

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

**PCT**

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
**INVENTARIO**

Nov  
2011

Q.P.

**SOLICITUD  
PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No.

**11-25903**

54. TÍTULO

TRANSFERASA GLUCURONILO Y UN POLINUCLEOTIDO QUE

CODIFICA EL MISMO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

SUNTORY HOLDINGS LIMITED

DOMICILIO

OSAKA, JAPON

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ  
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,



Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-025903- -00000-0000

Fecha: 2011-03-03 11:21:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEI/II Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 84

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE  
PCT  
ENTRADA EN FASE NACIONAL

|                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div>1</div> <div>SOLICITUD DE:</div> <div><input checked="" type="checkbox"/> Patente de Invención.<br/><input checked="" type="checkbox"/> Capítulo I.</div> <div><input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad.<br/><input type="checkbox"/> Capítulo II.</div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                               |
| <div>2</div> <div>SOLICITANTE<br/>(71)</div>                                                                                                                                                                                                                                | <div>Nombre: <b>SUNTORY HOLDINGS LIMITED</b><br/>Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Japón.<br/><br/>Dirección: 1-40, Dojimahama 2-chome,<br/>Kita-ku, Osaka-shi,<br/>Osaka 530-8203,<br/>Japón<br/><br/>Domicilio: Osaka,<br/>Japón</div>                                                                                                   |                                                                                      | <div>IDENTIFICACIÓN</div> <div>C.C. <input type="checkbox"/> NIT <input type="checkbox"/><br/>C.E. <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/><br/>Cual _____<br/><br/>Número _____</div>                                          |
| <div>3</div> <div>REPRESENTANTE<br/>O APODERADO</div>                                                                                                                                                                                                                       | <div>Nombre: <b>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</b><br/>Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35<br/>Teléfono: 347 36 11<br/>Fax: 211 86 50<br/>E-mail: <a href="mailto:clientes@cavelier.com">clientes@cavelier.com</a><br/>Domicilio: Bogotá, Colombia.</div>                                                                                                               |                                                                                      | <div>IDENTIFICACIÓN</div> <div>C.C. <input checked="" type="checkbox"/> NIT <input type="checkbox"/><br/>C.E. <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/><br/>Cual _____<br/><br/>Número <u>35.456.344</u> T.P <u>23.555</u></div> |
| <div>4</div> <div>INVENTOR (ES)<br/>(72)</div>                                                                                                                                                                                                                              | <div>1. <b>Eiichiro ONO</b><br/>c/o SUNTORY HOLDINGS LIMITED,<br/>Research Center, 1-1-1,<br/>Wakayamadai, Shimamoto-cho,<br/>Mishima-gun,<br/>Osaka 618-8503,<br/>Japón</div> <div>2. <b>Yuko FUKUI</b><br/>c/o SUNTORY HOLDINGS LIMITED,<br/>Research Center, 1-1-1,<br/>Wakayamadai, Shimamoto-cho,<br/>Mishima-gun,<br/>Osaka 618-8503,<br/>Japón</div> |                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                               |
| <div>5</div> <div>PCT (86)</div> <div>Solicitud Internacional No. <u>PCT/JP2008/066365</u> Fecha: <u>04 de septiembre de 2008</u><br/>Publicación Internacional No. <u>WO2010/026666 A1</u> Fecha: <u>11 de marzo de 2010</u></div>                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                               |
| <div>6</div> <div>Título (54)</div> <div><u>TRANSFERASA GLUCURONILO Y UN POLINUCLEÓTIDO QUE CODIFICA EL MISMO</u></div>                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                               |
| <div>7</div> <div>Clasificación Internacional (51) <u>C12N 015/009</u></div>                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                               |
| <div>8</div> <div>Prioridad</div> <div>SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/></div>                                                                                                                                                             | <div>(33) País de Origen</div> <div>_____</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <div>(32) Fecha</div> <div>_____</div>                                               | <div>(31) Número de Solicitud</div> <div>_____</div>                                                                                                                                                                                          |
| <div>9</div> <div>Comprobante de pago No.: <u>11-0018700</u><br/>Comprobante de pago No.: <u>11-0015577</u></div>                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <div>Fecha: <u>01 de marzo de 2011</u><br/>Fecha: <u>21 de febrero de 2011</u></div> |                                                                                                                                                                                                                                               |

