cujo genoma a seqüência a ser expressa deve ser integrada pode contribuir para uma quantidade aumentada de proteína traduzida e/ou para a estabilidade do mRNA em questão nas células de planta ou plantas particulares. A freqüência de uso de códons nas células de planta ou plantas em questão pode ser determinada pela pessoa versada na técnica através de exame do máximo possível de seqüências de ácido nucléico de codificação do organismo em questão para a freqüência com a qual certos códons são usados para codificação de um certo aminoácido. A freqüência de uso de códons de certos organismos é conhecida da pessoa versada na técnica e pode ser determinada de uma maneira simples e rápida usando programas de computador. Programas de computador adequados estão publicamente acessíveis e providos grátis *inter alia* na internet (por exemplo, http://gcua.schoedl.de/; http://www.kazusa.or.jp/codon/; http://www.entelechon.com/eng/cutanalysis.html). Adaptação dos códons de uma seqüência de codificação de ácido nucléico à freqüência de seu uso na célula de planta ou planta cujo genoma a seqüência a ser expressa deve ser integrada pode ser realizada através de mutagênese *in vitro* ou, de preferência, através de síntese *de novo* da seqüência de gene. Métodos para a síntese *de novo* de seqüências de ácido nucléico são conhecidos da pessoa versada na técnica. Uma síntese *de novo* pode ser realizada, por exemplo, inicialmente sintetizando oligonucleotídeos de ácido nucléico individuais, hibridização desses com oligonucleotídeos complementares a eles, então eles formam um filamento de DNA duplo, e então ligação dos oligonucleotídeos de filamento duplo individuais de modo que a seqüência de ácido nucléico desejada é obtida. A síntese *de novo* de seqüências de ácido nucléico incluindo a adaptação da freqüência com a qual os códons são usados para um certo organismo alvo pode ser também solicitada a companhias que oferecem este serviço (por exemplo, Entelechon GmbH, Regensburg, Alemanha).

A molécula de ácido nucléico codificando a hialuronan sintase é

de preferência caracterizada pelo fato de que ela codifica uma hialuronan sintase cujas seqüências de aminoácido são pelo menos 70%, de preferência pelo menos 80%, com preferência pelo menos 90%, especialmente de preferência pelo menos 95% e com mais preferência pelo menos 98% idênticas à seqüência de aminoácido mostrada sob SEQ ID NO:2. Em uma modalidade particularmente preferida, a molécula de ácido nucléico codificando a hialuronan sintase é caracterizada pelo fato de que ela codifica uma hialuronan sintase tendo uma seqüência de aminoácido mostrada sob SEQ ID NO:2.

Em uma modalidade adicional, a molécula de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase é pelo menos 70%, de preferência pelo menos 80%, com preferência pelo menos 90%, especialmente de preferência pelo menos 95% e com mais preferência pelo menos 98% idêntica à seqüência de ácido nucléico mostrada sob SEQ ID NO 1 ou SEQ ID NO 3. Em uma modalidade particularmente preferida, a molécula de ácido nucléico codificando a hialuronan sintase é caracterizada pelo fato de que ela tem a seqüência de ácido nucléico mostrada sob SEQ ID NO 3.

Em 25 de agosto de 2004, o plasmídeo IC 34-222, compreendendo uma molécula de ácido nucléico sintética codificando uma hialuronan sintase de *Paramecium bursaria Chlorella* vírus foi depositado no Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg. 1b, 38124 Brunswick, Alemanha, sob o número DSM16664, de acordo com o Tratado de Budapeste. A seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO 2 pode ser derivada da região de codificação da seqüência de ácido nucléico integrada ao plasmídeo IC 341-222 e codifica uma hialuronan sintase de *Paramecium bursaria Chlorella* vírus.

Deste modo, a presente invenção refere-se também a células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção onde a molécula de ácido nucléico que codifica a hialuronan sintase é caracterizada pelo fato dela codificar uma proteína cuja seqüência de aminoácido pode ser derivada da região de codificação da seqüência de ácido nucléico inserida no plasmídeo

DSM16664 ou que ela codifica uma proteína cuja seqüência de aminoácido é pelo menos 70%, de preferência pelo menos 80%, com preferência pelo menos 90%, especialmente de preferência pelo menos 95% e com mais preferência pelo menos 98% idêntica à seqüência de aminoácido que pode ser derivada da região de codificação da seqüência de ácido nucléico inserida no plasmídeo DSM16664.

A presente invenção refere-se também a células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção onde a molécula de ácido nucléico codificando hialuronan sintase é caracterizada pelo fato de que ela é a seqüência de ácido nucléico codificando hialuronan sintase integrada ao plasmídeo DSM16664 ou que ela é pelo menos 70%, de preferência pelo menos 80%, com preferência pelo menos 90%, especialmente de preferência pelo menos 95% e com mais preferência pelo menos 98% idêntica à seqüência de ácido nucléico integrada no plasmídeo DSM16664.

A presente invenção refere-se ainda a células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção que são caracterizadas pelo fato de que elas têm uma molécula de ácido nucléico estranha estavelmente integrada no seu genoma, a dita molécula de ácido nucléico estranha aumentando a atividade de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT comparado com células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificadas correspondentes ou plantas do tipo selvagem não-geneticamente modificadas correspondentes.

No contexto da presente invenção, o termo "molécula de ácido nucléico estranha" deve ser compreendido como significando uma molécula que ou não acontece naturalmente nas células de planta do tipo selvagem correspondentes ou que não acontece naturalmente na disposição espacial concreta em células de planta do tipo selvagem ou que está localizada em um sítio no genoma da célula de planta do tipo selvagem onde ela não acontece naturalmente. De preferência, a molécula de ácido nucléico estranha é uma molécula recombinante compreendendo vários elementos cuja combi-

nação ou disposição espacial específica não acontece naturalmente em células de planta.

No contexto da presente invenção, o termo molécula de ácido nucléico recombinante" deve ser compreendido como significando uma molécula de ácido nucléico que tem várias moléculas de ácido nucléico que não estão naturalmente presentes em uma combinação tal como aquela presente em uma molécula de ácido nucléico recombinante. Então, moléculas de ácido nucléico recombinantes podem, em adição a moléculas de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase e/ou uma proteína tendo a atividade de uma GFAT, adicionalmente ter seqüências de ácido nucléico que não estão naturalmente presentes em combinação com as moléculas de ácido nucléico mencionadas. As seqüências de ácido nucléico adicionais mencionadas que estão presentes em uma molécula de ácido nucléico recombinante em combinação com uma molécula de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase ou uma proteína tendo a atividade de uma GFAT podem ser quaisquer seqüências. Por exemplo, elas podem ser seqüências de ácido nucléico de planta genômicas. As seqüências de ácido nucléico adicionais são de preferência seqüências reguladoras (promotores, sinais de terminação, aumentadores), particularmente de preferência seqüências reguladoras que são ativas em tecido de planta, especialmente de preferência seqüências reguladoras específicas de tecido que são ativas em tecido de planta. Métodos para geração de moléculas de ácido nucléico recombinantes são conhecidos da pessoa versada na técnica e compreendem métodos de engenharia genética, tal como, por exemplo, ligação de moléculas de ácido nucléico através de ligação, recombinação genética e ou a síntese *de novo* de moléculas de ácido nucléico (vide, por exemplo, Sambrook e outros, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª edição (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel e outros, *Short Protocols in Molecular Biology,* John Wiley & Sons, 5ª edição (2002), ISBN: 0471250929).

Células de planta geneticamente modificadas e plantas geneticamente modificadas tendo uma molécula de ácido nucléico estranha esta-

velmente integrada ao seu genoma ou uma pluralidade de moléculas de ácido nucléico estranhas estavelmente integradas ao seu genoma que codificam hialuronan sintase e que aumentam a atividade de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT comparado com células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificadas ou plantas do tipo selvagem não-geneticamente modificadas podem ser distinguidas das ditas células de planta do tipo selvagem e ditas plantas do tipo selvagem, respectivamente, *inter alia*, pelo fato de que elas compreendem uma molécula de ácido nucléico estranha que não acontece naturalmente em células de planta do tipo selvagem e plantas do tipo selvagem, respectivamente, ou pelo fato de que tal molécula é integrada em um sítio no genoma da célula de planta geneticamente modificada de acordo com a invenção ou no genoma da planta geneticamente modificada de acordo com a invenção onde ela não acontece em células de planta do tipo selvagem e planta do tipo selvagem, respectivamente, isto é, em um ambiente genômico diferente. Ainda, tais células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção e plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção podem ser distinguidas das células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificadas e plantas do tipo selvagem não-geneticamente modificadas, respectivamente, pelo fato de que elas compreendem pelo menos uma cópia da molécula de ácido nucléico estranha estavelmente integrada ao seu genoma, se apropriado em adição a cópias tal como uma molécula naturalmente presente nas células de planta do tipo selvagem ou plantas do tipo selvagem. Se a(s) molécula(s) de ácido nucléico estranha(s) introduzida(s) nas células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou a planta geneticamente modificada de acordo com a invenção forem cópias adicionais de moléculas já naturalmente presentes nas células de planta do tipo selvagem ou plantas do tipo selvagem, as células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção e as plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção podem ser distinguidas de células de planta do tipo selvagem e plantas do tipo selvagem, respectivamente, em particular pelo fato de que essa cópia/essas cópias adicional (is) é/estão localizada (s) em

sítios no genoma onde ela elas não está/estão presente(s) em células de planta do tipo selvagem e plantas do tipo selvagem, respectivamente.

A integração estável de uma molécula de ácido nucléico no genoma de uma célula de planta ou uma planta pode ser demonstrada através de métodos genéticos e ou métodos de biologia molecular. Uma integração estável de uma molécula de ácido nucléico no genoma de uma célula de planta ou no genoma de uma planta é caracterizada pelo fato de que na progênie que herdou a dita molécula de ácido nucléico, a molécula de ácido nucléico estavelmente integrada está presente no mesmo ambiente genômico que na geração de origem. A presença de uma integração estável de uma seqüência de ácido nucléico no genoma de uma célula de planta ou no genoma de uma planta pode ser demonstrada usando métodos conhecidos da pessoa versada na técnica, *inter alia*, com o auxílio de análise *Souther blot* da análise RFLP (*Restriction Fragment Lenght Polymorfism*) (Nam e outros, 1989, *The Plant Cell* 1, 699-705; Leister e Dean, 1993, *The Plant Journal* 4(4), 745-750), com métodos baseados em PCR, tal como, por exemplo, a análise de diferenças em comprimento nos fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Lenght Polymorfism*, AFLP) (Castilgioni e outros, 1998, *Genetics* 149, 2039-2056; Meksem e outros, 2001, *Molecular Genetics and Genomics* 265, 207-214; Meyer e outros, 1998, *Molecular and General Genetics* 259, 150-260) ou usando fragmentos amplificados clivados usando endonucleases de restrição (*Cleaved Amplified Polymorfic Sequences*, CAPS) (Konieczny e Ausubel, 1993, *The Plant Journal* 4, 403-410; Jarvis e outros, 1994, *Plant Molecular Biology* 24, 685-687; Bachem e outros, 1996, *The Plant Journal* 9(5), 745-753).

A princípio, a molécula de ácido nucléico estranha pode ser qualquer molécula de ácido nucléico que aumente, na célula de planta ou planta, a atividade de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT.

No contexto da presente invenção, células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção e plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção podem ser também preparadas usando mutagênese de inserção (revisão: Thorneycrof e outros, 2001, *Journal of*

Experimental Botany 52 (361), 1593-1601). No contexto da presente invenção, mutagênese de inserção deve ser compreendida como significando em particular a inserção de transposon ou DNA de transferência (T-DNA) em um gene ou na vizinhança de um gene codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT, deste modo aumentando a atividade de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT na célula em questão.

Os transposons podem ou ser transposons que ocorrem naturalmente na célula (transposons endógenos) ou aqueles que não estão naturalmente presentes na dita célula, mas foram introduzidos na célula através de engenharia genética, tal como, por exemplo, transformação da célula (transposons heterólogos). A modificação da expressão de genes pelos transposons é conhecida da pessoa versada na técnica. Uma revisão do uso de transposons endógenos e heterólogos como ferramentas em biotecnologia de planta é dada em Ramachandran e Sundaresan (2001, *Plant Physiology and Biochesmitry* 39, 234-252). Mutagênese por inserção de T-DNA é baseada no fato de que certas seções (T-DNA) de plasmídeos Ti de *Agrobacterium* podem ser integradas no genoma de células de planta. O sítio de integração no cromossoma da planta não é predeterminado, integração pode estar em qualquer local. Se o T-DNA for integrado em uma seção ou na vizinhança de uma seção do cromossomo representando uma função de gene, isto pode resultar em uma expressão de gene aumentada e então ser também uma mudança na atividade da proteína codificada pelo gene em questão.

As seqüências inseridas no genoma (em particular transposons ou T-DNA) são caracterizadas pelo fato de que elas compreendem seqüências resultando na ativação de seqüências reguladoras de um gene codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT (*tagging* de ativação). De preferência, as seqüências inseridas no genoma (em particular transposons ou T-DNA) são caracterizadas pelo fato de que elas são integradas na vizinhança de moléculas de ácido nucléico endógenas no genoma da célula de planta ou planta codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT.

Células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção e plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção podem ser geradas, por exemplo, usando o método de *tagging* de ativação (vide, por exemplo, Walden e outros, *Plant J.* (1991), 281-288; Walden e outros, *Plant Mol. Biol.* 26 (1994), 1521-1528). Este método é baseado na ativação de promotores endógenos pelas seqüências aumentadoras, tal como, por exemplo, o aumentador do promotor de RNA 35S do vírus do mosaico da couve-flor ou o aumentador de octopina sintase.

No contexto da presente invenção, o termo *tagging* de ativação de T-DNA deve ser compreendido como significando um fragmento de T-DNA que compreende seqüências aumentadoras e, através de integração no genoma de uma célula de planta, aumenta a atividade de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT.

No contexto da presente invenção, o termo *tagging* de ativação de transposon deve ser compreendido como significando um transposon que compreende seqüências aumentadoras e, através de integração no genoma de uma célula de planta, aumenta a atividade de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT.

Uma modalidade preferida da presente invenção refere-se a células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção que são caracterizadas pelo fato de pelo menos uma molécula de ácido nucléico estranha codifica uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT. Uma modalidade particularmente preferida da presente invenção refere-se a células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção que são caracterizadas pelo fato de que uma molécula de ácido nucléico estranha codifica uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT.

De acordo com a invenção, a molécula de ácido nucléico estranha codificando uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT pode se originar de qualquer organismo; de preferência, a dita molécula de ácido nucléico se origina de bactérias, fungos, animais, plantas ou vírus, par-

ticularmente de preferência de mamíferos, plantas ou bactérias e especialmente de preferência de camundongo ou *Escherichia coli*. Com relação a vírus, a molécula de ácido nucléico estranha codificando uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT de preferência se origina de um vírus que infecta algas, com preferência de um vírus que infecta algas do gênero *Chlorella*, particularmente de preferência de um *Paramecium bursaria Chlorella* vírus e especialmente de preferência de um *Paramecium bursaria Chlorella* vírus de uma linhagem H1. Ao invés da molécula de ácido nucléico de ocorrência natural codificando uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT, é também possível que uma molécula de ácido nucléico gerada através de mutagênese seja introduzida nas células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, onde a dita molécula de ácido nucléico estranha mutagenizada é caracterizada pelo fato de que ela codifica uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT com inibição reduzida por metabólitos (por exemplo, do metabolismo de glicosamina). A preparação de tais moléculas de ácido nucléico mutagenizadas é descrita de uma maneira exemplar para uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT de *Escherichia coli* em Deng e outros (2005, *Metabolic Engineering* 7, 201-214; WO 04 003175). Mutantes para uma proteína tendo a atividade de uma GFAT do camundongo são descritos, por exemplo, em Hu e outros (2004, *J. Biol. Chem.* 279 (29), 29988-29993).

Moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT são conhecidas da pessoa versada na técnica e descritas na literatura. Então, moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT são descritas de vírus, por exemplo, para o *Chlorella* vírus k2 (Nº de acesso EMBL AB107976.1), de bactérias, por exemplo, para *Escherichia coli* (Dutka-Malen, 1988, *Biochemie* 70 (2), 287-290; EMBL Nº de acesso: L10328.1), de fungos, por exemplo, para *Saccharomyces cerevisiae* (Nº de acesso EMBL AF334737.1, Watzele e outros, 1989, *J. Biol. Chem.* 264, 8753-8758), *Aspergillus niger* (EMBL Nº de acesso AY594332.1), *Candida albicans* (Nº de acesso EMBL X94753.1), de

insetos, por exemplo, para *Aedes aegyti* (Kato e outros, *2002*, *Insect. Biol.* 11 (3), 207,216; Nº de acesso EMBL AF399922.1), *Drosophila melanogaster* (GFAT-1: Nº de acesso EMBL Y18627.1, GFAT-2: Nº de acesso NCBI NM_143360.2), de algas para *Volvariella volvacea* (Nº de acesso EMBL AY661466.1), de vertebrados, por exemplo, para *Homo sapiens* (GFAT-1: Nº de acesso EMBL AF334737.1; GFAT-2: Nº de acesso EMBL BC000012.2, Oki e outros, 1999, Genomics 57 (2),227-34), *Mus musculus* (GFAT-1: Nº de acesso EMBL AF334736.1; GFAT-2: Nº de acesso EMBL AB016780.1), ou de plantas, por exemplo, para *Arabidopsis thaliana* (Nº de acesso EMBL AP001297.1; Nº de acesso NCBI cds BAB03027.1).

Em uma modalidade preferida, a presente invenção refere-se a células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção e plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção onde a molécula de ácido nucléico estranha codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT é selecionada do grupo consistindo em:

a) moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a seqüência de aminoácido dada sob SEQ ID NO 5 ou uma proteína tendo uma seqüência de aminoácido dada sob SEQ ID NO 7 ou uma proteína tendo a seqüência de aminoácido dada sob SEQ ID NO 9;

b) moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína cuja seqüência é pelo menos 60%, de preferência pelo menos 80%, com preferência pelo menos 90%, especialmente de preferência pelo menos 95% e com mais preferência pelo menos 98% idênticas à seqüência de aminoácido dada sob SEQ ID NO 5, sob SEQ ID NO 7 ou sob SEQ ID NO 9;

c) moléculas de ácido nucléico compreendendo a seqüência de nucleotídeo mostrada sob SEQ ID NO 4 ou uma seqüência complementar a ela, a seqüência de nucleotídeo mostrada sob SEQ ID NO 6 ou uma seqüência complementar a ela, a seqüência nuclear mostrada sob SEQ ID NO 8 ou uma seqüência complementar a ela ou a seqüência de nucleotídeo mostrada sob SEQ ID NO 10 ou uma seqüência complementar a ela;

d) moléculas de ácido nucléico que são pelo menos 70%, de preferência pelo menos 80%, com preferência pelo menos 90%, especial-

mente de preferência pelo menos 95% e com mais preferência pelo menos 98% idênticas às seqüências de aminoácido descritas sob a) ou c);

e) moléculas de ácido nucléico que hibridizam sob condições estringentes com pelo menos um filamento das seqüências de ácido nucléico sob a) ou c);

f) moléculas de ácido nucléico cuja seqüência de nucleotídeo difere da seqüência das moléculas de ácido nucléico mencionadas sob a) ou c) devido à degeneração do código genético; e

g) moléculas de ácido nucléico que são fragmentos, variantes alélicas e/ou derivados das moléculas de ácido nucléico mencionadas sob a), b), c), d), e) ou f).