10

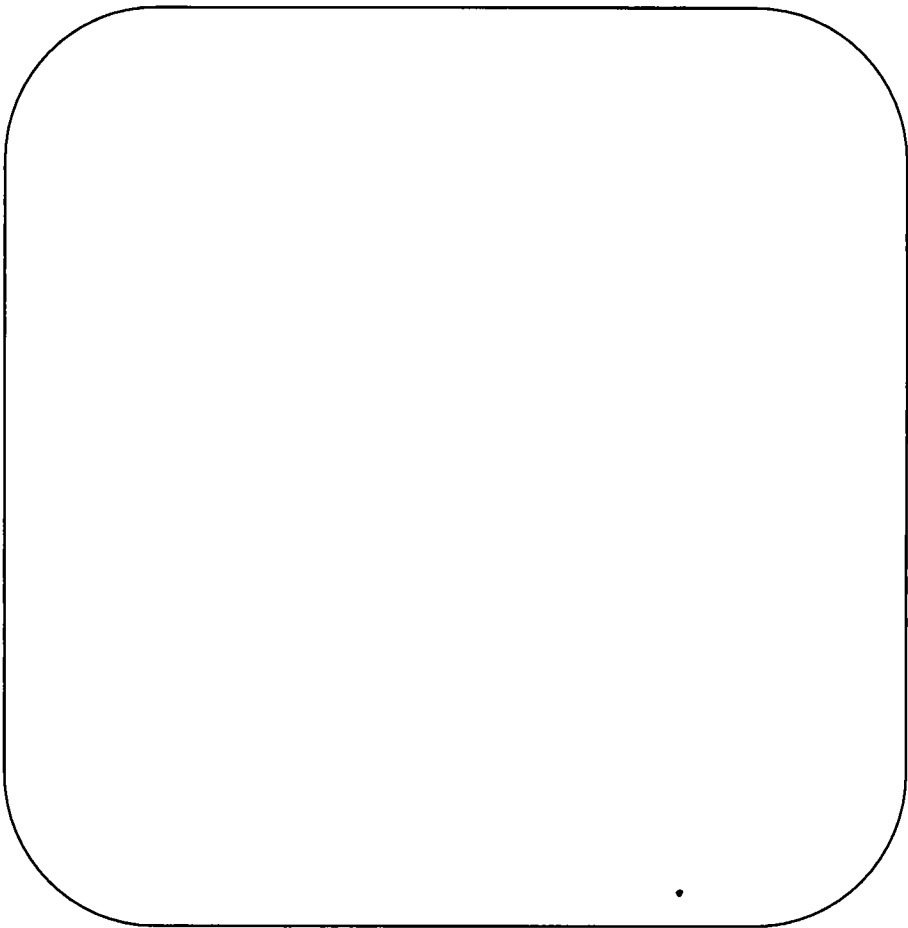
**Anexos:**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 571.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por una reivindicación adicional después de la décima reivindicación por \$27.000.oo.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

3

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :

Luz Clemencia de Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

ca

SCT

**DOCUMENTOS ANEXOS**

1. ☒ Publicación Internacional WO 2010/026666 A1

Descripción:

Páginas 45 en español

Reivindicaciones: Número (s) 11

Figuras: Número (s) 4

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4.

5. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE  
INTERNACIONAL**

65

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2010 年 3 月 11 日(11.03.2010)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2010/026666 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/09 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)  
A01H 5/00 (2006.01) C12P 19/18 (2006.01)  
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/066365
- (22) 国際出願日: 2008 年 9 月 4 日(04.09.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サントリーホールディングス株式会社(SUNTORY HOLDINGS LIMITED) [JP/JP]; 〒5308203 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 40 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小埜栄一郎 (ONO, Eiichiro) [JP/JP]; 〒6170823 京都府長岡京市長岡 2-30-13-302 Kyoto (JP). 福井祐子 (FUKUI, Yuko) [JP/JP]; 〒5691123 大阪府高槻市芥川町 1 丁目 2-A-1007 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 小林浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,

BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2010/026666 A1

(54) Title: GLUCURONYLTRANSFERASE AND POLYNUCLEOTIDE ENCODING THE SAME

(54) 発明の名称: グルクロン酸転移酵素およびそれをコードするポリヌクレオチド

(57) Abstract: Disclosed are: a novel glucuronyltransferase; a polynucleotide encoding the glucuronyltransferase (e.g., a polynucleotide comprising a polynucleotide having the nucleotide sequence lying between the nucleotide located at position-1 to the nucleotide located at position-1362 in the nucleotide sequence depicted in SEQ ID NO:7; or a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein having the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:8); and others. It becomes possible to provide a novel glucuronyltransferase having broad substrate specificity and others.

(57) 要約: 本発明は、新たなグルクロン酸転移酵素、およびそれをコードするポリヌクレオチド (例えば、配列番号: 7 で表される塩基配列の第 1 番目 ~ 第 1362 番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド; または配列番号: 8 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド) などを提供する。これにより、基質特異性の広い、新たなグルクロン酸転移酵素などが提供される。

7

## Descripción

Transferasa glucuronilo y un polinucleótido que codifica el mismo

## Campo técnico

La presente invención se refiere a una transferasa glucuronilo, un poli nucleótido que codifica el mismo, un vector que comprende el mismo, un transformante, etcétera.