No contexto da presente invenção, o termo hibridização significa uma hibridização sob condições de hibridização convencionais, de preferência sob condições estringentes, conforme descrito, por exemplo, em Sambrook e outros, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2 ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Com preferência particular, hibridização significa uma hibridização sob as condições que seguem:

TAMPÃO DE HIBRIDIZAÇÃO:

2xSSC; 10xsolução Denhardt (Fikoll 400+PEG+BSA; razão 1:1:1); SDS a 0,1%; EDTA a 5 mM; Na_2HPO_4 a 50 mM; 250 µg/ml de DNA de esperma de arenque; 50 µg/ml de tRNA; ou tampão de fosfato de sódio a 25 M pH 7,2; EDTA a 1 mM; SDS a 7%

TEMPERATURA DE HIBRIDIZAÇÃO:

T=65 a 68ºC

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

Temperatura de lavagem: T=65 a 68º C.

Moléculas de ácido nucléico que hibridizam com moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT podem se originar de qualquer organismo: deste modo, elas podem se originar de bactérias, fungos, animais, plantas ou vírus. Moléculas de ácido nucléico que hibridizam com moléculas de ácido nucléico codificando proteína

tendo a atividade de uma GFAT particularmente de preferência se originam de mamíferos, plantas ou bactérias e especialmente de preferência do camundongo ou *Escherichia coli*. Moléculas de ácido nucléico hibridizando com moléculas de ácido nucléico codificando proteína tendo a atividade de uma GFAT-1 ou uma GFAT-2 de preferência se originam de um organismo eucariótica, particularmente de preferência elas se originam de um organismo animal, especialmente de preferência do camundongo. Moléculas de ácido nucléico que hibridizam com as moléculas mencionadas podem ser isoladas, por exemplo, de cDNA genômico ou biblioteca. Tais moléculas de ácido nucléico podem ser identificadas e isoladas usando as moléculas de ácido nucléico mencionadas ou partes dessas moléculas ou os complementos reversos dessas moléculas, por exemplo, através de hibridização de acordo com métodos padrão (vide, por exemplo, Sambrook e outros, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou através de amplificação usando PCR. Como amostra de hibridização para isolamento de uma seqüência de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT ou a atividade de uma GFAT-1 ou a atividade de uma GFAT-2, é possível usar, por exemplo, moléculas de ácido nucléico tendo exatamente ou essencialmente a seqüência de nucleotídeo dada sob SEQ ID NO 4 ou sob SEQ ID NO 6 ou sob SEQ ID NO 8 ou sob SEQ ID NO 10 ou partes dessas seqüências. Os fragmentos usados como amostras de hibridização podem ser também fragmentos sintéticos ou oligonucleotídeos preparados usando as técnicas de síntese comuns, cuja seqüência é essencialmente idêntica à molécula de ácido nucléico descrita no contexto da presente invenção. Uma vez genes que hibridizam com as seqüências de ácido nucléico descritas no contexto da presente invenção sendo identificados e isolados, a seqüência deve ser determinada e as propriedades das proteínas codificadas por esta seqüência devem ser analisadas para determinar se elas são proteínas tendo a atividade de uma GFAT. Métodos de como determinar se uma proteína tem a atividade de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT (por exemplo, Mayer e outros, 1968, *Plant Physiol.* 43, 1097-1107; Deng e outros, 2005, *Metabolic*

Engineering 7, 201-214), uma GFAT-1 ou uma GFAT-2 (por exemplo Hu e outros, 2004, *J. Biol. Chem.* 279 (29), 29988-29993) são conhecidos da pessoa versada na técnica e descritos, *inter alia*, na literatura mencionada. As moléculas hibridizando com as moléculas de ácido nucléico descritas no contexto da presente invenção compreendem em particular fragmentos, derivados e variantes alélicas das moléculas de ácido nucléico mencionadas. No contexto da presente invenção, o termo derivado significa que as seqüências dessas moléculas diferem em uma ou mais posições das seqüências das moléculas de ácido nucléico descritas acima e são altamente idênticas a essas seqüências. As diferenças para as moléculas de ácido nucléico descritas acima podem, por exemplo, ser devido à deleção (em particular deleções 5'- e/ou 3' levando a deleções N- e/ou C-terminais da proteína correspondente), adição, substituição, inserção ou recombinação.

No contexto da presente invenção, o termo identidade significa uma identidade de seqüência sob todo o comprimento da região de codificação de uma molécula de ácido nucléico ou de todo o comprimento de uma seqüência de aminoácido codificando uma proteína de pelo menos 60%, em particular em identidade de pelo menos 70%, de preferência pelo menos 80%, particularmente de preferência de pelo menos 90% e especialmente de preferência de pelo menos 95% e com mais preferência pelo menos 98%. No contexto da presente invenção, o termo identidade deve ser compreendido como significando o número de aminoácidos/nucleotídeos idênticos (identidade) com outras proteínas/ácidos nucléicos, expressos em porcentagem. De preferência, a identidade com relação a uma proteína tendo a atividade de uma GFAT é determinada através de comparação com a seqüência de aminoácido dada sob SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 9 e a identidade com relação a uma molécula de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT é determinada através de comparação com a seqüência de ácido nucléico dada sob SEQ ID NO 4 ou SEQ ID NO 6 ou SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 10 com outras proteínas/ácidos nucléicos com o auxílio de programas de computador. Se seqüências a serem comparadas umas com as outras forem de comprimentos diferentes, a iden-

tidade deve ser determinada através da determinação da identidade em porcentagem do número de aminoácidos que a seqüência mais curta compartilha com a seqüência mais longa. De preferência, a identidade é determinada usando o programa de computador conhecido e publicamente disponível ClustalW (Thompson e outros, *Nucleic Acids Research* 22 (1994), 4673-4680). ClustalW é publicamente disponibilizado por Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) e Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Germany. ClustalW pode ser também baixado de várias páginas na internet, *inter alia*, do IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, France; ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/) e de EBI (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/) e todas as páginas da internet espelhadas do EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK). De preferência, é feito uso do programa de computador ClustalW de versão 1.8 para determinar a identidade entre proteínas descritas no contexto da presente invenção e outras proteínas. Aqui, os parâmetros têm que ser ajustados como segue: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAPOPEN=10, GAPEXTEND=0,05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP.

De preferência, é feito uso do programa de computador ClustalW de versão 1.8 para determinar a identidade, por exemplo, entre a seqüência de nucleotídeo das moléculas de ácido nucléico descritas no contexto da presente invenção e a seqüência de nucleotídeo de outras moléculas de ácido nucléico. Aqui, os parâmetros têm que ser ajustados como segue: KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAPOPEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: não-pesado.

Identidade significa ainda que existe uma equivalência funcional e/ou estrutural entre as moléculas de ácido nucléico em questão ou as proteínas codificadas por elas. As moléculas de ácido nucléico que são homólogas às moléculas descritas acima e representam derivados dessas moléculas são geralmente variações dessas moléculas que representam modifica-

ções tendo a mesma função biológica. Eles podem ser variações de ocorrência ou natural, por exemplo, seqüências de outras espécies, ou mutações, onde essas mutações podem ter acontecido de uma maneira natural ou foram introduzidas através de mutagênese direcionada. Ainda, as variações podem ser seqüências sinteticamente produzidas. As variantes alélicas podem ou ser variantes de ocorrência natural ou variantes sinteticamente produzidas ou variantes geradas através de técnicas de DNA recombinante. Uma forma especial de derivados são, por exemplo, moléculas de ácido nucléico que diferem das moléculas de ácido nucléico descritas no contexto da presente invenção devido à degeneração do código genético.

Os vários derivados das moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT têm certas características em comum. Essas podem ser, por exemplo, a atividade biológica, especificidade de substrato, peso molecular, reatividade imunológica, conformação etc; e também propriedades físicas, tal como, por exemplo, as propriedades de mobilidade em eletroforese de gel, comportamento cromatográfico, coeficiente de sedimentação, solubilidade, propriedades espectroscópicas, estabilidade, pH ótimo, temperatura ótima, etc. Propriedades preferidas de proteínas tendo a atividade de uma GFAT são conhecidas da pessoa versada na técnica, já foram mencionadas acima e são para ser aplicadas de uma maneira análoga.

Em uma modalidade preferida adicional, a presente invenção refere-se a células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção onde moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT são caracterizadas pelo fato de que os códons das ditas moléculas de ácido nucléico são diferentes dos códons das moléculas de ácido nucléico que codificam a dita proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT do organismo de origem. Particularmente de preferência, os códons das moléculas de ácido nucléico codificando a proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT são mudados, então eles são adaptados para a freqüência de uso dos códons da célula de planta ou plan-

ta cujo genoma eles são integrados ou devem ser integrados.

A presente invenção provê ainda células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção caracterizado pelo fato de que as moléculas de ácido nucléico estranhas integraram estavelmente no genoma da célula de planta ou da planta codificando uma hialuronan sintase e/ou codificando uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT são ligadas a elementos reguladores iniciando a transcrição em células de planta (promotores). Esses podem ser promotores homólogos ou heterólogos. Os promotores podem ser constitutivos, específicos de tecido, específicos de desenvolvimento ou regulados por fatores externos (por exemplo, após aplicação de substâncias químicas, através da ação de fatores abióticos, tal como calor e/ou frio, seca, doença, etc). Aqui, moléculas de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase ou uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT, cujas moléculas de ácido nucléico são integradas no genoma de uma célula de planta geneticamente modificada de acordo com a invenção ou uma planta geneticamente modificada de acordo com a invenção, podem em cada caso ser ligadas ao mesmo promotor, ou as seqüências individuais podem ser ligadas a promotores diferentes.

Uma modalidade preferida da presente invenção refere-se a células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção onde pelo menos uma molécula de ácido nucléico estranha, particularmente de preferência pelo menos duas moléculas de ácido nucléico estranhas, especialmente de preferência três moléculas de ácido nucléico estranhas selecionadas do grupo consistindo em moléculas de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase ou uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT é (são) ligada (s) a um promotor específico de tecido. Promotores específicos de tecidos são promotores que iniciam a transcrição especificamente em células de bulbo, fruta ou semente de planta ou folhas.

Para expressar moléculas de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase ou uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma

GFAT, essas são de preferência ligadas a seqüências de DNA reguladoras assegurando a transcrição em células de planta. Essas incluem em particular promotores. Em geral, qualquer promotor ativo em células de planta é adequado para a expressão. Aqui, o promotor pode ser escolhido de modo que expressão é constitutivamente ou apenas em um certo tecido, em um certo ponto do desenvolvimento da planta ou em um ponto de tempo determinado por fatores externos. Ambos com relação à planta e com relação à molécula de ácido nucléico a ser expressa, o promotor pode ser homólogo ou heterólogo. Promotores adequados são, por exemplo, o promotor 35S RNS do vírus do mosaico da couve-flor ou o promotor da ubiquitina de milho ou o *Cestrum* YLCV (*Yellow Leaf Curling Virus*; WO 01 73087; Stavolone e outros, 2003, *Plant Mol. Biol.* 53, 703-713) para uma expressão constitutiva, o promotor do gene de patatina B33 (Rocha-Sosa e outros, *EMBO J.* 8 (1989), 23-29) para uma expressão específica de bulbo em batatas ou um promotor específico de fruta para tomate, tal como, por exemplo, o promotor da poligalacturonase de tomate (Montgomery e outros, 1993, *Plant Cell* 5, 1049-1062) ou o promotor E8 do tomate (Metha e outros, 2002, *Nature Biotechnol.* 20(6), 613-618) ou o promoter da ACC oxidase do pêssego (Moon and Callahan, 2004, *J. Experimental Botany* 55 (402), 1519-1528) ou um promotor que assegure expressão apenas em tecidos fotossinteticamente ativos, por exemplo, o promotor da ST-LS1 (Stockhaus e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus e outros, *EMBO J.* 8 (1989), 2445-2451) ou para uma expressão específica de endosperma do promotor HMWG de trigo, o promotor USP, o promotor da faseolina, o promotor dos genes de zeína de milho (Pedersen e outros, *Cell* 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio e outros, *Plant Mol. Biol.* 15 (1990), 81-93), o promotor da gluteína (Leisy e outros, *Plant Mol. Biol.* 14 (1990), 41-50; Zheng e outros, *Plant J.* 4 (1993), 357-366; Yoshihara e outros, *FEBS Lett.* 383 (1996), 213-218), o promotor do *shrunken-1* (Werr e outros, *EMBO J.* 4 (1985), 1373-1380), um promotor da globulina (Nakase e outros, 1996, *Gene* 170(2), 223-226) ou um promotor da prolamina (Qu e Takaiwa, 2004, *Plant Biotechnology Journal* 2(2), 113-125). No entanto, é também possível usar

promotores que são apenas ativos em um ponto no tempo determinado por fatores externos (vide, por exemplo, WO9307279). De interesse particular aqui podem ser promotores de proteínas de choque térmico que permitem uma indução simples. É ainda possível usar promotores específicos de semente, tal como, por exemplo, o promotor USP de *Vicia faba* que assegura uma expressão específica de semente em *Vicia faba* e outras plantas (Fiedler e outros, *Plant Mol. Biol.* 22 (1993), 669-679; Bäumlein e outros, *Mol. Gen. Genet.* 225 (1991), 459-467). O uso de promotores presentes no genoma de vírus de infecção de algas é também adequado para expressão de seqüências de ácido nucléico em plantas (Mitra e outros, 1994, *Biochem. Biophys Res Commun* 204(1), 187-194; Mitra e Higgins, 1994, *Plant Mol. Biol.* 26(1), 85-93, Van Etten e outros, 2002, *Arch. Virol.* 147, 1479-1516).

No contexto da presente invenção, o termo específico de tecido deve ser compreendido como significando a limitação substancial de uma manifestação (por exemplo, iniciação de transcrição) a um certo tecido.

No contexto da presente invenção, o termo célula de bulbo, fruta ou semente deve ser compreendido como significando todas as células presentes em um bulbo, uma fruta ou em uma semente.

No contexto da presente invenção, o termo promotor homólogo deve ser compreendido como significando um promotor que está naturalmente presente em células de planta ou plantas usadas para a preparação de células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção (homólogo com relação à célula de planta ou planta) ou como significando um promotor que regula a regulagem da expressão de um gene no organismo do qual a seqüência foi isolada (homólogo com relação à molécula de ácido nucléico a ser expressa).

No contexto da presente invenção, o termo promotor heterólogo deve ser compreendido como significando um promotor que não está naturalmente presente em células de planta ou plantas usadas para a preparação de células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção (hete-

rólogo com relação à célula de planta ou planta) ou como significando um promotor que é, no organismo do qual uma seqüência de ácido nucléico a ser expressa foi isolada, não naturalmente presente para regulagem da expressão da dita seqüência de ácido nucléico (heterólogo com relação à molécula de ácido nucléico a ser expressa).

Pode ser também apresentada uma seqüência de terminação (sinal de poliadenilação) que serve para adicionar um filamento poli-A ao transcrito. O filamento poli-A é imaginado agir na estabilização dos transcritos. Tais elementos são descritos na literatura (cf. Gielen e outros, *EMBO J.* 8 (1989), 23-29) e podem ser trocados conforme desejado.

É também possível que seqüências de íntron estejam presentes entre o promotor e a região de codificação. Tais seqüências de íntron podem levar à estabilidade de expressão e expressão aumentada em plantas (Callis e outros, 1987, *Genes Devel.* 1, 1183-1200; Luehrsen e Walbot, 1991, *Mol. Gen. Genet.* 225, 81-93; Rethmeier e outros, 1997; *Plant Journal* 12(4), 895-899; Rose e Beliakoff, 2000, *Plant Physiol.* 122 (2), 535–542; Vasil e outros, 1989, *Plant Physiol.* 91, 1575-1579; XU e outros, 2003, *Science in China Series* C Vol.46 Nº6, 561-569). Seqüências de íntron adequadas são, por exemplo, o primeiro íntron do gene sh1 do milho, o primeiro íntron do gene poli-ubiquitina 1 do milho, o primeiro íntron do gene EPSPS do arroz ou um dos primeiros dois íntrons do gene PAT1 da *Arabidopsis.*

A presente invenção refere-se também a plantas compreendendo células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção. Tais plantas podem ser produzidas através de regeneração a partir de células de planta 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 compreendendo células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção.

No contexto da presente invenção, o termo partes processáveis deve ser compreendido como significando partes de planta que são usadas para preparação de gêneros alimentícios ou ração, que são usadas como

uma fonte de matéria-prima para processos industriais, como uma fonte de matéria-prima para a preparação de produtos farmacêuticos ou como uma fonte de matéria-prima para a preparação de produtos cosméticos.

No contexto da presente invenção, o termo partes consumíveis deve ser compreendido como significando partes de planta que servem como alimento para o homem e são usadas como ração animal.

A presente invenção refere-se também a um material de propagação de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção compreendendo uma célula de planta geneticamente modificada de acordo com a invenção.

Aqui, o termo material de propagação compreende aqueles componentes da planta que são adequados para geração de progênie através da via vegetativa ou geradora. Adequados para propagação vegetativa são, por exemplo, mudas, culturas de calos, rizomas ou bulbos. Outro material de propagação inclui, por exemplo, frutas, sementes, plantas brotadas da semente, protoplastos, culturas de célula, etc. O material de propagação de preferência tem a forma de bulbos, frutas ou sementes.

Em uma modalidade adicional, a presente invenção refere-se a partes de planta colhidas de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, tal como frutas, raízes de armazenamento e outras, flores, brotos, galhos, folhas ou caules, de preferência sementes, frutas ou bulbos, essas partes que podem ser colhidas compreendendo células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção.

De preferência, a presente invenção refere-se a material de propagação de acordo com a invenção ou partes que podem ser colhidas de plantas de acordo com a invenção compreendendo hialuronan. Particularmente preferido é um material de propagação de acordo com a invenção ou partes que podem ser colhidas de plantas de acordo com a invenção que sintetizam hialuronan.