## Antecedentes del arte

Flavonoides son un término colectivo para los metabolitos secundarios en el camino fenil propanoide. Antocianinas, un tipo de flavonoides, son pigmentos de color mayores los cuales determinan los colores de las flor de especialmente rojo, o anaranjado a morado azulado. Flavona o glucósidos de flavonol, los cuales son un tipo de flavonoides, demuestran ellos mismos un color pálido amarillo pero forma complejos con pigmentos antocianina para crear mayores efectos en el tono de color de las flores y por lo tanto son llamados copigmentos. En general, un cambio del color de la flor hacia el lado de la longitud de onda azul es llamado copigmentación.

Apigenina 7- O- Glucurónido (glucurónidos conjugados, también llamados como glucósidos Glucurónido) es acumulada en los pétalos de boca de dragón

*Lamiales, Scrophulariaceae, Antirrhinum majus*, el cual considerado que funcione como un copigmento (Documento 1: Asen, S. et al., *Phytochemistry* 11, 2739-

2741, 1972). El pigmento de los pétalos azules de *asterales*, *asteraceae*, *centaurea cyanus* forma un complejo metálico y flavona 7- O- glucurónidos los cuales se encuentran en los complejos metálicos (Documento 2: Shiono, M. et al., Nature 436, 791- 792, 2005).

Flavona 7- O- glucurónidos llamados baicalin teniendo una actividad anti-inflamatoria acumulada en la base del *Lamiales*, *Lamiaceae*, *Scutellaria baicalensis*. La base es usada como una hierba china medicinal (owgon) que exhibe efectos estomacales (Documento 3: Gao, Z. et al., Biochemica et Biophysica Acta 1472, 643-650, 1999). SbUBGAT (también llamado como Sb7GAT) es purificado de la base de *Scutellaria baicalensis* como una transferasa la cual transfiere ácido glucurónico a la posición 7- O de baicaleína (Documento 4: Nagashima S. et al., Phytochemistry 53, 533-538, 2000). El gen correspondiente a Sb7GAT ha sido registrado en GenBank (adhesión No. AB042277) pero su función sigue sin ser identificada. En los últimos años, ha sido claro que 7- O- glucurónidos de varias flavonas son acumuladas también en las hojas de *lamiaceae perilla frutescens* que rutinariamente son comidos, y su funcionalidad en la salud humana es esperada (Documento 5: Yamazaki, M. et al. Phytochemistry 62, 987-998, 2003).

De esta manera, flavona 7-O -glucurónidos son los metabolitos secundarios de plantas las cuales han llamado mucha atención en el campo del color de las flores y alimentación saludable. Sin embargo, sus enzimas bio sintéticas (ej., glucuronosilo transferasa) siguen sin ser adecuadamente conocidos.

[Documentos]

1. Asen, S. et al., Phytochemistry 11, 2739-2741, 1972
2. Shiono, M. et al., Nature 436, 791-792, 2005
3. Gao, Z. et al., Biochemica et Biophysica Acta 1472, 643-650, 1999
4. Nagashima S. et al., Phytochemistry 53, 533-538, 2000
5. Yamazaki, M. et al., Phytochemistry 62, 987-998, 2003

**Demostración de la invención**

Bajo estas circunstancias, ha sido deseado identificar una transferasa glucuronosilo novedosa teniendo una especificidad de substrato más amplia y codificación genética igualmente.

Teniendo en cuenta las siguientes circunstancias la presente invención ha sido hecha y provee los siguientes glucuronosilo transferasa y codificación de poli nucleótidos igualmente, también como vectores comprendidos igualmente, transformantes, y de más.

(1) Un poli nucleótido de cualquiera de (a) a (f) de los siguientes:

(a) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos en posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 7;

- (b) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína teniendo una secuencia de amino ácidos representada por SEQ ID NO: 8;
- (c) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína teniendo una secuencia de amino ácidos representada por SEQ ID NO: 8 en la cual los amino ácidos 1 a 15 son borrados, substituidos, insertados y o añadidos y teniendo una actividad UDP- glucuronosilo transferasa;
- (d) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína teniendo una secuencia de amino ácido teniendo por lo menos 80% de homología a la secuencia de amino ácidos representada por SEQ ID NO: 8 y teniendo una actividad UDP- glucuronosilo transferasa;
- (e) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que comprende una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos en posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 7 y codifica una proteína teniendo una actividad UDP- glucuronosilo transferasa; y,
- (f) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que consiste de la secuencia de amino ácidos representada

por SEQ ID NO: 8, y codifica una proteína teniendo una actividad UDP- poli nucleótido.