No contexto da presente invenção, o termo planta de batata ou batata deve ser compreendido como significando espécie de planta do gênero *Solanum*, particularmente espécies de produção de bulbo do gênero *So-*

lanum e em particular *Solanum tuberosum.*

No contexto da presente invenção, o termo planta de tomate ou tomate deve ser compreendido como significando espécie de planta do gênero *Lycopersicon*, em particular *Lycopersicon esculentum.*

A vantagem adicional da presente invenção é que as partes que podem ser colhidas, material de propagação, partes processáveis ou partes consumíveis de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção compreendem mais hialuronan do que plantas transgênicas de sintetização de hialuronan descritas na literatura. Deste modo, plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção não são apenas particularmente adequadas para uso como matéria-prima da qual hialuronan pode ser isolado, mas também podem ser usadas diretamente como gênero alimentício/ração ou para preparação de gênero alimentício/ração tendo um caráter profilático ou terapêutico (por exemplo, para profilaxia de osteoartrite, US 6.607.745). Uma vez que plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção têm teor de hialuronan maior do que as plantas descritas na literatura, a preparação de tais gêneros alimentícios/ração requer quantidades menores de partes que podem ser colhidas, material de propagação, partes processáveis ou partes consumíveis de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção. Se partes consumíveis de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção forem consumidas, por exemplo, diretamente como um chamado nutracêutico, é possível se obter um efeito possível mesmo através da ingestão de quantidades relativamente pequenas de substância. Isto pode ser de significância particular *inter alia* na produção de ração animal, uma vez que ração animal tendo um teor muito alto de componentes de planta é inadequada como ração para várias espécies animais. Em virtude da alta capacidade do hialuronan em ligar água, partes que podem ser colhidas, material de propagação, partes processáveis ou partes consumíveis de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção têm ainda a vantagem de que menos espessantes são requeridos quando gênero alimentício/ração solidificado é produzido. Deste modo, por exemplo, a produção de geléia requer menos açúcar, que está associado a

um efeito positivo adicional sobre a saúde. Na produção de gênero alimentício/ração requerendo a desidratação do material de planta bruto, a vantagem de uso de partes que podem ser colhidas, material de propagação, partes processáveis ou partes consumíveis de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção consiste no fato de que menos água tem que ser removida do material de planta em questão, resultando em custos de produção menores e, devido a métodos de preparação mais suaves (por exemplo, aplicação de calor menor e/ou mais curta), um valor nutricional elevado do gênero alimentício/ração em questão. Deste modo, por exemplo, na produção de *ketchup* de tomate menos energia tem que ser introduzida a fim de se obter a consistência desejada.

A presente invenção provê ainda um processo para preparação de uma planta que sintetiza hialuronan, o qual compreende:

a) modificar geneticamente uma planta, onde a modificação genética compreende etapas i a ii abaixo

i) introdução de uma molécula de ácido nucléico estranha codificando uma hialuronan sintase na célula de planta

ii) introdução de uma modificação genética na célula de planta, a modificação genética resultando em um aumento da atividade de uma proteína tendo a atividade enzimática de uma GFAT comparado com células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificadas

onde as etapas i a ii podem ser realizadas em qualquer ordem, individualmente, ou quaisquer combinações de etapas i a ii podem ser realizadas simultaneamente

b) regeneração de uma planta a partir de células de planta da etapa a);

c) geração, se apropriado, de plantas adicionais usando as plantas de acordo com a etapa b), onde, se apropriado, as células de planta são isoladas de plantas de acordo com a etapa b) e as etapas de processo a) a c) são repetidas até que uma planta seja gerada a qual tem uma molécula de ácido nucléico estranha codificando uma hialuronan sintase e tem uma atividade aumentada de uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma

GFAT comparado com as células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificadas correspondentes.

A presente invenção refere-se de preferência a processos para preparação de uma planta que sintetiza hialuronan que compreende

a) modificar geneticamente uma célula de planta, onde a modificação genética compreende etapas i a ii abaixo em qualquer ordem ou quaisquer combinações de etapas i a ii podem ser realizadas ou individualmente ou simultaneamente,

i) introdução de uma molécula de ácido nucléico estranha codificando uma hialuronan sintase na célula de planta

ii) introdução de uma modificação genética na célula de planta, a modificação genética resultando em um aumento na atividade de uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT comparado com células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificadas

b) regeneração de uma planta a partir de células de planta compreendendo a modificação genética de acordo com as etapas

i) a) i

ii) a) ii

iii) a) i e a) ii,

c) introdução em células de planta de plantas de acordo com a etapa

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

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

e regeneração de uma planta

d) geração, se apropriado, de plantas adicionais com o auxílio das plantas obtidas de acordo com qualquer etapa b) iii ou c) i ou c) ii.

As modificações genéticas introduzidas de acordo com a etapa a) na célula de planta podem a princípio ser qualquer tipo de modificação resultando em uma atividade aumentada de uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT.

A regeneração das plantas de acordo com a etapa b) e, se apropriado, etapa c) dos processos de acordo com a invenção pode ser reali-

zada usando métodos conhecidos da pessoa versada na técnica (descrito, por exemplo, em Plant Cell Culture Protocols, 1999, editado por R.D. Hall, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2).

A geração de plantas adicionais (dependendo do processo de acordo com a etapa c) ou etapa d)) dos processos de acordo com a invenção pode ser realizada, por exemplo, através de propagação vegetativa (por exemplo, através de mudas, bulbos ou através de cultura de calos e regeneração de plantas intactas) ou através de propagação geradora. Neste contexto, propagação geradora geralmente acontece sob condições controladas, isto é, plantas selecionadas com características específicas são hibridizadas umas com as outras e multiplicadas. A geração de preferência acontece de tal maneira que as plantas adicionais (dependendo dos processos gerados de acordo com a etapa c) ou etapa d)) compreendem as modificações introduzidas nas etapas precedentes.

Em processos de acordo com a invenção para a preparação de plantas que sintetizam hialuronan, as modificações genéticas para geração das células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção podem ser realizadas simultaneamente ou em etapas sucessivas. Aqui, é insignificante se o mesmo método para a modificação genética introduzindo uma molécula de ácido nucléico estranha codificando uma hialuronan sintase na célula de planta é usado para modificações genéticas sucessivas resultando em uma atividade aumentada de uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT.

Em uma modalidade adicional de processos de acordo com a invenção para preparação de uma planta que sintetiza hialuronan, a modificação genética consiste na introdução de pelo menos uma molécula de ácido nucléico estranha no genoma da célula de planta, onde a presença ou expressão da(s) molécula(s) de ácido nucléico estranha(s) resulta em uma atividade aumentada de uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT na célula de planta.

Como já descrito acima para as moléculas de ácido nucléico estranhas introduzidas para modificação genética na célula de planta ou

planta, o que é introduzido na etapa a) dos processos de acordo com a invenção para preparação de uma planta que sintetiza hialuronan pode ser uma molécula de ácido nucléico individual ou uma pluralidade de moléculas de ácido nucléico. Então, as moléculas de ácido nucléico estranhas codificando uma hialuronan sintase e/ou codificando uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT podem estar presentes juntas em uma única molécula de ácido nucléico, ou elas podem estar presentes em moléculas de ácido nucléico separadas. Se as moléculas de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase e codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT estiverem presentes em uma pluralidade de moléculas de ácido nucléico, essas moléculas de ácido nucléico podem ser introduzidas simultaneamente ou em etapas sucessivas em uma célula de planta.

Ainda, para introduzir uma molécula de ácido nucléico estranha na prática de processos de acordo com a invenção para preparação de uma planta que sintetiza hialuronan, é possível usar, ao invés de uma célula de planta do tipo selvagem ou planta do tipo selvagem, células mutantes ou mutantes que são distinguidos pelo fato de que eles já têm uma atividade aumentada de uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT. Se a célula mutante ou o mutante já tiver uma atividade aumentada de uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT comparado com as células de planta do tipo selvagem ou plantas do tipo selvagem correspondentes, ela é suficiente para realizar um processo de acordo com a invenção para produção de uma planta que sintetiza hialuronan para introduzir na dita célula mutante ou mutante uma molécula de ácido nucléico estranha codificando uma hialuronan sintase. Tudo dito mais com relação ao uso de mutantes para a preparação de células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção se aplica aqui de uma maneira análoga.

Em modalidades preferidas, a presente invenção refere-se a um processo de acordo com a invenção para produção de uma planta que sintetiza hialuronan, onde a molécula de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase na etapa a) é selecionada do grupo consistindo em:

a) moléculas de ácido nucléico caracterizadas pelo fato de que elas codificam uma hialuronan sintase viral,

b) moléculas de ácido nucléico caracterizadas pelo fato de que elas codificam uma hialuronan sintase de um vírus infeccioso de *Chlorella*,

c) moléculas de ácido nucléico caracterizadas pelo fato de que elas codificam uma hialuronan sintase de um *Paramecium bursaria Chlorella* Vírus 1,

d) moléculas de ácido nucléico caracterizadas pelo fato de que elas codificam uma hialuronan sintase de um *Paramecium bursaria Chlorella* Vírus 1 de linhagem H1,

e) moléculas de ácido nucléico caracterizadas pelo fato de que os códons da molécula de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase são modificados comparado com os códons da molécula de ácido nucléico que codifica a hialuronan sintase no organismo de origem da hialuronan sintase,

f) moléculas de ácido nucléico caracterizadas pelo fato de que os códons da hialuronan sintase foram modificados de modo que eles são adaptados para a freqüência do uso dos códons da célula de planta ou da planta em cujo genoma elas devem ser integradas ou são integradas,

g) moléculas de ácido nucléico caracterizadas pelo fato de que elas codificam uma hialuronan sintase tendo a seqüência de aminoácido mostrada sob SEQ ID NO 2 ou que elas codificam uma hialuronan sintase cuja seqüência de aminoácido é pelo menos 70%, de preferência pelo menos 80%, particularmente de preferência pelo menos 90%, especialmente de preferência pelo menos 95% e com mais preferência pelo menos 98% idêntica à seqüência de aminoácido mostrada sob SEQ ID NO 2,

h) moléculas de ácido nucléico caracterizadas pelo fato de que elas codificam uma proteína cuja seqüência de aminoácido pode ser derivada da região de codificação da seqüência de ácido nucléico inserida no plasmídeo DSM16664 ou que elas codificam uma proteína cuja seqüência de aminoácido é pelo menos 70%, de preferência, pelo menos 80%, particularmente de preferência pelo menos 90%, especialmente de preferência pelo

menos 95% e com mais preferência pelo menos 98% idêntica à seqüência de aminoácido que pode ser derivada da região de codificação da seqüência de ácido nucléico inserida no plasmídeo DSM16664,

i) moléculas de ácido nucléico compreendendo uma seqüência de ácido nucléico mostrada sob SEQ ID NO 1 ou SEQ ID NO 3 ou sendo pelo menos 70%, de preferência pelo menos 80%, com preferência pelo menos 90%, especialmente de preferência pelo menos 95% e com mais preferência pelo menos 98% idêntica à seqüência de ácido nucléico mostrada sob SEQ ID NO 1 ou SEQ ID NO 3;

j) moléculas de ácido nucléico compreendendo a seqüência de ácido nucléico inserida no plasmídeo DSM16664 ou sendo pelo menos 70%, de preferência pelo menos 80%, com preferência pelo menos 90%, especialmente de preferência pelo menos 95% e com mais preferência pelo menos 98% idêntica à seqüência de ácido nucléico mostrada inserida no plasmídeo DSM16664,

k) moléculas de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase, onde as seqüências de ácido nucléico codificando a hialuronan sintase são ligadas a elementos reguladores (promotor) que iniciam a transcrição em células de planta ou;

l) moléculas de ácido nucléico de acordo com k) onde os promotores são promotores específicos de tecido, particularmente de preferência promotores que iniciam a iniciação de transcrição especificamente em células de bulbo, fruta ou semente de planta.

Em modalidades preferidas, a presente invenção refere-se a processos de acordo com a invenção para produção de uma planta que sintetiza hialuronan, onde a molécula de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT é selecionada do grupo consistindo em:

a) moléculas de ácido nucléico caracterizadas pelo fato de que elas codificam uma proteína tendo a atividade de uma GFAT se originando de bactérias, animais ou plantas, de preferência de *Escherichia coli* ou do camundongo;

b) moléculas de ácido nucléico caracterizadas pelo fato de que

elas codificam uma proteína tendo a atividade de uma GFAT de um vírus infeccioso de *Chlorella*;

c) moléculas de ácido nucléico caracterizadas pelo fato de que elas codificam uma proteína tendo a atividade de uma GFAT de um *Paramecium bursaria Chlorella* vírus;

d) moléculas de ácido nucléico caracterizadas pelo fato de que os códons da molécula de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT são modificados comparado com os códons de uma molécula de ácido nucléico codificando a proteína correspondente tendo a atividade de uma GAFT do organismo de origem;

e) moléculas de ácido nucléico caracterizadas pelo fato de que os códons da proteína tendo a atividade de uma GFAT são modificados de modo que eles são adaptados para a freqüência do uso dos códons da célula de planta ou da planta em cujo genoma elas devem ser integradas ou são integradas;

f) moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a seqüência de aminoácido mostrada sob SEQ ID NO 5 ou uma proteína tendo a seqüência de aminoácido mostrada sob SEQ ID NO 7 ou uma proteína tendo a seqüência de aminoácido mostrada sob SEQ ID NO 9;

g) moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína cuja seqüência é pelo menos 70%, de preferência pelo menos 80%, com preferência pelo menos 90%, especialmente de preferência pelo menos 95% e com mais preferência pelo menos 98% idêntica à seqüência de aminoácido mostrada sob SEQ ID NO 5 ou sob SEQ ID NO 7 ou sob SEQ ID NO 9;

h) moléculas de ácido nucléico compreendendo a seqüência de ácido nucléico mostrada sob SEQ ID NO 4 ou uma seqüência complementar a ela ou a seqüência de ácido nucléico mostrada sob SEQ ID NO 6 ou uma seqüência complementar a ela ou a seqüência de ácido nucléico mostrada sob SEQ ID NO 8 ou uma seqüência complementar a ela ou a seqüência de ácido nucléico mostrada sob SEQ ID NO 10 ou uma seqüência complementar a ela;

i) moléculas de ácido nucléico que são pelo menos 70%, de pre-

ferência pelo menos 80%, com preferência pelo menos 90%, especialmente de preferência pelo menos 95% e com mais preferência pelo menos 98% idêntica às seqüências de ácido nucléico descritas sob h);

j) moléculas de ácido nucléico que hibridizam sob condições estringentes com pelo menos um filamento das seqüências de ácido nucléico descritas sob f) ou h);

k) moléculas de ácido nucléico cuja seqüência de nucleotídeo difere da seqüência das moléculas de ácido nucléico mencionadas sob f) ou h) devido à degeneração do código genético; e

l) moléculas de ácido nucléico que são fragmentos, variantes alélicas e/ou derivados das moléculas de ácido nucléico mencionadas sob a), b), c), d), e), f) ou h),

m) moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT, onde as seqüências de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT são ligadas a elementos reguladores (promotor) que iniciam a transcrição em células de planta ou

n) moléculas de ácido nucléico de acordo com m), onde os promotores são promotores específicos de tecido, particularmente de preferência promotores que iniciam a transcrição especificamente em células de bulbo, folha, fruta ou semente de planta.

Em uma modalidade adicional preferida, processos de acordo com a invenção para produção de uma planta que sintetiza hialuronan são usados para produção de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção.

A presente invenção também provê plantas obteníveis através de um processo de acordo com a invenção para produção de uma planta que sintetiza hialuronan.

A presente invenção refere-se ainda a um processo para produção de hialuronan que compreende a etapa de extração de hialuronan de células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção, de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, de material de propagação de acordo com a invenção, de partes de planta que podem

ser colhidas de acordo com a invenção ou de plantas ou partes dessas plantas obteníveis através de um processo de acordo com a invenção para produção de plantas que sintetizam hialuronan.

De preferência, tal processo também compreende a etapa de coleta das células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção, das plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, do material de propagação de acordo com a invenção, das partes de planta que podem ser colhidas de acordo com a invenção, das partes de planta processáveis de acordo com a invenção antes da extração do hialuronan, e particularmente de preferência ainda a etapa de cultivo de células de planta geneticamente de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção antes da coleta.

Em contraste com tecidos bacterianos ou animais, tecidos de planta não têm quaisquer hialuronidases e não contêm quaisquer hialaderinas. Deste modo, como já descrito acima, extração de hialuronan a partir de tecidos de planta é possível usando métodos relativamente simples. Se necessário, os extratos aquosos, descritos acima, de células ou tecidos de planta contendo hialuronan podem ser purificados mais usando métodos conhecidos da pessoa versada na técnica, tal como, por exemplo, precipitação repetida com etanol. Um método preferido para purificação de hialuronan é descrito sob os Métodos Gerais item 2.

Os processos já descritos para extração de hialuronan de células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção são também adequados para isolamento de hialuronan de material de propagação de acordo com a invenção, de partes de planta que podem ser colhidas de acordo com a invenção ou de plantas ou partes dessas plantas obteníveis através de um processo de acordo com a invenção para preparação de plantas que sintetizam hialuronan.

A presente invenção também provê o uso de células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção, plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, material de propagação de

acordo com a invenção, partes de planta que podem ser colhidas de acordo com a invenção, partes de planta processáveis de acordo com a invenção ou plantas obteníveis através de um processo de acordo com a invenção para preparação de hialuronan.

A presente invenção refere-se ainda a composições compreendendo células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção. Aqui, é insignificante se as células de planta são intactas ou não mais intactas porque elas foram destruídas, por exemplo, através de processamento. As composições são de preferência gêneros alimentícios ou ração, produtos farmacêuticos ou cosméticos.

A presente invenção provê de preferência composições compreendendo componentes de células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção, de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, de material de propagação de acordo com a invenção, de partes de planta que podem ser colhidas de acordo com a invenção ou de plantas que podem ser obtidas através de um processo de acordo com a invenção e compreendendo moléculas de ácido nucléico recombinantes, onde as moléculas de ácido nucléico recombinantes são caracterizadas pelo fato de que elas compreendem moléculas de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase e proteínas tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT.

Uma integração estável de moléculas de ácido nucléico estranhas no genoma de uma célula de planta ou planta resulta nas moléculas de ácido nucléico estranhas sendo flanqueadas após integração ao genoma de uma célula de planta ou planta por seqüências de ácido nucléico. Deste modo, em uma modalidade preferida, composições de acordo com a invenção são caracterizadas pelo fato de que as moléculas de ácido nucléico recombinantes presentes na composição de acordo com a invenção são flanqueadas por seqüências de ácido nucléico de planta genômicas. Aqui, as seqüências de ácido nucléico de planta genômicas podem ser quaisquer seqüências naturalmente presentes no genoma da célula de planta ou planta usada para preparação da composição.

As moléculas de ácido nucléico recombinantes presentes nas

composições de acordo com a invenção podem ser moléculas de ácido nucléico recombinantes individuais ou várias moléculas de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase e proteínas tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT que estão presentes em uma molécula de ácido nucléico, ou aquelas onde as moléculas de ácido nucléico podem estar presentes em moléculas de ácido nucléico recombinantes separadas. Moléculas de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase ou codificando uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT podem estar presentes juntas em uma molécula de ácido nucléico recombinante única, ou duas das moléculas de ácido nucléico mencionadas podem estar presentes juntas em uma molécula de ácido nucléico recombinante única e a terceira molécula de ácido nucléico pode estar presente em outra molécula de ácido nucléico recombinante em qualquer combinação possível, ou todas as moléculas de ácido nucléico mencionadas podem em cada caso estar presentes em moléculas de ácido nucléico recombinantes separadas individuais. Dependendo de como as moléculas de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase ou codificando uma proteína tendo a atividade (enzimática) de uma GFAT estão presentes em uma composição de acordo com a invenção, elas podem ser flanqueadas por seqüências de ácido nucléico de planta genômicas idênticas ou diferentes.

As composições de acordo com a invenção que compreendem moléculas de ácido nucléico recombinantes podem ser demonstradas usando métodos conhecidos da pessoa versada na técnica, tal como, por exemplo, métodos baseados em hibridização ou, de preferência, usando métodos baseados em PCR (reação de cadeia de polimerase).

De preferência, composições de acordo com a invenção compreendem pelo menos 0,005%, com preferência pelo menos 0,01%, particularmente de preferência pelo menos 0,05% e especialmente de preferência pelo menos 0,1% de hialuronan. De preferência, as composições de acordo com a invenção compreendem no máximo 5%, com preferência no máximo 2%, particularmente de preferência no máximo 1% e especialmente de preferência pelo menos 0,5% de hialuronan.

Como já mencionado acima, é possível usar células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção, plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, material de propagação de acordo com a invenção, partes de planta que podem ser colhidas de acordo com a invenção, partes de planta que podem ser processadas de acordo com a invenção, partes de planta que podem ser consumidas de acordo com a invenção ou plantas que podem ser obtidas através de um processo de acordo com a invenção para preparar gêneros alimentícios ou ração. No entanto, uso como matérias-primas para aplicações industriais é também possível, sem hialuronan tendo que ser isolado. Deste modo, por exemplo, plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou partes de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção podem ser aplicadas a áreas sob cultivo agricultural para se obter ligação de água aumentada do solo. Ainda, plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção podem ser usadas para preparação de agentes de secagem (por exemplo, para uso quando embarcando itens sensíveis à umidade) ou como absorvedores de líquidos (por exemplo, em fraldas ou para absorção de líquidos aquosos derramados). Para tais aplicações, é possível usar plantas geneticamente modificadas inteira de acordo com a invenção, partes das plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas cominuídas (por exemplo, moídas) de acordo com a invenção ou partes de planta de acordo com a invenção, conforme requerido. Adequadas para aplicações onde plantas ou partes de planta moídas são usadas são em particular partes de planta contendo hialuronan, mas apenas uma proporção baixa de água. Essas são de preferência grãos de plantas cereais (milho, arroz, trigo, centeio, aveias, cevada, sagu ou sorgo). Uma vez que células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção e plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção têm um teor de hialuronan maior do que as plantas transgênicas descritas na literatura, comparado com essas menos material tem que ser usado para aplicações industriais quando é feito usado de células de planta genetica-

mente modificadas de acordo com a invenção ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção.

A presente invenção também provê processos para preparação de uma composição de acordo com a invenção,onde células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção, material de propagação de acordo com a invenção, partes de planta que podem ser colhidas de acordo com a invenção, partes de planta processáveis de acordo com a invenção, partes de planta consumíveis de acordo com a invenção ou plantas que podem ser obtidas através de um processo de acordo com a invenção para a produção de uma planta que sintetiza hialuronan são usados. Os processos para preparação de uma composição de acordo com a invenção são de preferência processos para preparação de gênero alimentício ou ração, processos para preparação de um produto farmacêutico ou processos para preparação de um produto cosmético.

Processos para preparação de gêneros alimentícios e ração são conhecidos da pessoa versada na técnica. Processos para uso de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou partes de planta de acordo com a invenção em áreas industriais são também conhecidos da pessoa versada na técnica e incluem *inter alia* cominuição ou moagem de plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção ou partes de planta de acordo com a invenção; no entanto, eles não são exclusivamente limitados a eles. Algumas das vantagens resultantes do uso de matérias-objeto de acordo com a invenção para preparação de gêneros alimentícios ração ou para uso em áreas industriais já foram acima descritas.

Um processo de acordo com a invenção para a preparação de uma composição é particularmente de preferência um processo para preparação de uma composição que compreende hialuronan.

Composições obteníveis através de um processo para preparação de uma composição de acordo com a invenção são da mesma maneira providas pela presente invenção.

A presente invenção refere-se também ao uso de células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção, plantas gene-

ticamente modificadas de acordo com a invenção, material de propagação de acordo com a invenção, partes de planta que podem ser colhidas de acordo com a invenção, partes de planta processáveis de acordo com a invenção, partes de planta que podem ser consumidas de acordo com a invenção ou plantas obteníveis através de um processo de acordo com a invenção para produção de uma planta que sintetiza hialuronan para preparação de uma composição de acordo com a invenção. Preferência é dada ao uso de células de planta geneticamente modificadas de acordo com a invenção, plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção, material de propagação de acordo com a invenção, partes de planta que podem ser colhidas de acordo com a invenção, partes de planta processáveis de acordo com a invenção, partes de planta consumíveis de acordo com a invenção ou de plantas que podem ser obtidas através de um processo de acordo com a invenção para produção de uma planta que sintetiza hialuronan para preparação de gênero alimentício ou ração, para preparação de um agente farmacêutico ou para preparação de um produto cosmético.

DESCRIÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS

SEQ ID NO 1: Seqüência de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase de *Paramecium bursaria Chlorella* Vírus 1.

SEQ ID NO: 2 Seqüência de aminoácido de uma hialuronan sintase da *Paramecium bursaria Chlorella* Vírus 1. A seqüência de aminoácido mostrada pode ser derivada de SEQ ID NO 1.

SEQ ID NO 3: Seqüência de ácido nucléico sintética codificando uma hialuronan sintase de *Paramecium bursaria Chlorella* Vírus 1. A síntese dos códons da seqüência mostrada foi realizada de modo que ela seja adaptada para uso de códons em células de planta. A seqüência de ácido nucléico mostrada codifica para uma proteína tendo as seqüências de aminoácido mostradas sob SEQ ID NO 2.

SEQ ID NO 4: Seqüência de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-1 do camundongo.

SEQ ID NO 5: Seqüência de aminoácido de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-1 do camundongo. A seqüência de aminoácido

mostrada pode ser derivada da SEQ ID NO 4.

SEQ ID NO 6: Seqüência de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-2 do camundongo.

SEQ ID NO 7: Seqüência de aminoácido de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-2 do camundongo. A seqüência de aminoácido mostrada pode ser derivada da SEQ ID NO 6.

SEQ ID NO 8: Seqüência de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT de *Escherichia coli.*

SEQ ID NO 9: Seqüência de aminoácido de uma proteína tendo a atividade de uma GFAT de *Escherichia coli.* A seqüência de aminoácido mostrada pode ser derivada da SEQ ID NO 8.

SEQ ID NO 10: Seqüência de ácido nucléico sintética codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT de *Escherichia coli.* A síntese dos códons da seqüência mostrada foi realizada de modo que ela foi adaptada para uso de códons em células de planta. A seqüência de ácido nucléico mostrada codifica uma proteína tendo a seqüência de mino ácido mostrada sob SEQ ID NO 9.

SEQ ID NO 11: Oligonucleotídeo sintético usado no Exemplo 1.

SEQ ID NO 12: Oligonucleotídeo sintético usado no Exemplo 1.

SEQ ID NO 13: Oligonucleotídeo sintético usado como *iniciador* de PCR no Exemplo 10.

SEQ ID NO 14: Oligonucleotídeo sintético usado como *iniciador* de PCR no Exemplo 10.

Toda literatura usada, incluindo, mas não limitado a, números de acesso para ácido nucléico e seqüências de aminoácido, é incorporada na descrição a título de referência.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Mostra uma curva de calibragem e a equação correspondente da linha de regressão usada para cálculo do teor de hialuronan em tecido de planta. A curva de calibragem estabelecida com o auxílio do estojo de teste comercial (*Hyaluronic Acid (HA) test kit* da Corgenix Inc, Colorado, USA, Nº do produto 029-001) e as soluções padrão fornecidas com ele.

MÉTODOS GERAIS

Métodos que podem ser usados em conexão com a presente invenção são descritos abaixo. Esses métodos são modalidades específicas; no entanto, a presente invenção não é limitada a esses métodos. A pessoa versada na técnica sabe que a invenção pode ser realizada da mesma maneira através da modificação dos métodos descritos e ou substituindo métodos individuais ou partes de métodos por métodos alternativos ou partes alternativas de métodos.

1.TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS DE BATATA

Plantas de batata foram transformadas com o auxílio de *Agrobacterium,* conforme descrito em Rocha-Sosa e outros (*EMBO J.,* 8, (1989) 23-29).

2. ISOLAMENTO DE HIALURONAN DE TECIDO DE PLANTA

Para detectar a presença de hialuronan e para determinar o teor de hialuronan em tecido de planta, material de planta foi desenvolvido como segue: 200 µl de água (desmineralizada, condutividade ≥ 18 ΩM) foram adicionados a cerca de 0,3 g de material, e a mistura foi cominuída em um moedor de bola oscilatório de laboratório (MM200, da Retsch, Alemanha, 30 seg a 30 Hz). Mais 800 µl de água (desmineralizada, condutividade ≥18ΩM) foram então adicionados, e a mistura foi bem misturada (usando, por exemplo, um misturador Vortex). Restos de célula e componentes insolúveis foram separados do sobrenadante através de centrifugação a 16.000 xg por 5 minutos.

3. PURIFICAÇÃO DE HIALURONAN

Cerca de 100 gramas de bulbos foram descascados, cortados em pedaços de um tamanho de cerca de 1 cm^3 e, após adição de 100 ml de água (desmineralizada, condutividade ≥18ΩM) cominuídos em um misturador Warring em uma velocidade máxima por cerca de 30 segundos. Os restos de célula foram então removidos usando uma peneira de chá. Os restos de célula que tinham sido removidos foram ressuspensos em 300 ml de água (desmineralizada, condutividade ≥18ΩM) e novamente removidos usando uma peneira de chá. As duas suspensões obtidas (100 ml + 300 ml) fo-

ram combinadas e centrifugadas a 13 000 xg por 15 minutos. NaCl foi adicionado ao sobrenadante de centrifugação obtido até uma concentração final de 1% ter sido atingida. Após o NaCl ter passado para solução, precipitação foi realizada através da adição de duas vezes o volume de etanol seguido por mistura completa e incubação a -20º C da noite para o dia. A mistura foi então centrifugada a 13 000 xg por 15 minutos. O precipitado sedimentado obtido após esta centrifugação foi dissolvido em 100 ml de tampão (TrisHCl a 50 mM, pH 8, $CaCl_2$ a 1 mM) e proteinase K foi então adicionada para uma concentração final de 100 µg ml e a solução foi incubada a 42º C por 2 horas. Isto foi seguido por 10 minutos de incubação a 95º C. Mais uma vez, NaCl foi adicionado a esta solução até que uma concentração final de 1% tivesse sido atingida. Após o NaCl ter passado para solução, outra precipitação foi realizada através da adição de duas vezes o volume de etanol, mistura completa e incubação a -20º C por cerca de 96 horas. Isto foi seguido por 15 minutos de centrifugação a 13 000 xg. O precipitado sedimentado obtido após esta centrifugação foi dissolvido em 30 ml de água (desmineralizada, condutividade ≥18ΩM), e, mais uma vez, NaCl foi adicionado para uma concentração final de 1%. Através da adição de duas vezes o volume de etanol, mistura completa e incubação a -20º C da noite para o dia, outra precipitação foi realizada. O precipitado obtido após centrifugação subseqüente a 13 000 xg por 15 minutos foi dissolvido em 20 ml de água (desmineralizada, condutividade 18 M).

Purificação adicional foi realizada através de filtragem centrífuga. Para esta finalidade, em cada caso 5 ml do precipitado dissolvido foram aplicados ao filtro de membrana (CentriconAmicon, largura do poro 10 000 NMWL, Nº do produto UCF8 010 96) e a amostra foi centrifugada a 2200 xg até que apenas cerca de 3 ml da solução acima do filtro permanecessem. Mais duas vezes, em cada caso 3 ml de água (desmineralizada, condutividade ≥18ΩM) foram então adicionados à solução acima da membrana e em cada caso recentrifugados sob condições idênticas até, no final, cerca de 3 ml da solução acima do filtro permanecerem. As soluções ainda presentes acima da membrana após filtragem centrífuga foram tomadas, e a membra-

na foi enxaguada repetidamente (três a cinco vezes) com cerca e 1,5 ml de água (desmineralizada, condutividade ≥18ΩM). Todas as soluções que estavam ainda presentes acima da membrana e as soluções obtidas do enxágüe foram combinadas. NaCl foi adicionado para uma concentração final de 1%, após o NaCl ter passado para solução, duas vezes o volume de etanol foi adicionado, a amostra foi misturada e um precipitado foi obtido através de armazenamento a -20º C da noite para o dia. O precipitado obtido após centrifugação subseqüente a 13 000 xg por 15 minutos foi dissolvido em 4 ml de água (desmineralizada, condutividade ≥18ΩM) e então seco com congelamento (24 horas sob uma pressão de 37 Pa (0,37 mbar), aparelho de secagem com congelamento Christ Alpha 1-4 da Christ, Osterode, Alemanha).

4. DETECÇÃO DE HIALURONAN E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HIALURONAN

Hialuronan foi detectado usando um teste comercial (*Hyaluronic acid (HA) test kit* da Corgenix, Inc., Colorado, USA, Nº do produto 029-001) de acordo com as instruções do fabricante que são aqui incorporadas a título de referência. O princípio do teste é baseado na disponibilidade de uma proteína que se liga especificamente a hialuronan (HABP) e é realizado similarmente a um ELISA, onde uma reação de cor indica o teor de hialuronan na amostra examinada. Deste modo, para a determinação quantitativa de hialuronan, as amostras a serem medidas devem ser empregadas em uma concentração de modo que ela esteja dentro dos limites declarados (por exemplo, diluição da amostra em questão ou uso de menos água para extração de hialuronan do tecido de planta, dependendo de se um limite foi excedido ou não atingido). Em bateladas paralelas, alíquotas das amostras a serem determinadas foram inicialmente submetidas à digestão por hialuronidase e então medidas usando o teste comercial (*Hyaloronic acid (HA) test kit* da Corgenix, Inc., Colorado, USA, Nº do produto 029-001). Digestão por hialuronidase foi realizada usando 400 µl de extrato de bulbo de batata em tampão de hialuronidase (tampão de fosfato de potássio a 0,1 M, pH 5,3; NaCl a 150 mM) através da adição de 5 µg (~3 unidades) de hialuronidase (hialuronidase tipo III da Sigma, Nº do produto H2251) e incubação a 37º C

por 30 min. Em cada caso em uma diluição de 1:10, todas as amostras foram então usadas para determinação do teor de hialuronan.

5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE UMA GFAT

A atividade de uma proteína tendo a atividade de GFAT é determinada conforme descrito em Rachel e outros (1996, *J. Bacteriol.* 178(8), 2320-2327). Para distinguir se uma proteína tem a atividade de uma GFAT-1 ou GFAT-2, o método descrito por Hu e outros (2004, *J. Biol. Chem.* 279 (29),29988-29993) é usado.

6. TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ

Plantas de arroz foram transformadas através do método descrito por Hiei e outros (1994, *Plant Journal* 6(2), 271-282).

7. TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS DE TOMATE

Plantas de tomate foram transformadas com o auxílio de *Agrobacterium* de acordo com o método descrito na US 5.565.347.

EXEMPLOS

1. PREPARAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE PLANTA IR 47-71

O plasmídeo pBinAR é derivado do plasmídeo do vetor binário pBin19 (Bevan, 1984, *Nucl. Acids Res.* 12: 8711-8721) que foi construído como segue:

Um fragmento de um comprimento de 529 pb que compreendia os nucleotídeos 6909-7437 do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor foi isolado como fragmento de *EcoRI/KpnI* do plasmídeo pDH51 (Pietrzak e outros, 1986 *Nucleic Acids Res.* 14, 5858) e ligado entre os sítios de restrição *EcoRI* e *KpnI* do poliligante de pUC18. Desta maneira, o plasmídeo pUC18-35S foi formado. Usando as endonucleases de restrição *HinD III* e *Pvu II*, um fragmento de comprimento de 192 pb que incluía o sinal de poliadenilação (terminal 3') do gene da *Octopin Synthase* (gene 3) do T-DNA do plasmídeo Ti pTiACH5 (Gielen e outros, 1984, *EMBO Journal* 3, 835-846) (nucleotídeos 11 749-11 939) foi isolado do plasmídeo pAGV40 (Herrera-Estrella e outros, 1983 *Nature*, 303, 209-213). Seguindo a adição de ligantes *SphI* ao sítio de restrição *Pvu II*, o fragmento foi ligado entre os sítios de restrição *Sph I* e *Hind II* de pUC18-35S. Isto deu o plasmídeo pA7. Aqui, o poli-

ligante completo compreendendo o promotor 35S e terminador *ocs* foi removido usando *EcoRI* e *Hind III* e ligado ao vetor apropriadamente clivado pBin19. Isto deu o vetor de expressão de planta pBinAR (Höfgen and Wilmitzer, 1990, *Plant Science* 66, 221-230).

O promotor do gene patatina B33 de *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa e outros, 1989, *EMBO J.* 8, 23-29) era, como fragmento de *Dra I* (nucleotídeos -1512 +14), ligado ao vetor clivado por *Sst I* pUC19 cujas extremidades tinham sido cegadas usando T4-DNA polimerase. Isto deu o plasmídeo pUC19-B33. A partir deste plasmídeo, o promotor B33 foi removido usando *EcoR I* e *Sma I* e ligado ao vetor pBinAR apropriadamente restrito. Isto deu o vetor de expressão de planta pBinB33. Para facilitar etapas de clonagem adicionais, o MCS (Sítio de Clonagem Mútiplo (*Multiple Cloning Site)*) foi estendido. Para esta finalidade, dois oligonucleotídeos foram sintetizados, aquecidos a 95º C por 5 minutos, lentamente esfriados para temperatura ambiente para permitir boa fixação (anelamento) e clonados nos sítios de restrição *Sal I* e *Kpn I* de pBinB33. Os oligonucleotídeos usados para este propósito tinham a seqüência que segue:

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

O plasmídeo foi chamado IR 47-71.

2. PREPARAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE PLANTA PBINARHYG

O fragmento compreendendo o promotor 35S, o terminador *ocs* e o Sítio de Clonagem Múltiplo foi removido de pA7 usando as endonucleases de restrição *EcoR I* e *Hind III* e clonado no vetor pBIBHyg (Becker, 1990, *Nuclei Acids Res.* 18, 203) que tinha sido cortado usando as mesmas endonucleases de restrição. O plasmídeo obtido foi chamado pBinARHyg.

3. PREPARAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE PLANTA PBINB33-HYG

O fragmento de *EcoRI/HIndIII* compreendendo o promotor B33, parte do poliligante e o terminador *ocs* foi excisado do plasmídeo pBinB33 e ligado ao vetor apropriadamente restrito pBIB-Hyg (Becker, 1990, *Nucleic*

Acids Res. 18, 203). O vetor de expressão de planta obtido foi chamado pBinB33-Hyg.

4. SÍNTESE DE MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO

a) Síntese de moléculas de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase de *Paramecium bursaria Chlorella* Vírus 1

A seqüência de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase (HAS) e *Paramecium bursaria Chlorella* Vírus 1 foi sintetizada por Medigenomix GmbH (Munique, Alemanha) e clonada no vetor pCR2.1 da Invitrogen (Nº do produto K2000-01).