(2) El poli nucleótido de acuerdo a la reivindicación 1, el cual es cualquiera de (g) a (j) descritos próximamente:

- (g) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína que consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8 en la cual en la mayoría de los 10 amino ácidos son borrados, substituidos, insertados y o añadidos y teniendo una actividad UDP- glucuronosilo transferasa;
- (h) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína teniendo una secuencia de aminoácido teniendo por lo menos 90% de homología a la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8 y teniendo una actividad UDP- glucuronosilo transferasa;
- (i) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo altas condiciones estrictas con un poli nucleótido que comprende una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido en posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 7 y codifica una proteína teniendo una actividad UDP- glucuronosilo transferasa; y,
- (j) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones altamente estrictas con un poli nucleótido que consiste de una

secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de un poli nucleótido que codifica una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 y codifica una proteína teniendo una actividad UDP- glucuronosilo transferasa.

- (3) El poli nucleótido de acuerdo a (1) anteriormente, el cual comprende un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótidos en posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 7.
- (4) El poli nucleótido de acuerdo a (1) anteriormente, el cual comprende un poli nucleótido que codifica una proteína que consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8.
- (5) El poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de (1) a (3) anteriormente, el cual es un ADN.
- (6) Una proteína codificada por el poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de (1) a (5) anteriormente.
- (7) Un vector que comprende el poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de (1) a (5) anteriormente.
- (8) Un transformante transformado con el poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de (1) a (5) anteriormente.
- (9) Un transformante transformado con el vector de acuerdo a (7) anteriormente.

- (10) Un método para producir la proteína de (6) anteriormente, el cual comprende el uso del transformante de acuerdo a (8) o (9) anteriormente.
- (11) Un método para producir un glucurónido conjugado, el cual comprende la formación de glucurónido conjugado del ácido glucurónico-UDP y sustrato selector glicosil usando la proteína de acuerdo a (6) anteriormente como un catalizador.

El poli nucleótido de la presente invención es útil, por ejemplo, para la producción de una novedosa glucuronosilo transferasa la cual comprende la introducción de poli nucleótido dentro de un transformante. En una realización preferida de la presente invención, la glucuronosilo transferasa tiene una especificidad de sustrato más amplia y una actividad para la glucuronidación de varios sustratos selectores de glicosil.

#### **Breve descripción de los dibujos**

FIG. 1 es una fotografía de SDS- PAGE en la cual la proteína expresiva *Escherichia coli* fue confirmada. M: marcador de tamaño, P: fracción de gránulo, C: fracción de enzima en bruto, FT: fracción no- adsorbida, 50: fracción eluida con 50 mM imidazol, 200: fracción eluida con 200 mM imidazol, 500: fracción eluida con 500 mM imidazol, flecha: proteína de objetivo (VpF7GAT) en la cual *Escherichia coli* fue expresada.

FIG. 2 (A) es un diagrama que demuestra los resultados del análisis HPLC de apigenina. FIG. 2 (B) es un diagrama que demuestra los resultados del análisis

HPLC de la solución de reacción de enzimas (apigenina y UDP- ácido glucurónico). FIG. 2 (C) es un diagrama que muestra los resultados del análisis HPLC de apigenina 7- O- glucurónido. FIG. 2 (D) es un diagrama que muestra los resultados de medida de la solución de reacción de enzimas ((apigenina y UDP- ácido glucurónico) por TOF- MS.

FIG. 3 es un dibujo que muestra los resultados de análisis del sustrato selector glicosil de VpF7GAT para su especificidad de sustrato.

FIG. 4 es un dibujo que muestra el análisis de expresión del gen VpF7GAT en diferentes órganos a través de RT- PCR cuantitativo.

[Lista de secuencia libre de texto]

SEQ ID NO: 1: ADN Sintético

SEQ ID NO: 2: ADN Sintético

SEQ ID NO: 3: ADN Sintético

SEQ ID NO: 4: ADN Sintético

SEQ ID NO: 5: ADN Sintético

SEQ ID NO: 6: ADN Sintético

SEQ ID NO: 9: ADN Sintético

SEQ ID NO: 10: ADN Sintético

SEQ ID NO: 11: ADN Sintético

SEQ ID NO: 12: ADN Sintético

SEQ ID NO: 13: ADN Sintético

SEQ ID NO: 14: ADN Sintético

**Mejor forma de llevar a cabo la invención**

De aquí en adelante, la transferasa glucuronosilo de la presente invención, el poli nucleótido codificado en el mismo, el vector que comprende el mismo, el transformante y de esa manera será descrita en detalle.