O plasmídeo obtido foi chamado IC 323-215. A seqüência de ácido nucléico sintética codificando a proteína HAS de *Paramecium bursaria Chlorella* Vírus 1 é mostrada sob SEQ ID NO 3. A seqüência de ácido nucléico correspondente originalmente isolada do *Paramecium bursaria Chlorella* Vírus 1 é mostrada sob SEQ ID NO 1.

b) Síntese de moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT de *Escherichia coli*

A seqüência de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT de *Escherichia coli* foi sintetizada pela Entelechon GmbH e clonada no vetor pCR4Topo da Invitrogen (Nº do produto K4510-20). O plasmídeo obtido foi chamado IC 373-256. A seqüência de ácido nucléico sintética codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT de *Escherichia coli* é mostrada sob SEQ ID NO 10. A seqüência de ácido nucléico correspondente originalmente isolada de *Escherichia coli* é mostrada sob SEQ ID NO 8.

5. ORIGEM DE MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO ADICIONAIS

a) Moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-1 do camundongo

A seqüência de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-1 foi comprada da BioCat GmbH, Heidelberg (Art. Nº MMM1013-65346, clone de cDNA MGC:58262, IMAGE:6742987). Este é um clone produzido pela I.M.A.G.E. Konsortium (http://image.llnl.gov) e distribuído pela BioCat GmbH. Aqui, o cDNA codificando uma proteína tendo a

atividade de uma GFAT-1 foi clonado no vetor pCMV Sport 6 da Invitrogen. O plasmídeo obtido foi chamado IC 365-256. A seqüência de ácido nucléico, inserida no IC 365-256, codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-1 de *Mus musculus* tem, comparado com a seqüência de ácido nucléico mostrada sob SEQ ID NO 4, uma troca de base de T para C na posição 1090 e uma troca de base de G para A na posição 2027. Essas trocas de base não resultam em trocas de aminoácido das seqüências de aminoácido codificadas pelas duas moléculas de ácido nucléico diferentes. A seqüência de ácido nucléico de codificação para a proteína tendo a atividade de uma GFAT-1 do camundongo é mostrada na SEQ ID NO: 4. Para facilitar as etapas de clonagem subseqüentes, a seqüência codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-1 foi isolada usando as endonucleases de restrição XhoI e Eco RV de IC 365-256 e clonada no plasmídeo pME9 (vetor pBlueSkript da Stratagene) tendo um sítio de clonagem múltiplo modificado que tem adicionalmente um sítio de restrição *Pac I* em ambas extremidades, plasmídeo que tinha sido cortado com as mesmas endonucleases de restrição. O plasmídeo obtido foi chamado IC 367-256.

b) Moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-2 do camundongo

Moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-2 do camundongo foram compradas da Invitrogen (Clone ID 4167189, clone de cDNA MGC:18324, IMAGE:4167189). Este é um clone que é produzido pela I.M.A.G.E. Konsortium (http://image.llnl.gov) e distribuído pela Invitrogen. Aqui, o cDNA codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-2 é clonado no vetor pCMV Sport 6 da Invitrogen. O plasmídeo foi chamado IC 369-256. A seqüência de ácido nucléico codificando a proteína tendo a atividade de uma GFAT-2 de *Mus musculus* é mostrada sob SEQ ID NO 6.

<u>6. PREPARAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE PLANTA IC 341-222 QUE COMPREENDE UMA SEQÜÊNCIA DE ÁCIDO NUCLÉICO DE CODIFICAÇÃO PARA UMA HIALURONAN SINTASE DE *PARAMECIUM BURSARIA CHLORELLA* VÍRUS 1</u>

Usando digestão de restrição com *BamH I* e *Xho I*, moléculas de ácido nucléico compreendendo a seqüência de codificação de hialuronan sintase foram isoladas do plasmídeo IC 323-215 e clonadas nos sítios de restrição *BamH I* e *Xho I* do plasmídeo IR 47-71. O vetor de expressão de planta obtido foi chamado IC 341-222.

7. PREPARAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE PLANTA IC 399-299 COMPREENDENDO UMA SEQÜÊNCIA DE ÁCIDO NUCLÉICO DE CODIFICAÇÃO PARA UMA PROTEÍNA TENDO A ATIVIDADE DE UMA GFAT-2 DO CAMUNDONGO

Usando digestão de restrição com *Xho I* e *Asp* 718, moléculas de ácido nucléico compreendendo a seqüência de codificação para uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-2 do camundongo foram isoladas do plasmídeo 369-256 e clonadas no vetor de expressão de planta pBinB33-Hyg que tinha sido cortado com as mesmas endonucleases de restrição. O vetor de expressão de planta foi chamado IC 399-299.

8. PREPARAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE PLANTA IC 399-300 COMPREENDENDO UMA SEQÜÊNCIA DE ÁCIDO NUCLÉICO DE CODIFICAÇÃO PARA UMA PROTEÍNA TENDO A ATIVIDADE DE UMA GFAT DE *E COLI*

Moléculas de ácido nucléico compreendendo a seqüência de codificação da proteína tendo a atividade de uma GFAT de *E. coli* foram isoladas do plasmídeo 373-256 através de digestão com restrição com *Sac I* e *Sbf I* e clonadas no vetor de expressão de planta pBinB33-Hyg que tinha sido cortado com as mesmas endonucleases de restrição. O vetor de expressão de planta obtido foi chamado IC 399-300.

9. PREPARAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE PLANTA PBA16, QUE CONTÉM UMA SEQÜÊNCIA DE ÁCIDO NUCLÉICO DE CODIFICAÇÃO PARA UMA HIALURONAN SINTASE DE *PARAMECIUM BURSARIA CHLORELLA* VÍRUS 1

Usando a endonuclease de restrição *Asp* 718I, um fragmento compreendendo a seqüência de ácido nucléico de codificação para uma hialuronan sintase de *Paramecium bursaria Chlorella* Vírus 1 foi isolada do

plasmídeo IC 323-215, as extremidades do fragmento foram cegadas usando polimerase Klenow e o fragmento resultante foi então mais uma vez clivado usando a endonuclease de restrição *Pac* I. O fragmento obtido desta maneira foi ligado no plasmídeo IR103-123 (descrito no WO 2006 032538), que tinha sido clivado usando as endonucleases de restrição *Pac* I e *Ecl136* II. O vetor de expressão de planta obtido foi referido como pBA16.

10. PREPARAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE PLANTA IC 386-299

O DNA do promotor prolamin de arroz (Nº de Acesso EMBL D63901, Sha e outros, 1996, *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, 335-337, Wu e outros, 1998, *Plant Cell Physiol.* 39(8), 885-889) foi amplificado usando DNA genômico isolado de folhas de *Oryza sativa* (cultivar M202).

CONDIÇÕES USADAS PARA AMPLIFICAÇÃO POR PCR:

Para amplificação, a polimerase de DNA *Expand High Fidelity* (PCR Systems, Roche Nº Prod. 1732641) foi usada. As condições e tampões fornecidos pelo fabricante do estojo acima mencionado foram usados.

DNA: 50 ng do DNA de arroz genômico

dNTPs: 0,83 µM de dNTP Mix

0,25 µM de Iniciador prol-F1

5´-AAAAACTAGTTCTACATCGGCTTAGGTGTAGCAACACG

0,25 µM de Iniciador prol-R1

5´- AAAAGATATCTGTTGTTGGATTCTACTACTATGCTTCAA

Condições de reação: Etapa 1 94º C 15 seg

Etapa 2 60º C 15 seg

Etapa 3 72º C 45 seg

As Etapas 1 a 3 foram repetidas 35 vezes antes da reação ser esfriada para 4º C. O fragmento obtido através de amplificação por PCR foi clonado através do uso do estojo de clonagem TA (Invitrogen Nº do produto: KNM2040-01) no plasmídeo PCR 2.1. O plasmídeo resultante foi chamado MI 4-154. Um fragmento de ácido nucléico compreendendo a seqüência de codificação da proteína tendo a atividade de uma GFAT-2 do camundongo foi isolado do plasmídeo IC 369-256 através do uso das endonucleases de restrição *Not* I e *Kpn* I e clonado nos sítios *Not* I e *Kpn* I do vetor pMCS5

(comprado da MoBiTech). O plasmídeo obtido foi chamado IC 385-299. O fragmento de ácido nucléico compreendendo a seqüência de codificação da proteína tendo a atividade de uma GFAT-2 do camundongo foi isolado foi plasmídeo IC 385-299 através do uso de endonucleases de restrição *Xho* I e *Hpa* I e clonado nos sítios de restrição *Xho* I e *Ecl* 136 II do plasmídeo 9-154. O vetor de expressão de planta obtido foi chamado IC 386-299. Base para preparação de vetor MI 9-154 foi o plasmídeo ML 18-56 (WO 05 030941). Um sítio de clonagem múltiplo (MCS) compreendendo extremidades adesivas para clonagem nos sítios de restrição *Hind* II e *Pst* I e compreendendo os sítios de restrição adicionais *Pst* I, *Sac* I, *Bln* I, *Xho* I, *Hpa* I, *Spe* I e *Hind* III foi preparado através de anelamento de dois oligonucleotídeos sintéticos complementares. O oligonucleotídeo anelado foi clonado nos sítios de restrição *Hind* II e *Pst* I do plasmídeo ML 18-56. O vetor obtido foi chamado MI 8-154. O fragmento de ácido nucléico compreendendo o promotor prolamin foi isolado do plasmídeo MI 4-154 usando as endonucleases de restrição *Eco* RV e *Spe* I e clonado no vetor MI 8-154. O plasmídeo obtido foi chamado MI 9-154.

11. TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS COM VETORES DE EXPRESSÃO DE PLANTA COMPREENDENDO MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO CODIFICANDO UMA HIALURONAN SINTASE

Plantas de batata (cv Désirée) foram transformadas usando o vetor de expressão de planta IC 341-222, que compreende uma seqüência de ácido nucléico de codificação para uma hialuronan sintase de *Paramecium bursaria Chlorella* Vírus 1 sob o controle do promotor do gene patatina B33 de *Solanum tubesorum* (Rocha-Sosa e outros, 1989, *EMBO J.* 8, 23-29) usando o método dado sob Métodos Gerais item 1. As plantas de batata transgênicas obtidas, que foram transformadas com o plasmídeo IC 341-222, foram chamadas 365 ES.

12. ANÁLISE DE PLANTAS TRANSGÊNICAS TRANSFORMADAS COM VETORES DE EXPRESSÃO DE PLANTA COMPREENDENDO MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO CODIFICANDO UMA HIALURONAN SINTASE

a) Construção de uma curva de calibragem

Uma curva de calibragem foi construída usando as soluções padrão fornecidas com o estojo de teste comercial (*Hyaluronic acid (HA) test kit* da Corgenix, Inc., Colorado, USA, Prod. Nº 029-001), de acordo com os métodos descritos pelo fabricante. Para determinar a extinção a 1600 ng/ml de hialuronan, dobro da quantidade, com base na quantidade padrão fornecida indicada pelo fabricante, compreendendo 800 ng/ml de hialuronan foi usado. Em cada caso, três séries de medição independentes foram realizadas, e a média correspondente foi determinada. Isto deu a curva de calibragem que segue:

Concentração de Hialuronan	Medições individuais independentes			Média	n.d.
	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 1: Valores para construção de uma curva de calibragem para a determinação quantitativa do teor de hialuronan em tecido de planta.

Com o auxílio de *Software* (Microsoft Office Excell 2002, SP2), os valores medidos obtidos foram inseridos em um diagrama e a equação da função da linha de inclinação foi determinada (vide Figura 1). E_{450nm} refere-se à extinção em um comprimento de onda de 450 nm, s.d. é o desvio padrão da média calculada dos valores individuais.

b) Análise de bulbos de batata de linhagens 365 ES

Em uma estufa, plantas individuais da linhagem 365 ES foram cultivadas em solo em potes de 6 cm. Em cada caso cerca de 0,3 g de material de bulbos de batata das plantas individuais foi processado, de acordo com o método descrito sob Métodos Gerais item 2. Usando o método descrito sob Métodos Gerais item 4, a quantidade de hialuronan presente nos respectivos extratos de planta foi determinada, com o auxílio da curva de calibragem mostrada no Exemplo 12a) e Figura 1. Aqui, o sobrenadante obtido

após centrifugação foi usado em uma diluição de 1:10 para determinação do teor de hialuronan. Para plantas selecionadas, os resultados que seguem foram obtidos.

Nome da planta	Peso do material de planta empregado [g]	Extinção E450	Quantidade de hialuronan [ng/ml]	Hialuronan com base no peso fresco do material de planta [µg/g]
365 ES 13	0,297	2,746	14	47
365 ES 74	0,306	4,000	20816	68
Tipo selvagem	0,305	0,111	n.d.	n.d.

Tabela 2: Quantidade de hialuronan (em µg de hialuronan por g de peso fresco) produzida por plantas transgênicas independentes da linhagem 365 ES. A coluna 1 refere-se à planta da qual material de bulbo foi coletado (aqui, tipo selvagem refere-se a plantas não-transformadas que, no entanto, têm o genótipo usado como material de partida para a transformação). A Coluna 2 indica a quantidade de material de bulbo da planta em questão usada para determinação do teor de hialuronan. A Coluna 3 contém a extinção medida de uma diluição 1:10 do respectivo extrato de planta. A Coluna 4 foi calculada com o auxílio da equação de linha de regressão (vide Figura 1) levando em consideração o fator de diluição, como segue ((coluna 3 valor 0,149)/0,00185) x 10. A coluna 5 indica a quantidade de hialuronan com base no peso fresco usado e foi calculada como segue: (coluna 4 valor/coluna 2 valor)/1000. n.d. significa não-detectável.

13. TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS DE SINTETIZAÇÃO DE HIALURONAN COM VETORES DE EXPRESSÃO DE PLANTA COMPREENDENDO SEQÜÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLÉICO DE CODIFICAÇÃO PARA UMA PROTEÍNA TENDO A ATIVIDADE DE UMA GFAT DE *ESCHERICHIA COLI*

a) Transformação de plantas

Plantas de batata das linhagens 365 ES 13 e 365 ES 74 foram em cada caso transformadas com o vetor de expressão de planta IC 399-

300 usando o método dado sob Métodos Gerais item 1. As plantas de batata transgênicas obtidas após transformação da linhagem 365 Es 74 com o plasmídeo 399-300 foram chamadas 433 ES.

b) Análise de bulbos de batata da linhagem 433 ES

Em uma estufa, plantas individuais da linhagem 433 ES foram cultivadas em solo em potes de 6 cm. Em cada caso, cerca de 0,3 g de material de bulbos de batata e/ou folhas das plantas individuais foi processado, de acordo com o método descrito sob Métodos Gerais item 2. Usando o método descrito sob Métodos Gerais item 4, a quantidade de hialuronan presente nos respectivos extratos de planta foi determinada, com o auxílio da curva de calibragem mostrada no Exemplo 12a) e Figura 1. Aqui, o sobrenadante obtido após centrifugação foi usado em uma diluição de 1:10 para determinação do teor de hialuronan. Para plantas selecionadas, os resultados que seguem foram obtidos:

Nome da planta	Quantidade de HA em folhas [µg/g FG]	Quantidade de HA em bulbos [µg/g FG]
433ES 1	111,84	126,70
433ES 3	303,34	203,16
433ES 4	3142,41	
433ES 5	312,98	825,96
433ES 7	1492,94	
433ES 8	914,03	
433ES 9	1858,68	
433ES 10	357,90	
433ES 11	5962,82	
433ES 12		662,99
433ES 13	626,52	624,33
433ES 14	665,23	
433ES 15	601,36	
433ES 16	3416,94	
433ES 18	781,02	
433ES 19	3294,09	

Nome da planta	Quantidade de HA em folhas [µg/g FG]	Quantidade de HA em bulbos [µg/g FG]
433ES 28	1850,99	294,98
433ES 30	2512,40	
433ES 31	3337,54	
433ES 32	1583,60	
433ES 34	3552,44	
433ES 35	5419,43	
433ES 36	902,01	
433ES 37	829,35	
433ES 38	1536,55	
wt-1	0,40	n.d.
wt-2	0,34	n.d.
wt-3	n.d.	
365 ES 74-1	265,1	
365 ES 74-2		91,84
365 ES 74-3	193,5	
365 ES 74-4		175,48

Nome da planta	Quantidade de HA em folhas [µg/g FG]	Quantidade de HA em bulbos [µg/g FG]
433ES 20	1348,85	975,18
433ES 21	937,92	
433ES 22	1086,45	
433ES 23	1327,28	
433ES 24	340,80	76,00
433ES 25	1529,95	
433ES 26	375,53	
433ES 27		425,65

Nome da planta	Quantidade de HA em folhas [µg/g FG]	Quantidade de HA em bulbos [µg/g FG]
365 ES 74-5	73,9	
365 ES 74-6		168,68
365 ES 74-7	67,58	
365 ES 74-8		121,89
365 ES 74-9	62,23	
365 ES 74-10		275,24
365 ES 74-11	134,56	

Tabela 3: Quantidade de hialuronan (HA em µg de hialuronan por g de peso fresco) produzido pelas plantas transgênicas independentes da linhagem 433 ES. A coluna 1 refere-se à planta da qual material de bulbo ou folha foi coletado (aqui tipo selvagem refere-se a plantas não-transformadas e ES 365 74 refere-se a plantas que foram usadas como material de partida para transformação com plasmídeo C 399-300). As Colunas 2 e 3 referem-se à quantidade de hialuronan detectada em folhas ou bulbos, respectivamente.

14. TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ

a) Com vetores de expressão de planta compreendendo moléculas de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase de *Paramecium bursaria Chlorella* Vírus 1

Plantas de arroz (cultivar M202) foram transformadas com o vetor de expressão de planta pBA16, que contém uma seqüência de ácido nucléico de codificação para uma proteína hialuronan sintase de *Paramecium bursaria Chlorella* Vírus 1 sob o controle do promotor do gene de glubulina da *Oryza sativa* (Wu e outros, 1998, *Plant Cell Physiol.* 39(8), 885-889), u-

sando o método dado sob Métodos Gerais item 6. As plantas de arroz transgênicas obtidas que tinham sido transformadas com o plasmídeo pBA16 foram referidas como Os-pBA16.

b) Com vetores de expressão de planta compreendendo seqüências de ácido nucléico de codificação para uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-2 de camundongo

Plantas de arroz (cultivar M202) foram transformadas com o vetor de expressão de planta IC 386-299 que contém uma seqüência de ácido nucléico de codificação para uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-2 do camundongo sob o controle do promotor dos polipeptídeos prolamin de 13-kDa da *Oryza sativa*, usando o método dado sob Métodos Gerais item 6. As plantas de arroz transgênicas obtidas que tinham sido transformadas com o plasmídeo **pBA16** foram referidas como GAOS0788.

15. ANÁLISE DE PLANTAS DE ARROZ DA LINHAGEM OS-PBA16

a) Sementes de arroz imaturas

Sementes de arroz imaturas (5 a 10 dias após polinação) produzidas por plantas individuais da linhagem OS-pBA16, cultivadas em solo na estufa, foram colhidas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 C. Os grãos congelados de cada planta individual foram selecionados aleatoriamente, o endosperma foi eliminado, agrupados, pesados e congelados em nitrogênio líquido novamente. A amostra foi quebrada com um moedor Ball (Modelo MM200, Firma Retsch, Alemanha), 100 µl de água foram adicionados, o homogenato foi misturado, centrifugado (13000 xg, 5 min) e a concentração de hialuronan de cada amostra foi determinada de acordo com o método descrito sob Métodos Gerais, item 4.

De 37 grupos de semente, cada um compreendendo 3 sementes imaturas de plantas independentes da linhagem Os-pBA16, mais de 70% provaram sintetizar uma quantidade significante de hialuronan (pelo menos 0,1 µg de hialuronan por g de peso fresco) em sementes. A quantidade de hialuronan em grupos de semente preparadas de plantas de arroz independentes variou entre 0,1 e 15,7 µg de hialuronan por g de preso fresco. Os resultados para grupos de semente cada um preparado de plantas indepen-

dentes são mostrados na tabela que segue:

Material de planta	Hialuronan com base no peso fresco do material de planta [µg/g]
OS-pBA16 0612-00102	7,30
OS-pBA16 0612-00102	0,54
OS-pBA16 0612-00201	12,16
OS-pBA16 0612-00401	1,12
OS-pBA16 0612-00402	7,28
OS-pBA16 0612-00502	0,08
OS-pBA16 0612-00601	0,37
OS-pBA16 0612-00701	0,66
OS-pBA16 0612-00702	0,03
OS-pBA16 0612-00801	2,48
OS-pBA16 0612-00802	3,84
OS-pBA16 0612-00902	0,02
OS-pBA16 0612-01001	0,02
OS-pBA16 0612-01201	1,71
OS-pBA16 0612-01202	0,11
OS-pBA16 0612-01301	5,84
OS-pBA16 0612-01401	0,25
OS-pBA16 0612-01402	0,11
OS-pBA16 0612-01501	0,16
OS-pBA16 0612-01601	1,12
Wild type-1	0,01
Wild type-2	0,02
Wild type-3	0,02
OS-pBA16 0613-00101	4,43
OS-pBA16 0613-00102	1,95
OS-pBA16 0613-00301	0,25
OS-pBA16 0613-00401	15,72
OS-pBA16 0613-00402	0,38
OS-pBA16 0613-00502	0,87
OS-pBA16 0613-00601	0,02
OS-pBA16 0613-00602	0,01
OS-pBA16 0613-00701	0,23
OS-pBA16 0613-00702	0,80
OS-pBA16 0613-00801	1,72

Material de planta	Hialuronan com base no peso fresco do material de planta [µg/g]
OS-pBA16 0613-00802	0,15
OS-pBA16 0613-00902	0,02
OS-pBA16 0613-01001	0,02
OS-pBA16 0613-01002	0,01
OS-pBA16 0613-01102	0,24
OS-pBA16 0613-01202	9,48
OS-pBA16 0613-01301	13,44
OS-pBA16 0613-01302	9,79
OS-pBA16 0613-01501	0,63
OS-pBA16 0613-01502	6,78

Tabela 4: Detecção de hialuronan em grupos de semente, cada um preparado de plantas independentes da linhagem transgênica OS-pBA16.

b) Farinha de arroz

20-25 sementes maduras foram colhidas de cada planta transformada. As cascas foram removidos por um descascador (Laboratory Paddy sheller, Grainman, Miami, Florida, USA) e grão de arroz marrom foi moído com um moedor de laboratório (Cyclotec, Sample mill, Foss, Dinamarca). A cerca de 40 mg da farinha de arroz obtida das sementes agrupadas de cada planta independente, 1 ml de água foi adicionado, a amostra foi misturada, centrifugada (13000xg, 5 min) e a concentração de hialuronan do sobrenadante de cada amostra foi determinada de acordo com o método descrito sob Métodos Gerais, item 4. Resultados para amostras de farinha selecionadas preparadas a partir de plantas independentes são mostradas na tabela que segue:

Material de planta	Hialuronan com base no peso do material de planta [µg/g]
OS-pBA16 0612-00101	2,03
OS-pBA16 0612-00102	1,19
OS-pBA16 0612-00201	1,94
OS-pBA16 0612-00402	4,24
OS-pBA16 0612-00502	1,19

Material de planta	Hialuronan com base no peso do material de planta [µg/g]
OS-pBA16 0612-00601	1,64
OS-pBA16 0612-00602	2,51
OS-pBA16 0612-00701	0,87
OS-pBA16 0612-00702	1,04
OS-pBA16 0612-00801	3,61
OS-pBA16 0612-00802	3,88
OS-pBA16 0612-00902	1,02
OS-pBA16 0612-01001	0,58
OS-pBA16 0612-01201	4,86
OS-pBA16 0612-01202	2,96
OS-pBA16 0612-01301	11,30
OS-pBA16 0612-01401	1,64
OS-pBA16 0612-01402	1,50
OS-pBA16 0612-01501	4,54
OS-pBA16 0612-01601	1,90
OS-pBA16 0613-00101	3,46
OS-pBA16 0613-00102	3,94
OS-pBA16 0613-00301	3,32
OS-pBA16 0613-00401	5,21
OS-pBA16 0613-00402	3,45
OS-pBA16 0613-00502	5,20
OS-pBA16 0613-00601	0,83
OS-pBA16 0613-00602	0,77
OS-pBA16 0613-00701	2,63
OS-pBA16 0613-00702	3,77
OS-pBA16 0613-00801	1,55
OS-pBA16 0613-00802	2,81
OS-pBA16 0613-00902	2,65
OS-pBA16 0613-01001	1,06
OS-pBA16 0613-01002	0,59
OS-pBA16 0613-01102	1,19
OS-pBA16 0613-01202	10,18
OS-pBA16 0613-01301	5,02
OS-pBA16 0613-01302	3,84
OS-pBA16 0613-01501	4,00
OS-pBA16 0613-01502	5,63

Material de planta	Hialuronan com base no peso do material de planta [µg/g]
OS-pBA16 0613-000101	0,63
OS-pBA16 0613-000103	0,58
OS-pBA16 0613-000104	0,87

Tabela 5: Detecção de hialuronan em amostras de farinha de arroz, preparadas de sementes de cada planta independente da linhagem transgênica OS-pBA16. Detecção foi realizada usando o método descrito sob Métodos Gerais item 4.

b) Análise de plantas de arroz da linhagem GAOS0788

Plantas de arroz independentes da linhagem GAOS0788 obtidas após transformação com o plasmídeo IC 386-299 foram cultivadas em solo na estufa. De cada planta 20-25 sementes maduras (grãos) foram coletados, cascas foram removidas por um descascador (Laboratory Paddy sheller, Grainman, Miami, Florida, USA) e cerca de 7 grãos de arroz marrom de cada linhagem foram moídos em um moedor de bola de laboratório (MM200, Company Retsch, Alemanha, 30 seg. bei 30 Hz), levando à farinha de arroz. Em seguida o teor de derivados de glicosamina N-acetilada em cada amostra foi determinado de acordo com o método conforme descrito por Elson e Morgan (1933, *J. Biochem.* 27, 1824). Várias amostras analisadas realmente mostraram um aumento no teor de derivados de glicosamina N-acetilada variando de cerca de 2 µmoles até cerca de 20 µmoles de derivados de glicosamina N-acetilada por grama de peso fresco da amostra. Grãos individuais de plantas selecionadas (GAOS0788-00501), analisados conforme descrito acima, mostraram realmente um teor de derivados de glicosamina N-acetilada de até cerca de 43 µmol por grama de peso fresco da amostra.

Plantas selecionadas das linhagens OS-pBA16 e GAOS0788 serão cruzadas umas com as outras para se obter plantas compreendendo moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína de uma hialuronan sintase e codificando uma proteína tendo a atividade de uma GFAT-2.

Listagem de Seqüência

<110> Bayer CropScience GmbH

<120> Plantas com produção de hialuronan aumentada

<130> BCS 05-5008 PCT

<150> EP05090279.0
<151> 2005-10-05

<150> US60/725,388
<151> 2005-10-11

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 1707
<212> DNA
<213> Paramecium bursaria Chlorella Virus 1

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

<300>
<308> PB42580
<309> 1995-12-24
<313> (50903)..(52609)

<400> 1

```
atg ggt aaa aat ata atc ata atg gtt tcg tgg tac acc atc ata act      48
Met Gly Lys Asn Ile Ile Ile Met Val Ser Trp Tyr Thr Ile Ile Thr
1               5                  10                  15

tca aat cta atc gcg gtt gga gga gcc tct cta atc ttg gct ccg gca      96
Ser Asn Leu Ile Ala Val Gly Gly Ala Ser Leu Ile Leu Ala Pro Ala
            20                  25                  30

att act ggg tat gtt cta cat tgg aat att gct ctc tcg aca atc tgg     144
Ile Thr Gly Tyr Val Leu His Trp Asn Ile Ala Leu Ser Thr Ile Trp
        35                  40                  45

gga gta tca gct tat ggt att ttc gtt ttt ggg ttt ttc ctt gca caa     192
Gly Val Ser Ala Tyr Gly Ile Phe Val Phe Gly Phe Phe Leu Ala Gln
    50                  55                  60

gtt tta ttt tca gaa ctg aac agg aaa cgt ctt cgc aag tgg att tct     240
Val Leu Phe Ser Glu Leu Asn Arg Lys Arg Leu Arg Lys Trp Ile Ser
65                  70                  75                  80

ctc aga cct aag ggt tgg aat gat gtt cgt ttg gct gtg atc att gct     288
Leu Arg Pro Lys Gly Trp Asn Asp Val Arg Leu Ala Val Ile Ile Ala
                85                  90                  95

gga tat cgc gag gat cct tat atg ttc cag aag tgc ctc gag tct gta     336
Gly Tyr Arg Glu Asp Pro Tyr Met Phe Gln Lys Cys Leu Glu Ser Val
            100                 105                 110

cgt gac tct gat tat ggc aac gtt gcc cgt ctg att tgt gtg att gac     384
Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Asn Val Ala Arg Leu Ile Cys Val Ile Asp
        115                 120                 125

ggt gat gag gac gat gat atg agg atg gct gcc gtt tac aag gcg atc     432
Gly Asp Glu Asp Asp Asp Met Arg Met Ala Ala Val Tyr Lys Ala Ile
```

```
    130                 135                 140

tac aat gat aat atc aag aag ccc gag ttt gtt ctg tgt gag tca gac      480
Tyr Asn Asp Asn Ile Lys Lys Pro Glu Phe Val Leu Cys Glu Ser Asp
145                 150                 155                 160

gac aag gaa ggt gaa cgc atc gac tct gat ttc tct cgc gac att tgt      528
Asp Lys Glu Gly Glu Arg Ile Asp Ser Asp Phe Ser Arg Asp Ile Cys
                165                 170                 175

gtc ctc cag cct cat cgt gga aaa cgg gag tgt ctt tat act ggg ttt      576
Val Leu Gln Pro His Arg Gly Lys Arg Glu Cys Leu Tyr Thr Gly Phe
            180                 185                 190

caa ctt gca aag atg gac ccc agt gtc aat gct gtc gtt ctg att gac      624
Gln Leu Ala Lys Met Asp Pro Ser Val Asn Ala Val Val Leu Ile Asp
        195                 200                 205

agc gat acc gtt ctc gag aag gat gct att ctg gaa gtt gta tac cca      672
Ser Asp Thr Val Leu Glu Lys Asp Ala Ile Leu Glu Val Val Tyr Pro
    210                 215                 220

ctt gca tgc gat ccc gag atc caa gcc gtt gca ggt gag tgt aag att      720
Leu Ala Cys Asp Pro Glu Ile Gln Ala Val Ala Gly Glu Cys Lys Ile
225                 230                 235                 240

tgg aac aca gac act ctt ttg agt ctt ctc gtc gct tgg cgg tac tat      768
Trp Asn Thr Asp Thr Leu Leu Ser Leu Leu Val Ala Trp Arg Tyr Tyr
                245                 250                 255

tct gcg ttt tgt gtg gag agg agt gcc cag tct ttt ttc agg act gtt      816
Ser Ala Phe Cys Val Glu Arg Ser Ala Gln Ser Phe Phe Arg Thr Val
            260                 265                 270

cag tgc gtt ggg ggg cca ctg ggt gcc tac aag att gat atc att aag      864
Gln Cys Val Gly Gly Pro Leu Gly Ala Tyr Lys Ile Asp Ile Ile Lys
        275                 280                 285

gag att aag gac ccc tgg att tcc cag cgc ttt ctt ggt cag aag tgt      912
Glu Ile Lys Asp Pro Trp Ile Ser Gln Arg Phe Leu Gly Gln Lys Cys
    290                 295                 300

act tac ggt gac gac cgc cgg cta acc aac gag atc ttg atg cgt ggt      960
Thr Tyr Gly Asp Asp Arg Arg Leu Thr Asn Glu Ile Leu Met Arg Gly
305                 310                 315                 320

aaa aag gtt gtg ttc act cca ttt gct gtt ggt tgg tct gac agt ccg     1008
Lys Lys Val Val Phe Thr Pro Phe Ala Val Gly Trp Ser Asp Ser Pro
                325                 330                 335

acc aat gtg ttt cgg tac atc gtt cag cag acc cgc tgg agt aag tcg     1056
Thr Asn Val Phe Arg Tyr Ile Val Gln Gln Thr Arg Trp Ser Lys Ser
            340                 345                 350

tgg tgc cgc gaa att tgg tac acc ctc ttc gcc gcg tgg aag cac ggt     1104
Trp Cys Arg Glu Ile Trp Tyr Thr Leu Phe Ala Ala Trp Lys His Gly
        355                 360                 365

ttg tct gga att tgg ctg gcc ttt gaa tgt ttg tat caa att aca tac     1152
Leu Ser Gly Ile Trp Leu Ala Phe Glu Cys Leu Tyr Gln Ile Thr Tyr
    370                 375                 380

ttc ttc ctc gtg att tac ctc ttt tct cgc cta gcc gtt gag gcc gac     1200
Phe Phe Leu Val Ile Tyr Leu Phe Ser Arg Leu Ala Val Glu Ala Asp
385                 390                 395                 400

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

```
                405                 410                 415

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 568
<212> PRT
<213> Paramecium bursaria Chlorella Virus 1

<400> 2

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

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

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

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

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

```
Leu Arg Pro Lys Gly Trp Asn Asp Val Arg Leu Ala Val Ile Ile Ala
                85                  90                  95

Gly Tyr Arg Glu Asp Pro Tyr Met Phe Gln Lys Cys Leu Glu Ser Val
            100                 105                 110

Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Asn Val Ala Arg Leu Ile Cys Val Ile Asp
        115                 120                 125

Gly Asp Glu Asp Asp Asp Met Arg Met Ala Ala Val Tyr Lys Ala Ile
    130                 135                 140

Tyr Asn Asp Asn Ile Lys Lys Pro Glu Phe Val Leu Cys Glu Ser Asp
145                 150                 155                 160

Asp Lys Glu Gly Glu Arg Ile Asp Ser Asp Phe Ser Arg Asp Ile Cys
                165                 170                 175

Val Leu Gln Pro His Arg Gly Lys Arg Glu Cys Leu Tyr Thr Gly Phe
            180                 185                 190

Gln Leu Ala Lys Met Asp Pro Ser Val Asn Ala Val Val Leu Ile Asp
        195                 200                 205

Ser Asp Thr Val Leu Glu Lys Asp Ala Ile Leu Glu Val Val Tyr Pro
    210                 215                 220

Leu Ala Cys Asp Pro Glu Ile Gln Ala Val Ala Gly Glu Cys Lys Ile
225                 230                 235                 240

Trp Asn Thr Asp Thr Leu Leu Ser Leu Leu Val Ala Trp Arg Tyr Tyr
                245                 250                 255

Ser Ala Phe Cys Val Glu Arg Ser Ala Gln Ser Phe Phe Arg Thr Val
            260                 265                 270

Gln Cys Val Gly Gly Pro Leu Gly Ala Tyr Lys Ile Asp Ile Ile Lys
        275                 280                 285

Glu Ile Lys Asp Pro Trp Ile Ser Gln Arg Phe Leu Gly Gln Lys Cys
    290                 295                 300

Thr Tyr Gly Asp Asp Arg Arg Leu Thr Asn Glu Ile Leu Met Arg Gly
305                 310                 315                 320

Lys Lys Val Val Phe Thr Pro Phe Ala Val Gly Trp Ser Asp Ser Pro
                325                 330                 335

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

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

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

Phe Phe Leu Val Ile Tyr Leu Phe Ser Arg Leu Ala Val Glu Ala Asp
385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Thr Thr Asn Ala Gln Ser Val
565

<210> 3
<211> 1707
<212> DNA
<213> Seqüência Artificial

<220>
<223> Seqüência sintética codificando uma proteína hialuronansintase do vírus

<400> 3

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

<210> 4
<211> 2298
<212> DNA
<213> Mus musculus

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

<220>
<221> alelo
<222> (1190)..(1190)
<223> Seqüência inserida no plasmédio IC 365-256 contém uma troca de base de T para C na posição 1190.

<220>
<221> allele
<222> (2027)..(2027)
<223> sequnce inserted in plasmid IC 365-256 contains a base exchnage from G to A at position 2027

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

<400> 4

```
gagagcgaag cgagcgctga gtcggactgt cgggtctgag ctgtcgcatc ccagagtcct      60

ctcattgcca ccaccccggc ccgagctcac cctcgcttct gaagctctcc gcgcgcccga     120

cagctcagcc ctcgcccgtg accaacatc atg tgc ggt ata ttt gct tat tta       173
                               Met Cys Gly Ile Phe Ala Tyr Leu
                               1               5

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

aaa ggc ctt cag aga ctg gaa tac aga gga tat gat tct gct ggt gtg       269
Lys Gly Leu Gln Arg Leu Glu Tyr Arg Gly Tyr Asp Ser Ala Gly Val
25                  30                  35                  40