El pigmento antocianina principal de *V. pérsica* que pertenece al género *Veronica* de la familia *Scrophulariaceae* en el orden *Lamiales*, del cual produce una flor azul, es delfinidina o 3- O- (3- O- (6- O- coumaroil) – glucosil)- 6- O- coumaroil- glucósido- 5- O- glucósido y la flavona principal es apigenina 7- O- (3- O- glucuronosilo) – glucurónido (Miho Ruike, Tesis Maestra en la Universidad Toyo, 2003). Esta flavona 7- O- glucurónido teniendo una columna de apigenina demuestra efectos de copigmento marcados en el pigmento antocianina principal, y es por lo tanto considerado ser responsable por el color de la flor de *Veronica pérsica*. La presente invención aisló el gen de flavonoide 7- O- transferasa glucuronosilo (F7GAT) del cADN de los pétalos de *Veronica pérsica* usando PCR y obtuvo el poli nucleótido (SEQ ID NO: 7) el cual es una demostración de la presente invención.

1. Poli nucleótido de la presente invención.

Genotipo, la presente invención provee (a) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que consiste de la secuencia de nucleótido en posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NOL: 7 (específicamente, un ADN, de aquí en adelante de vez en cuando referido simplemente como "ADN"), y (b) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una

proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8. El ADN marcado en la presente invención no se limita sólo al ADN que codifica la transferasa glucuronosilo descrito previamente pero también incluye otro ADN que codifique una proteína funcionalmente equivalente a esta proteína.

La proteína funcionalmente equivalente es, por ejemplo, (c) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8 en la cual 1 a 15 aminoácidos son removidos, substituidos, insertados y o añadidos y que tenga una actividad de transferasa glucuronosilo- UDP. Dicha proteína incluye, por ejemplo, una proteína que consiste de una secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8 donde 1 a 15, 1 a 14, 1 a 13, 1 a 12, 1 a 11, 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6 (1 muchos) 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2 o 1 aminoácido (s) es/ son eliminados, substituidos, insertados y o añadidos y teniendo una actividad de transferasa glucuronosilo- UDP. En general, entre menor sea el número de disminuciones, substituciones, inserciones, y o adiciones, será más preferible.

La proteína funcionalmente equivalente también incluye, por ejemplo, (d) una proteína que tiene una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos una homología de 80% a la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8 y teniendo una actividad de transferasa glucuronosilo- UDP. Dicha proteína incluye una proteína que tiene una secuencia de aminoácido que tiene una homología de aproximadamente 80% o mayor, 81% o mayor, 82% o mayor, 83% o mayor, 84% o mayor, 85% o mayor, 86% o mayor, 87% o mayor, 88% o mayor, 89% o mayor, 90% o mayor, 91% o mayor, 92% o mayor, 93% o mayor, 94% o mayor, 95% o

mayor, 96% o mayor, 97% o mayor, 98% o mayor, 99% o mayor, 99.1% o mayor, 99.2% o mayor, 99.3% o mayor, 99.4% o mayor, 99.5% o mayor, 99.6% o o mayor, 99.7% o mayor, 99.8% o mayor, o 99.9% o mayor, a la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8, y teniendo la actividad de transferasa glucuronosilo- UDP. En general, entre mayor sea el porcentaje de homología anterior, será más preferible.

Como se usa aquí, el término " actividad de transferasa glucuronosilo- UDP" se refiere a una actividad de catalizar la reacción que comprende la glucuronidación de grupos hidroxilos grupos del selector glicosil substratos como flavonoides, estilbenos, líganos, etc. (glucuronidación de, ej., un flavonoide en su posición 7 OH) para formar conjugados glucurónidos.

La actividad de transferasa glucuronosilo- UDP puede ser evaluada, por ejemplo, al reaccionar el ácido glucurónico con un substrato selector de glicosil (ej. una flavona) presencia de una enzima analito para ser evaluada y analizada el producto de reacción por HPLC, etc. (cf., ejemplos serán descritos con más detalles después).

La presente mención también incluye (e) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que comprende una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido en las posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 7 y codifica una proteína que contiene una actividad de

transferasa glucuronosilo- UDP, y (f) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido de un poli nucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8 y codifica una proteína que contiene una actividad de transferasa glucuronosilo- UDP.

Como se usa aquí, el "poli nucleótido" se usa para significar ADN o ARN, preferiblemente un ADN.

Como se usa aquí, el término "poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas" se refiere a, por ejemplo, un poli nucleótido obtenido por la hibridación en colonia, hibridación de placa, hibridación sureña o sus parecidos, usando como una muestra todo o parte de un poli nucleótido que consiste de secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido en las posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 7 o un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido de un poli nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8. El método de hibridación puede ser un método descrito, por ejemplo, Sambrook & Russell, clonación molecular: un manual de laboratorio Vol. 3, Cold Spring Harbor, prensa de laboratorio 2001, Ausubel, protocolos recientes de biología molecular, John Wiley & Sons 1987-1997, etc.