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

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

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

ctt gga ata gct cat acc cgt tgg gcg aca cat gga gaa ccc aat cct       461
Leu Gly Ile Ala His Thr Arg Trp Ala Thr His Gly Glu Pro Asn Pro
    90                  95                  100

gtc aat agt cac ccc cag cgc tct gat aaa aat aat gaa ttc att gtt       509
Val Asn Ser His Pro Gln Arg Ser Asp Lys Asn Asn Glu Phe Ile Val
105                 110                 115                 120

att cat aat gga atc atc acc aac tac aaa gac ttg aaa aag ttt ctg       557
Ile His Asn Gly Ile Ile Thr Asn Tyr Lys Asp Leu Lys Lys Phe Leu
                125                 130                 135

gaa agc aaa ggc tat gac ttt gaa tct gaa aca gac aca gaa acc att       605
Glu Ser Lys Gly Tyr Asp Phe Glu Ser Glu Thr Asp Thr Glu Thr Ile
            140                 145                 150

gcc aag ctc gtc aag tac atg tat gac aac tgg gag agc cag gac gtc       653
Ala Lys Leu Val Lys Tyr Met Tyr Asp Asn Trp Glu Ser Gln Asp Val
        155                 160                 165

agt ttt acc acc ttg gtg gag aga gtt atc caa caa ttg gaa ggc gcc       701
```

```
Ser Phe Thr Thr Leu Val Glu Arg Val Ile Gln Gln Leu Glu Gly Ala
    170                 175                 180

ttt gct ctt gtg ttt aaa agt gtc cat ttt ccc ggg caa gca gtt ggc      749
Phe Ala Leu Val Phe Lys Ser Val His Phe Pro Gly Gln Ala Val Gly
185                 190                 195                 200

aca agg cga ggt agc cct ctc ttg att ggt gtg cgg agt gaa cat aag      797
Thr Arg Arg Gly Ser Pro Leu Leu Ile Gly Val Arg Ser Glu His Lys
                205                 210                 215

ctt tct aca gat cac att ccg att ctg tac aga aca ggc aaa gac aag      845
Leu Ser Thr Asp His Ile Pro Ile Leu Tyr Arg Thr Gly Lys Asp Lys
            220                 225                 230

aaa gga agc tgc ggt ctt tcc cgt gtg gac agc acg aca tgc ctg ttc      893
Lys Gly Ser Cys Gly Leu Ser Arg Val Asp Ser Thr Thr Cys Leu Phe
        235                 240                 245

cct gtt gag gaa aag gca gtt gaa tat tac ttt gct tct gat gca agt      941
Pro Val Glu Glu Lys Ala Val Glu Tyr Tyr Phe Ala Ser Asp Ala Ser
    250                 255                 260

gcc gtg ata gag cac acc aat cgt gtc atc ttt ctg gaa gat gat gat      989
Ala Val Ile Glu His Thr Asn Arg Val Ile Phe Leu Glu Asp Asp Asp
265                 270                 275                 280

gtt gca gca gtg gtg gat ggc cgt ctc tct atc cac cga att aaa cga     1037
Val Ala Ala Val Val Asp Gly Arg Leu Ser Ile His Arg Ile Lys Arg
                285                 290                 295

act gca gga gac cat cct ggc cga gct gtg caa act ctc cag atg gag     1085
Thr Ala Gly Asp His Pro Gly Arg Ala Val Gln Thr Leu Gln Met Glu
            300                 305                 310

ctc cag cag atc atg aag ggc aac ttt agt tca ttt atg cag aag gaa     1133
Leu Gln Gln Ile Met Lys Gly Asn Phe Ser Ser Phe Met Gln Lys Glu
        315                 320                 325

att ttt gag cag cca gaa tct gtt gtg aac aca atg aga gga aga gtc     1181
Ile Phe Glu Gln Pro Glu Ser Val Val Asn Thr Met Arg Gly Arg Val
    330                 335                 340

aat ttt gat gac tac act gtg aat ttg gga ggt ttg aaa gat cac att     1229
Asn Phe Asp Asp Tyr Thr Val Asn Leu Gly Gly Leu Lys Asp His Ile
345                 350                 355                 360

aag gag atc cag cgg tgt cgg cgg ttg att ctt att gct tgt ggc aca     1277
Lys Glu Ile Gln Arg Cys Arg Arg Leu Ile Leu Ile Ala Cys Gly Thr
                365                 370                 375

agt tac cac gct ggt gtg gca acc cgt cag gtc ctg gag gag ctg acc     1325
Ser Tyr His Ala Gly Val Ala Thr Arg Gln Val Leu Glu Glu Leu Thr
            380                 385                 390

gag ctg ccc gtg atg gtg gag ctt gcc agt gac ttc ttg gat aga aac     1373
Glu Leu Pro Val Met Val Glu Leu Ala Ser Asp Phe Leu Asp Arg Asn
        395                 400                 405

act cca gtc ttt cga gat gat gtt tgc ttt ttc att agt caa tca ggc     1421
Thr Pro Val Phe Arg Asp Asp Val Cys Phe Phe Ile Ser Gln Ser Gly
    410                 415                 420

gag aca gct gac acc ctg atg gga ctt cgt tac tgt aag gag aga gga     1469
Glu Thr Ala Asp Thr Leu Met Gly Leu Arg Tyr Cys Lys Glu Arg Gly
425                 430                 435                 440

gcc tta act gtg ggg atc aca aat aca gtc ggc agt tct ata tca agg     1517
```

```
Ala Leu Thr Val Gly Ile Thr Asn Thr Val Gly Ser Ser Ile Ser Arg
                445                 450                 455

gag aca gat tgc ggg gtt cat att aat gct ggt cct gag att ggc gtg      1565
Glu Thr Asp Cys Gly Val His Ile Asn Ala Gly Pro Glu Ile Gly Val
            460                 465                 470

gcc agt aca aag gca tac acc agc cag ttt gtg tcc ctc gtg atg ttt      1613
Ala Ser Thr Lys Ala Tyr Thr Ser Gln Phe Val Ser Leu Val Met Phe
        475                 480                 485

gct ctc atg atg tgt gat gac agg atc tcc atg caa gag aga cgc aaa      1661
Ala Leu Met Met Cys Asp Asp Arg Ile Ser Met Gln Glu Arg Arg Lys
    490                 495                 500

gag atc atg ctc gga ctg aag cga ctg ccg gac ttg att aag gaa gtg      1709
Glu Ile Met Leu Gly Leu Lys Arg Leu Pro Asp Leu Ile Lys Glu Val
505                 510                 515                 520

ctg agc atg gat gat gaa atc cag aag ctg gcg acg gag ctt tac cac      1757
Leu Ser Met Asp Asp Glu Ile Gln Lys Leu Ala Thr Glu Leu Tyr His
                525                 530                 535

cag aag tcg gtc ctg ata atg ggg cgg ggc tac cat tat gct aca tgc      1805
Gln Lys Ser Val Leu Ile Met Gly Arg Gly Tyr His Tyr Ala Thr Cys
            540                 545                 550

ctt gaa ggg gct ctg aaa atc aag gag att act tat atg cat tcg gaa      1853
Leu Glu Gly Ala Leu Lys Ile Lys Glu Ile Thr Tyr Met His Ser Glu
        555                 560                 565

ggc atc ctt gct ggt gag ctc aag cac ggc cct ctg gcc ttg gtg gac      1901
Gly Ile Leu Ala Gly Glu Leu Lys His Gly Pro Leu Ala Leu Val Asp
    570                 575                 580

aag ttg atg cct gtc atc atg atc atc atg cga gac cac act tat gcc      1949
Lys Leu Met Pro Val Ile Met Ile Ile Met Arg Asp His Thr Tyr Ala
585                 590                 595                 600

aag tgc cag aac gct ctt cag cag gtg gtt gca cgg cag ggg cgt cca      1997
Lys Cys Gln Asn Ala Leu Gln Gln Val Val Ala Arg Gln Gly Arg Pro
                605                 610                 615

gtc gtg atc tgt gat aag gag gat act gag acc att aag aat aca aaa      2045
Val Val Ile Cys Asp Lys Glu Asp Thr Glu Thr Ile Lys Asn Thr Lys
            620                 625                 630

agg aca atc aag gtg ccc cac tca gtg gac tgc ttg cag ggc att ctc      2093
Arg Thr Ile Lys Val Pro His Ser Val Asp Cys Leu Gln Gly Ile Leu
        635                 640                 645

agt gtg att ccc ctg cag ctg ctg gct ttc cac ctg gct gtg ctg aga      2141
Ser Val Ile Pro Leu Gln Leu Leu Ala Phe His Leu Ala Val Leu Arg
    650                 655                 660

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

gag taacagacac ctgaaactta agacagttaa gcaacacgag ataccttttg          2242
Glu

tatttaaatt tttgatttaa actatcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa       2298

<210>  5
<211>  681
```

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

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

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

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

Asp Trp Glu Ala Asn Ala Cys Lys Ile Gln Leu Ile Lys Lys Lys Gly
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

Val Ile Gln Gln Leu Glu Gly Ala Phe Ala Leu Val Phe Lys Ser Val
180 185 190

His Phe Pro Gly Gln Ala Val Gly Thr Arg Arg Gly Ser Pro Leu Leu
195 200 205

Ile Gly Val Arg Ser Glu His Lys Leu Ser Thr Asp His Ile Pro Ile
210 215 220

Leu Tyr Arg Thr Gly Lys Asp Lys Lys Gly Ser Cys Gly Leu Ser Arg
225 230 235 240

Val Asp Ser Thr Thr Cys Leu Phe Pro Val Glu Glu Lys Ala Val Glu
245 250 255

```
Tyr Tyr Phe Ala Ser Asp Ala Ser Ala Val Ile Glu His Thr Asn Arg
            260                 265                 270

Val Ile Phe Leu Glu Asp Asp Asp Val Ala Ala Val Val Asp Gly Arg
        275                 280                 285

Leu Ser Ile His Arg Ile Lys Arg Thr Ala Gly Asp His Pro Gly Arg
    290                 295                 300

Ala Val Gln Thr Leu Gln Met Glu Leu Gln Gln Ile Met Lys Gly Asn
305                 310                 315                 320

Phe Ser Ser Phe Met Gln Lys Glu Ile Phe Glu Gln Pro Glu Ser Val
                325                 330                 335

Val Asn Thr Met Arg Gly Arg Val Asn Phe Asp Asp Tyr Thr Val Asn
            340                 345                 350

Leu Gly Gly Leu Lys Asp His Ile Lys Glu Ile Gln Arg Cys Arg Arg
        355                 360                 365

Leu Ile Leu Ile Ala Cys Gly Thr Ser Tyr His Ala Gly Val Ala Thr
    370                 375                 380

Arg Gln Val Leu Glu Glu Leu Thr Glu Leu Pro Val Met Val Glu Leu
385                 390                 395                 400

Ala Ser Asp Phe Leu Asp Arg Asn Thr Pro Val Phe Arg Asp Asp Val
                405                 410                 415

Cys Phe Phe Ile Ser Gln Ser Gly Glu Thr Ala Asp Thr Leu Met Gly
            420                 425                 430

Leu Arg Tyr Cys Lys Glu Arg Gly Ala Leu Thr Val Gly Ile Thr Asn
        435                 440                 445

Thr Val Gly Ser Ser Ile Ser Arg Glu Thr Asp Cys Gly Val His Ile
    450                 455                 460

Asn Ala Gly Pro Glu Ile Gly Val Ala Ser Thr Lys Ala Tyr Thr Ser
465                 470                 475                 480

Gln Phe Val Ser Leu Val Met Phe Ala Leu Met Met Cys Asp Asp Arg
                485                 490                 495

Ile Ser Met Gln Glu Arg Arg Lys Glu Ile Met Leu Gly Leu Lys Arg
            500                 505                 510

Leu Pro Asp Leu Ile Lys Glu Val Leu Ser Met Asp Asp Glu Ile Gln
        515                 520                 525
```

```
Lys Leu Ala Thr Glu Leu Tyr His Gln Lys Ser Val Leu Ile Met Gly
    530                 535                 540

Arg Gly Tyr His Tyr Ala Thr Cys Leu Glu Gly Ala Leu Lys Ile Lys
545                 550                 555                 560

Glu Ile Thr Tyr Met His Ser Glu Gly Ile Leu Ala Gly Glu Leu Lys
                565                 570                 575

His Gly Pro Leu Ala Leu Val Asp Lys Leu Met Pro Val Ile Met Ile
            580                 585                 590

Ile Met Arg Asp His Thr Tyr Ala Lys Cys Gln Asn Ala Leu Gln Gln
        595                 600                 605

Val Val Ala Arg Gln Gly Arg Pro Val Val Ile Cys Asp Lys Glu Asp
    610                 615                 620

Thr Glu Thr Ile Lys Asn Thr Lys Arg Thr Ile Lys Val Pro His Ser
625                 630                 635                 640

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

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

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

<210> 6
<211> 2049
<212> DNA
<213> Mus musculus

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

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

<400> 6

```
atg tgc gga atc ttt gcc tac atg aat tac aga gtt ccc aag aca agg      48
Met Cys Gly Ile Phe Ala Tyr Met Asn Tyr Arg Val Pro Lys Thr Arg
1               5                   10                  15

aaa gag att ttc gaa acc ctt atc agg ggt ctg cag cgg ctg gag tac      96
Lys Glu Ile Phe Glu Thr Leu Ile Arg Gly Leu Gln Arg Leu Glu Tyr
            20                  25                  30

cgg ggc tat gac tct gcg ggg gtt gcc att gat ggg aat aac cac gaa     144
Arg Gly Tyr Asp Ser Ala Gly Val Ala Ile Asp Gly Asn Asn His Glu
        35                  40                  45
```

```
gtc aaa gaa aga cac atc cat ctt gtg aag aaa agg ggg aaa gta aag      192
Val Lys Glu Arg His Ile His Leu Val Lys Lys Arg Gly Lys Val Lys
    50                  55                  60

gct ctg gat gaa gaa ctt tac aag caa gat agc atg gac ttg aag gtg      240
Ala Leu Asp Glu Glu Leu Tyr Lys Gln Asp Ser Met Asp Leu Lys Val
65                  70                  75                  80

gag ttt gag aca cac ttc ggc att gcc cac aca cgt tgg gcc acc cac      288
Glu Phe Glu Thr His Phe Gly Ile Ala His Thr Arg Trp Ala Thr His
                85                  90                  95

ggg gtt ccc aat gct gtc aac agt cac ccg cag cgt tcg gac aaa gac      336
Gly Val Pro Asn Ala Val Asn Ser His Pro Gln Arg Ser Asp Lys Asp
            100                 105                 110

aat gaa ttt gtt gtc atc cac aac ggg atc atc act aat tac aag gat      384
Asn Glu Phe Val Val Ile His Asn Gly Ile Ile Thr Asn Tyr Lys Asp
        115                 120                 125

cta agg aag ttt ctg gaa agc aaa ggc tac gag ttt gag tca gaa aca      432
Leu Arg Lys Phe Leu Glu Ser Lys Gly Tyr Glu Phe Glu Ser Glu Thr
    130                 135                 140

gac acg gag acc atc gcc aag ctg att aaa tat gta ttt gac aac aga      480
Asp Thr Glu Thr Ile Ala Lys Leu Ile Lys Tyr Val Phe Asp Asn Arg
145                 150                 155                 160

gag act gag gac ata acg ttt tcc aca ttg gtc gaa aga gtc att cag      528
Glu Thr Glu Asp Ile Thr Phe Ser Thr Leu Val Glu Arg Val Ile Gln
                165                 170                 175

cag ttg gaa ggc gcc ttt gca ctg gtt ttc aag agt att cac tac ccg      576
Gln Leu Glu Gly Ala Phe Ala Leu Val Phe Lys Ser Ile His Tyr Pro
            180                 185                 190

gga gaa gct gtc gcc acg agg aga ggc agc ccc ttg ctc atc ggg gta      624
Gly Glu Ala Val Ala Thr Arg Arg Gly Ser Pro Leu Leu Ile Gly Val
        195                 200                 205

cga agc aaa tac aaa ctc tcc aca gag cag atc ccc gtc tta tat ccg      672
Arg Ser Lys Tyr Lys Leu Ser Thr Glu Gln Ile Pro Val Leu Tyr Pro
    210                 215                 220

aca tgc aat atc gag aat gtg aag aat atc tgc aag act agg atg aag      720
Thr Cys Asn Ile Glu Asn Val Lys Asn Ile Cys Lys Thr Arg Met Lys
225                 230                 235                 240

aga ctg gac agc tcc acc tgc ctg cac gct gtg ggc gat aaa gct gtg      768
Arg Leu Asp Ser Ser Thr Cys Leu His Ala Val Gly Asp Lys Ala Val
                245                 250                 255

gaa ttc ttc ttt gct tct gat gca agt gcc atc ata gaa cac acc aac      816
Glu Phe Phe Phe Ala Ser Asp Ala Ser Ala Ile Ile Glu His Thr Asn
            260                 265                 270

cgg gtc atc ttc tta gaa gat gat gat atc gct gca gtg gct gat ggg      864
Arg Val Ile Phe Leu Glu Asp Asp Asp Ile Ala Ala Val Ala Asp Gly
        275                 280                 285

aaa ctc tcc att cac cga gtc aag cgc tca gct act gat gac ccc tcc      912
Lys Leu Ser Ile His Arg Val Lys Arg Ser Ala Thr Asp Asp Pro Ser
    290                 295                 300

cga gcc atc cag acc ttg cag atg gaa ctg cag caa ata atg aaa ggt      960
Arg Ala Ile Gln Thr Leu Gln Met Glu Leu Gln Gln Ile Met Lys Gly
305                 310                 315                 320
```

```
aac ttc agc gca ttt atg cag aag gag atc ttc gag cag cca gaa tca      1008
Asn Phe Ser Ala Phe Met Gln Lys Glu Ile Phe Glu Gln Pro Glu Ser
                325                 330                 335

gtt ttt aat acc atg aga ggt cgg gtg aat ttt gag acc aac aca gtg      1056
Val Phe Asn Thr Met Arg Gly Arg Val Asn Phe Glu Thr Asn Thr Val
            340                 345                 350

ctc ctg ggt ggc ttg aag gac cat ttg aaa gag atc cga cga tgc cga      1104
Leu Leu Gly Gly Leu Lys Asp His Leu Lys Glu Ile Arg Arg Cys Arg
        355                 360                 365

agg ctc att gtg att ggc tgt gga acc agc tac cat gcc gct gtg gct      1152
Arg Leu Ile Val Ile Gly Cys Gly Thr Ser Tyr His Ala Ala Val Ala
    370                 375                 380

aca cgg caa gtc tta gag gaa ctg acc gag ctg cct gtg atg gtt gaa      1200
Thr Arg Gln Val Leu Glu Glu Leu Thr Glu Leu Pro Val Met Val Glu
385                 390                 395                 400

ctt gcc agt gac ttt ctg gac agg aac aca cct gtg ttc agg gat gac      1248
Leu Ala Ser Asp Phe Leu Asp Arg Asn Thr Pro Val Phe Arg Asp Asp
                405                 410                 415

gtt tgc ttt ttc ata agc caa tca ggt gag act gca gac acg ctc ctg      1296
Val Cys Phe Phe Ile Ser Gln Ser Gly Glu Thr Ala Asp Thr Leu Leu
            420                 425                 430

gcg ctg cga tac tgt aag gat cga ggt gcg ctg acc gtg ggc atc acc      1344
Ala Leu Arg Tyr Cys Lys Asp Arg Gly Ala Leu Thr Val Gly Ile Thr
        435                 440                 445

aac acc gtg ggt agc tcc atc tcc cgg gag act gac tgt ggc gtc cac      1392
Asn Thr Val Gly Ser Ser Ile Ser Arg Glu Thr Asp Cys Gly Val His
    450                 455                 460

atc aac gca ggg ccc gag att ggg gtg gcc agc acc aag gcg tac acc      1440
Ile Asn Ala Gly Pro Glu Ile Gly Val Ala Ser Thr Lys Ala Tyr Thr
465                 470                 475                 480

agc cag ttc atc tct ctg gtg atg ttt ggt ttg atg atg tct gaa gat      1488
Ser Gln Phe Ile Ser Leu Val Met Phe Gly Leu Met Met Ser Glu Asp
                485                 490                 495

cga att tct cta cag aac agg aga caa gag atc atc cgt ggc ctc aga      1536
Arg Ile Ser Leu Gln Asn Arg Arg Gln Glu Ile Ile Arg Gly Leu Arg
            500                 505                 510

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
<211> 682
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

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

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

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

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

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

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

Gly Val Pro Asn Ala Val Asn Ser His Pro Gln Arg Ser Asp Lys Asp
            100                 105                 110

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

Leu Arg Lys Phe Leu Glu Ser Lys Gly Tyr Glu Phe Glu Ser Glu Thr
    130                 135                 140
```

```
Asp Thr Glu Thr Ile Ala Lys Leu Ile Lys Tyr Val Phe Asp Asn Arg
145                 150                 155                 160

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

Gln Leu Glu Gly Ala Phe Ala Leu Val Phe Lys Ser Ile His Tyr Pro
            180                 185                 190

Gly Glu Ala Val Ala Thr Arg Arg Gly Ser Pro Leu Leu Ile Gly Val
        195                 200                 205

Arg Ser Lys Tyr Lys Leu Ser Thr Glu Gln Ile Pro Val Leu Tyr Pro
    210                 215                 220

Thr Cys Asn Ile Glu Asn Val Lys Asn Ile Cys Lys Thr Arg Met Lys
225                 230                 235                 240

Arg Leu Asp Ser Ser Thr Cys Leu His Ala Val Gly Asp Lys Ala Val
                245                 250                 255

Glu Phe Phe Phe Ala Ser Asp Ala Ser Ala Ile Ile Glu His Thr Asn
            260                 265                 270

Arg Val Ile Phe Leu Glu Asp Asp Asp Ile Ala Ala Val Ala Asp Gly
        275                 280                 285

Lys Leu Ser Ile His Arg Val Lys Arg Ser Ala Thr Asp Asp Pro Ser
    290                 295                 300

Arg Ala Ile Gln Thr Leu Gln Met Glu Leu Gln Gln Ile Met Lys Gly
305                 310                 315                 320

Asn Phe Ser Ala Phe Met Gln Lys Glu Ile Phe Glu Gln Pro Glu Ser
                325                 330                 335

Val Phe Asn Thr Met Arg Gly Arg Val Asn Phe Glu Thr Asn Thr Val
            340                 345                 350

Leu Leu Gly Gly Leu Lys Asp His Leu Lys Glu Ile Arg Arg Cys Arg
        355                 360                 365

Arg Leu Ile Val Ile Gly Cys Gly Thr Ser Tyr His Ala Ala Val Ala
    370                 375                 380

Thr Arg Gln Val Leu Glu Glu Leu Thr Glu Leu Pro Val Met Val Glu
385                 390                 395                 400

Leu Ala Ser Asp Phe Leu Asp Arg Asn Thr Pro Val Phe Arg Asp Asp
                405                 410                 415
```

```
Val Cys Phe Phe Ile Ser Gln Ser Gly Glu Thr Ala Asp Thr Leu Leu
            420                 425                 430

Ala Leu Arg Tyr Cys Lys Asp Arg Gly Ala Leu Thr Val Gly Ile Thr
        435                 440                 445

Asn Thr Val Gly Ser Ser Ile Ser Arg Glu Thr Asp Cys Gly Val His
    450                 455                 460

Ile Asn Ala Gly Pro Glu Ile Gly Val Ala Ser Thr Lys Ala Tyr Thr
465                 470                 475                 480

Ser Gln Phe Ile Ser Leu Val Met Phe Gly Leu Met Met Ser Glu Asp
                485                 490                 495

Arg Ile Ser Leu Gln Asn Arg Arg Gln Glu Ile Ile Arg Gly Leu Arg
            500                 505                 510

Ser Leu Pro Glu Leu Ile Lys Glu Val Leu Ser Leu Asp Glu Lys Ile
        515                 520                 525

His Asp Leu Ala Leu Glu Leu Tyr Thr Gln Arg Ser Leu Leu Val Met
    530                 535                 540

Gly Arg Gly Tyr Asn Tyr Ala Thr Cys Leu Glu Gly Ala Leu Lys Ile
545                 550                 555                 560

Lys Glu Ile Thr Tyr Met His Ser Glu Gly Ile Leu Ala Gly Glu Leu
                565                 570                 575

Lys His Gly Pro Leu Ala Leu Val Asp Lys Gln Met Pro Val Ile Met
            580                 585                 590

Val Ile Met Lys Asp Pro Cys Phe Ala Lys Cys Gln Asn Ala Leu Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

<210> 8
<211> 1830
<212> DNA
<213> Escherichia coli

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

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

<400> 8