Como se usan aquí, las "condiciones estrictas" pueden ser cualquiera de las condiciones levemente estrictas, condiciones moderadamente estrictas o condiciones altamente estrictas. Las "condiciones levemente estrictas" son, por ejemplo, 5x SSC, 5x solución Denhardt's, 0.5% SDS, 50% formamida y 32°C. Las "condiciones moderadamente estrictas" son, por ejemplo, 5x SSC, 5x solución Denhardt's, 0.5% SDS, 50% formamida y 42°C. Las "condiciones altamente estrictas" son, por ejemplo, 5x SSC, 5x solución Denhardt's, 0.5% SDS, 50% formamida y 50°C. Bajo estas condiciones, conforme la temperatura es más alta, un ADN con mayor homología se espera ser obtenido eficientemente a mayores temperaturas, sin embargo múltiples factores se envuelven en el nivel de exigencia de hibridación incluyendo la temperatura, concentración de muestra, longitud de muestra, fuerza iónica, tiempo, concentración de sal y sus parecidos. Una persona conocedora del arte puede lograr exigencia similar al elegir estos factores de una manera apropiada.

Cuando un equipo disponible comercialmente para la hibridación, por ejemplo, Alkphos Direct Labeling Reagents (producido por Amersham Pharmacia) puede ser usado. En este caso, de acuerdo al protocolo añadido, una membrana es incubada con una muestra marcada por toda la noche, la membrana es lavada con un buffer de lavado primario que contiene 0.1% (w/v) SDS a 55°C y el ADN hibridado puede ser detectado.

Adicionalmente a aquellos escritos debajo, otros poli nucleótidos que pueden ser hibridados incluyen ADNs que tengan una homología de aproximadamente 60% o

mayor, aproximadamente 70% o mayor, 71% mayor, 72% mayor, 73% mayor, 74% o mayor, 75% o mayor, 76% o mayor, 77% o mayor, 78% o mayor, 79% o mayor, 80% o mayor, 81% o mayor, 82% o mayor, 83% o mayor, 84% o mayor, 85% o mayor, 86% o mayor, 87% o mayor, 88% o mayor, 89% o mayor, 90% o mayor, 91% o mayor, 92% o mayor, 93% o mayor, 94% o mayor, 95% o mayor, 96% o mayor, 97% o mayor, 98% o mayor, 99% o mayor, 99.1% o mayor, 99.2% o mayor, 99.3% o mayor, 99.4% o mayor, 99.5% o mayor, 99.6% o mayor, 99.7% o mayor, 99.8% o mayor o 99.9% o mayor, a un ADN que codifica un ADN de la secuencia de nucleótido en posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 7, o un ADN que codifique la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8, como se calcula a través de un programa de búsqueda de homología, como es FASTA y BLAST usando parámetros predeterminados.

La homología entre secuencia de aminoácidos o secuencias de nucleótidos puede ser determinado usando el algoritmo BLAST por Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873, 1993). Programas llamados BLASTN y BLASTX basados en el algoritmo BLAST han sido creados (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215: 403, 1990). Cuando una secuencia de nucleótido es secuenciada usando BLASTN, los parámetros son, por ejemplo, puntaje = 100 y longitud de palabra = 12. Cuando la secuencia de aminoácido es secuenciada usando BLASTX, los parámetros son, por ejemplo, puntaje de longitud de palabra = 3. Cuando los programas BLAST y BLAST intercalado son

usados, parámetros predeterminados para cada uno de los programas son empleados.

El poli nucleótido de la presente invención descrita previamente puede ser adquirido a través de conocidas técnicas de ingeniería genética o conocidas técnicas sintéticas.

## 2. Proteína de la invención

En una siguiente demostración, la presente invención también provee una proteína codificada por el poli nucleótido de la presente invención descrita previamente. En una demostración de la presente invención, la proteína de la presente invención es una proteína que consiste de una secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8. En una siguiente demostración de la presente invención, la proteína es una proteína que contiene la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8. En una demostración aún más lejana de la presente invención, la proteína es una proteína que consiste en la secuencia de aminoácido representada por la secuencia SEQ ID NO: 8 en la cual 1 a 15 aminoácidos son removidos, substituidos, insertados y o añadidos y tienen una actividad de transferasa glucuronosilo- UDP. Dicha proteína incluye una proteína que tiene la secuencia de aminoácido que tiene la homología descrita anteriormente a la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8. Y teniendo la actividad de transferasa glucuronosilo- UDP. Estas proteínas pueden ser obtenidas usando mutagénesis dirigida al sitio de escrita en Sambrook &

Russell, relación molecular: un manual de laboratorio, Vol. 3, Cold Spring Harbor, Prensa de laboratorio 2001, Ausbel, protocolos recientes en la biología molecular, John Wiley & Sons 1987-1997, Nuc. Acids Res., 10, 6487 (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982), Gene, 34, 315 (1985), Nuc. Acids Res., 13, 4431 (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985), etc.

En la secuencia de aminoácido para la proteína de la presente invención, la substracción, substitución, inserción, y o adición de uno o más (ej., 1 a 15, preferiblemente 10 o menos) residuos de aminoácido significa que una o una cantidad de residuos de aminoácidos son removidos, substituidos, insertados y o añadidos a una cantidad de posiciones en la misma secuencia de aminoácido. Dos o más tipos de reducciones, substitución es, inserciones, y adiciones pueden ocurrir al mismo tiempo.

Ejemplos de residuos de aminoácido los cuales son sustituibles mutuamente son dados próximamente. Residuos de aminoácido en el mismo grupo son mutuamente sustituibles.

Grupo A: leucina, isoleucina, norleucina, valina, norvalina, alanina, ácido 2-aminobutanoico, metionina, o-metilo serina, t-butilo glicina, t-butilo alanina y ciclo hexilo alanina; Grupo B: ácido aspártico, ácido glutámico, iso ácido aspártico, isoácido glutámico, 2-ácido amino adípico y 2-ácido amino subérico; Grupo C: asparagina y glutamina; Grupo D: lisina, arginina, ornitina, 2,4-ácido di amino butanoico y 2,3-ácido di amino propiónico; Grupo E: prolina, 3-hidroxiprolina and 4-

hidroxiprolina; Grupo F: serina, treonina y homoserina; y Grupo G: fenilalanina y tyrosine.

Las proteínas de la presente invención también pueden ser producidas por métodos de síntesis química como el método Fmoc (método fluorenilo metilo oxi carbonilo) y el método tBoc (método t- butilo oxi carbonilo). Adicionalmente, sintetizadores péptidos disponibles de Advanced ChemTech, Perkin Elmer, Pharmacia, Protein Technology Instruments, SyntheCélula- Vega, PerSeptive, Shimadzu Corp., etc. también pueden ser usados para la síntesis.

Incluida aquí, la proteína de la presente invención es una transferasa glucuronosilo. El término "transferasa glucuronosilo" cataliza la reacción de la transferencia de residuos de ácido glucurónico de un donante glicosil a un substrato selector glicosil para formar el conjugado glucurónido. En la presente invención, el substrato selector glicosil es, por ejemplo, un flavonoide, un estilbeno, un coumarin y un lignano. El donante glicosil es, ej., ácido glucurónico-UDP. En una demostración de la presente invención, la proteína cataliza la reacción de la transferencia de residuos de ácido glucurónico desde ácido glucurónico-UDP a substrato selector glicosil para formar el conjugado glucurónido y UDP.

Los flavonoides los cuales son substratos selectores glicosil incluyen flavonas, flavonol, flavanonas, isoflavonas, C-heterósidos, auronas, catequinas, y sus parecidos. Entre ellos, ejemplos de flavonas incluyen baicaleína, escutelareína,

apigenína, luteolina, triacetina, diosmetina y chrysoeriol. Ejemplos de flavonol incluyen quercetina, miricetina y kaempferol. Un ejemplo de flavona es naringenina. Ejemplos de isoflavonas son genisteína, daidzeína y formononetina. Ejemplos de C- heterósidos de flavona incluyen vitexina, isovitexina y orientina. Un ejemplo de aurones es aureusidina. Ejemplos de catequinas son catechin y epigallocatechin gallate.

El estilbeno incluye resveratrol y su glicosido piceid, etc.

El lignano incluye (+)-pinoresinol, (+)-piperitol, (+)-sesaminol, (+)-secoisolariciresinol, (+)-sesamin catechol 1 (SC1), (+)-sesamin catechol 2 (SC2), (+)-episesamin catechol 2 (EC2), matairesinol, etc.

En una demostración de la presente invención, en substrato Selector glicosil es un flavonoide. En otra demostración de la presente invención, el substrato selector glicosil es una flavona con un grupo y hidroxil en la posición 4' del aro B. en una demostración aun más lejana de la presente invención, el substrato selector glicosil es por lo menos un substrato selector glicosil elegidos de un grupo que consiste de escutelareína, apigenína, luteolina, diosmetina, chrysoeriol, kaempferol y naringenina.