```
atg tgt gga att gtt ggc gcg atc gcg caa cgt gat gta gca gaa atc       48
Met Cys Gly Ile Val Gly Ala Ile Ala Gln Arg Asp Val Ala Glu Ile
1               5                  10                  15

ctt ctt gaa ggt tta cgt cgt ctg gaa tac cgc gga tat gac tct gcc       96
Leu Leu Glu Gly Leu Arg Arg Leu Glu Tyr Arg Gly Tyr Asp Ser Ala
            20                  25                  30

ggt ctg gcc gtt gtt gat gca gaa ggt cat atg acc cgc ctg cgt cgc      144
Gly Leu Ala Val Val Asp Ala Glu Gly His Met Thr Arg Leu Arg Arg
        35                  40                  45

ctc ggt aaa gtc cag atg ctg gca cag gca gcg gaa gaa cat cct ctg      192
Leu Gly Lys Val Gln Met Leu Ala Gln Ala Ala Glu Glu His Pro Leu
    50                  55                  60

cat ggc ggc act ggt att gct cac act cgc tgg gcg acc cac ggt gaa      240
His Gly Gly Thr Gly Ile Ala His Thr Arg Trp Ala Thr His Gly Glu
65                  70                  75                  80

cct tca gaa gtg aat gcg cat ccg cat gtt tct gaa cac att gtg gtg      288
Pro Ser Glu Val Asn Ala His Pro His Val Ser Glu His Ile Val Val
                85                  90                  95

gtg cat aac ggc atc atc gaa aac cat gaa ccg ctg cgt gaa gag cta      336
Val His Asn Gly Ile Ile Glu Asn His Glu Pro Leu Arg Glu Glu Leu
            100                 105                 110

aaa gcg cgt ggc tat acc ttc gtt tct gaa acc gac acc gaa gtg att      384
Lys Ala Arg Gly Tyr Thr Phe Val Ser Glu Thr Asp Thr Glu Val Ile
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

gag taa                                                            1830
Glu
```

<210> 9
<211> 609
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 9

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

Leu Leu Glu Gly Leu Arg Arg Leu Glu Tyr Arg Gly Tyr Asp Ser Ala
            20                  25                  30

Gly Leu Ala Val Val Asp Ala Glu Gly His Met Thr Arg Leu Arg Arg
        35                  40                  45

Leu Gly Lys Val Gln Met Leu Ala Gln Ala Ala Glu Glu His Pro Leu
    50                  55                  60

His Gly Gly Thr Gly Ile Ala His Thr Arg Trp Ala Thr His Gly Glu
65                  70                  75                  80

Pro Ser Glu Val Asn Ala His Pro His Val Ser Glu His Ile Val Val
                85                  90                  95
```

```
Val His Asn Gly Ile Ile Glu Asn His Glu Pro Leu Arg Glu Glu Leu
            100                 105                 110

Lys Ala Arg Gly Tyr Thr Phe Val Ser Glu Thr Asp Thr Glu Val Ile
        115                 120                 125

Ala His Leu Val Asn Trp Glu Leu Lys Gln Gly Gly Thr Leu Arg Glu
    130                 135                 140

Ala Val Leu Arg Ala Ile Pro Gln Leu Arg Gly Ala Tyr Gly Thr Val
145                 150                 155                 160

Ile Met Asp Ser Arg His Pro Asp Thr Leu Leu Ala Ala Arg Ser Gly
                165                 170                 175

Ser Pro Leu Val Ile Gly Leu Gly Met Gly Glu Asn Phe Ile Ala Ser
            180                 185                 190

Asp Gln Leu Ala Leu Leu Pro Val Thr Arg Arg Phe Ile Phe Leu Glu
        195                 200                 205

Glu Gly Asp Ile Ala Glu Ile Thr Arg Arg Ser Val Asn Ile Phe Asp
    210                 215                 220

Lys Thr Gly Ala Glu Val Lys Arg Gln Asp Ile Glu Ser Asn Leu Gln
225                 230                 235                 240

Tyr Asp Ala Gly Asp Lys Gly Ile Tyr Arg His Tyr Met Gln Lys Glu
                245                 250                 255

Ile Tyr Glu Gln Pro Asn Ala Ile Lys Asn Thr Leu Thr Gly Arg Ile
            260                 265                 270

Ser His Gly Gln Val Asp Leu Ser Glu Leu Gly Pro Asn Ala Asp Glu
        275                 280                 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu

<210> 10
<211> 1830
<212> DNA

<213> Seqüência artificial

<220>
<223> Seqüência sintética codificando uma proteína de Escherichia coli apresentando atividade de um GTFA

<400> 10

atgtgcggaa ttgttggtgc tatcgcccaa agagacgttg ctgagatttt gttagagggt 60
ctgcgaaggc tagagtatag aggatatgac tccgctggtc tggctgtcgt tgatgctgag 120
ggtcatatga caaggctaag aaggttagga aaggttcaga tgcttgctca ggcagctgag 180
gaacatccat tgcatggagg tactggtatt gcacatacca ggtgggctac tcatggggag 240
ccatcagaag ttaatgctca tccacatgtg agtgagcata tcgttgtagt tcacaatggg 300
ataattgaaa accacgaacc attgagggaa gagttaaagg caagaggata tacttttgtg 360
agtgagactg acactgaggt tattgcacat ttagtgaact gggaactcaa acagggggc 420
acattgcgtg aggctgtgtt aagagctatt cctcaactta gaggtgcata cggtactgtt 480
attatggatt caagacaccc agatactctc cttgcagcta gatcaggtag tcccttggtc 540
ataggacttg gaatgggtga aaattttatc gctagcgacc aattggcctt attgccagtt 600
acaagacgat ttattttcct tgaagagggc gatattgctg agattactag aaggtctgtg 660
aacatctttg ataagactgg cgctgaggtt aaacgtcagg atatcgagtc taaccttcaa 720
tacgatgctg gtgataaagg aatttacagg cattatatgc aaaaggaaat ttatgaacaa 780
ccaaatgcta tcaaaaacac acttactggc cgtatttctc atggacaggt cgatttaagc 840
gagcttggtc ctaatgcaga cgaactgcta tcaaaagttg agcacataca gatactggca 900
tgcggaacta gttataattc aggaatggtc tctagatact ggttcgaaag cttggcaggt 960
ataccttgtg atgtagagat cgcttctgag tttaggtata gaaagtctgc tgtgcgtaga 1020
aattcattaa tgattacatt atctcaatcc ggagaaacag cagatacact ggctggattg 1080
aggctttcta aggaactcgg atatctgggt tcacttgcta tttgtaatgt accaggttcc 1140
tcattggttc gtgaatcaga tctagcactt atgacaaatg caggaactga aataggtgtg 1200
gcaagtacca aggctttcac aacccaactg accgtacttt taatgttggt agcaaaactc 1260
agtcgattaa aggggctaga tgcatctatc gaacatgata ttgttcacgg gcttcaagct 1320
ctcccttcaa gaattgaaca aatgctttca caagataaga gaatagaggc attggctgaa 1380
gatttttccg acaaacatca cgcattgttt cttggacgtg gcgatcaata tccaattgca 1440
ttggaaggag ctttgaagtt gaaagaaata agttacattc acgcagaagc atatgcagct 1500
ggagaactca agcatggtcc tttggcactc atcgacgctg acatgcccgt gatcgtagtg 1560
gctcctaata acgaactgct cgaaaagctt aaatcaaata tcgaagaggt tcgagctaga 1620
ggaggtcagc tttacgtttt cgctgaacaa gatgctggat tcgtgtcaag cgataatatg 1680
catataattg aaatgcctca cgttgaagaa gtgattgcac ctatatttta tacagtccca 1740
ttgcaacttc tagcttacca tgttgcactt attaaaggaa ctgatgttga tcagcctaga 1800
aacctagcaa aatctgtaac agtcgaataa 1830

<210> 11
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotídeo sintético

<400> 11
tcgacaggcc tggatcctta attaaactag tctcgaggag ctcggtac 48

<210> 12
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 12
cgagctcctc gagactagtt taattaagga tccaggcctg 40

<210> 13
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeo sintético usado como iniciador

<400> 13
aaaaactagt tctacatcgg cttaggtgta gcaacacg 38

<210> 14
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide used as primer

<400> 14
aaaagatatc tgttgttgga ttctactact atgcttcaa 39

REIVINDICAÇÕES

1- Célula de planta geneticamente modificada que tem uma molécula de ácido nucléico codificando uma hialuronan sintase estavelmente integrada ao seu genoma, onde a dita célula de planta tem adicionalmente uma atividade aumentada de uma proteína tendo a atividade de uma glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT) comparado com as células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificadas.

2- Célula de planta geneticamente modificada de acordo com a reivindicação 1, em que a atividade aumentada de uma proteína tendo a atividade de uma glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT) é causada por introdução de uma molécula de ácido nucléico estranha na célula de planta.

3- Célula de planta geneticamente modificada de acordo com a reivindicação 2, em que a molécula de ácido nucléico estranha codifica uma proteína tendo a atividade enzimática de uma glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT).

4- Célula de planta geneticamente modificada de acordo com qualquer reivindicação 1, 2 ou 3 que sintetiza uma quantidade aumentada de hialuronan comparado com células de planta tendo a atividade de uma hialuronan sintase e nenhuma atividade aumentada de glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT).

5- Planta compreendendo células de planta geneticamente modificadas como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

6- Material de propagação de plantas de acordo com a reivindicação 5, compreendendo células de planta geneticamente modificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

7- Partes de planta que podem ser colhidas de acordo com a reivindicação 5, compreendendo células de planta geneticamente modificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

8- Processo para produção de uma planta que sintetiza hialuronan, o qual compreende:

a) modificar geneticamente uma célula de planta, onde a modifi-

cação genética compreende etapas i a ii abaixo

i) introdução de uma molécula de ácido nucléico estranha codificando uma hialuronan sintase na célula de planta

ii) introdução de uma modificação genética na célula de planta, a modificação genética resultando em um aumento da atividade de uma proteína tendo a atividade enzimática de uma glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT) comparado com células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificadas

onde as etapas i a ii podem ser realizadas em qualquer ordem, individualmente, ou quaisquer combinações de etapas i a ii podem ser realizadas simultaneamente

b) regeneração de uma planta a partir de células de planta da etapa a);

c) geração, se apropriado, de plantas adicionais usando as plantas de acordo com a etapa b),

onde, se apropriado, as células de planta são isoladas de plantas de acordo com a etapa b) i ou b) ii e as etapas de processo a) a c) são repetidas até que uma planta seja gerada a qual tem uma molécula de ácido nucléico estranha codificando uma hialuronan sintase e tem uma atividade aumentada de uma proteína tendo a atividade enzimática de uma GFAT comparado com as células de planta do tipo selvagem não-geneticamente modificadas correspondentes.

9- Processo para preparação de hialuronan, o qual compreende a etapa de extração de hialuronan de células de planta geneticamente modificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, de plantas como definidas na reivindicação 5, de material de propagação como definido na reivindicação 6, de partes de planta que podem ser colhidas de como definido na reivindicação 7 ou de plantas que podem ser obtidas através de um processo como definidas na reivindicação 8.

10- Uso de uma célula de planta geneticamente modificada como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, uma planta como definida na reivindicação 5, material de propagação de como definido na rei-

vindicação 6, partes de planta que podem ser colhidas como definidas na reivindicação 7 ou plantas que podem ser obtidas através de um processo como definido na reivindicação 8 para preparação de hialuronan.

11- Composição compreendendo células de planta geneticamente modificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

12- Processo para preparação de uma composição compreendendo hialuronan onde as células de planta geneticamente modificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, plantas como definida na reivindicação 5, material de propagação como definido na reivindicação 6, partes de planta que podem ser colhidas como definidas na reivindicação 7 ou plantas que podem ser obtidas através de um processo como definido na reivindicação 8 são usadas.

13- Uso de células de planta geneticamente modificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, de plantas como definidas na reivindicação 5, de material de propagação como definido na reivindicação 6, de partes de planta colhidas como definidas na reivindicação 7 ou de plantas que podem ser obtidas através de um processo como definido na reivindicação 8 para preparação de uma composição como definida na reivindicação 11.

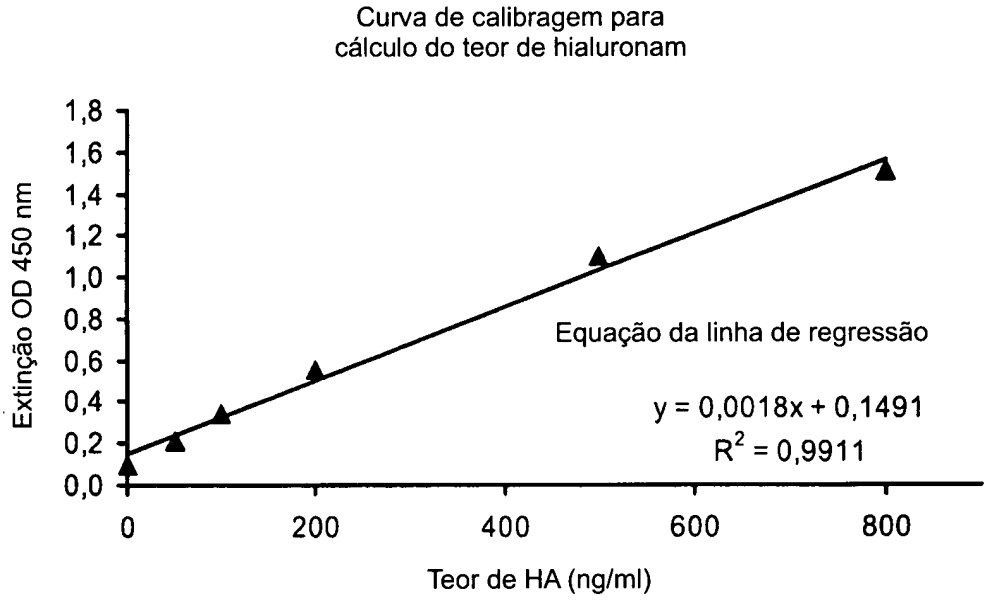

Curva de calibragem para
cálculo do teor de hialuronam
Extinção OD 450 nm
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
200
400
600
800
Teor de HA (ng/ml)
Equação da linha de regressão
y = 0,0018x + 0,1491
R2 = 0,9911

Fig. 1

RESUMO

Patente de Invenção: **"PLANTAS COM PRODUÇÃO DE HIALURONAN AUMENTADA".**

A presente invenção refere-se a células de planta e plantas que sintetizam uma quantidade aumentada de hialuronan e a métodos para preparação de tais plantas, e também a métodos para preparação de hialuronan com o auxílio dessas células de planta ou plantas. Aqui, células de planta ou plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção têm atividade de hialuronan sintase e adicionalmente uma atividade de glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT) aumentada comparado com células de planta do tipo selvagem ou plantas do tipo selvagem. A presente invenção refere-se ainda ao uso de plantas tendo síntese de hialuronan aumentada para preparação de hialuronan e alimento e ração contendo hialuronan.