Por ejemplo, la transferasa glucuronosilo (VpF7GAT) que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 de muestra una actividad con el substrato selector glicosil es una flavona como por ejemplo escutelareína, baicaleína, apigenína, luteolina, diosmetina, chrysoeriol, etc., flavonol como por

ejemplo quercetina, kaempferol, etc. Y flavanonas como por ejemplo naringenina, etc. Especialmente cuando el sustrato es escutelareína, apigenina, luteolina, diosmetina, chrysoeriol, kaempferol and naringenina, la actividad es tan fuerte como cuando se compara a otros sustratos selectores glicosil.

### 3. vector y transformante conteniendo los mismos.

En otra demostración, la presente invención provee un vector de expresión que comprende el poli nucleótido de la presente invención. El vector de la presente invención comprende un poli nucleótido de la presente invención (ej., cualquiera de los poli nucleótidos (a) a (j) descritos previamente).

Preferiblemente, el vector de expresión de la presente invención comprende cualquiera de los poli nucleótidos (g) a (j) descritos previamente. Aún más preferiblemente, el vector de expresión comprende un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido en posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 7, o un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína que consiste de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

El vector de la presente invención es construido generalmente para contener un casete de expresión que comprende (i) un promotor que puede ser transcrito en una hospedadora Célula, (ii) el poli nucleótido de la presente invención conectado al promotor previamente discutido (ej., cualquiera de los poli nucleótidos en (a) a (j) descritos previamente), y (iii) una señal que funciona en la hospedadora Célula

con respecto a la finalización de la transcripción y la poliadenilación de la molécula de RNA. El vector por lo tanto construido es introducido dentro de una hospedadora Célula. Para construir el vector de expresión, métodos usando un plásmido, fago o cósmido son usados pero no son limitados particularmente.

Específicos tipos de vector es que no son particularmente limitados, y vectores capaces de ser expresados en una hospedadora Célula pueden ser elegidos adecuadamente. Esto es, una secuencia promotora adecuada puede ser elegida dependiendo en el tipo de hospedadora Célula para expresar de una manera confiable el poli nucleótido de la presente invención, y un vector obtenido al incorporar esta secuencia y el poli nucleótido de la presente invención dentro de varios plásmido o de sus parecidos los cuales pueden ser usados como vectores de expresión.

El vector de expresión de la presente invención contiene una región de control de expresión (por ejemplo, un promotor, un terminado, y o un origen de replicación, etc.) dependiendo en qué tipo de hospedadora será introducida. Un promotor convencional (por ejemplo, promotor trc, promotor tac, promotor lac, etc.) es usado como un promotor para un vector de expresión bacteriano. Como un promotor para levadura, han sido usados, por ejemplo, un promotor gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, promotor PH05, etc. como un promotor para hongos se han usado, por ejemplo, amylase, trpC, etc. adicionalmente, un promotor viral (ej., antiguo promotor SV 40, nuevo promotor SV 40, etc.) es usado como promotor de células hospedadora provenientes de animales.

El vector de expresión preferiblemente contiene al menos el marcador selectivo. El marcador disponible incluye un marcador auxotrófico (ura 5, nia D), un marcador resistente a drogas (higromicina, zeocin), un marcador resistente al genético (G418r), un gen resistente al cobre (CUP1) (Marin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 337, 1984), un gen resistente a cerulenina (fas 2m, PDR4) (Junji Inokoshi et al., Bioquímica, 64, 660, 1992; y Hussain et al., Gene, 101: 149, 1991, respectivamente), y sus parecidos.

La presente invención provee un transformante en el cual el poli nucleótido de la presente invención (por ejemplo, el poli nucleótido descrito en cualquiera de (a) a (j) anteriormente) sea introducido.

Un método para preparar (método de producción) el transformante no es particularmente limitado e incluye, por ejemplo, un método que comprende la introducción del recombinante vector dentro del hospedadora seguido por la transformación. La célula hospedadora usada aquí no está particularmente limitada y varios tipos conocidos de células pueden ser usados preferiblemente. Ejemplos específicos son bacterias como *Escherichia coli*, etc., levadura (incipiente levadura *Saccharomyces cerevisiae*, levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*), nematodo (*Caenorhabditis elegans*), ovocitos de rana con garras (*Xenopus laevis*), etc. medios de cultura y condiciones adecuadas para las células hospedadora anteriores son bien conocidas en el arte. Los organismos que serán transformados no son limitados particularmente, e incluyen

varios microorganismos, plantas y animales grados como ejemplos de las células hospedadora anteriores.

Para la transformación de las células hospedadora, se pueden usar métodos generalmente conocidos. Por ejemplo, métodos que pueden ser usados incluyen pero no están limitados al método de electro portación (Mackenzie D. A. et al., Appl. Environ. Microbiol., 66, 4655-4661, 2000), método de envío de partículas (método descrito en JPA 2005-287403 "Method of Breeding Lipid-Producing Fungus" (método de crecimiento de hongos productores de lípidos)), el método esfero plasto (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929 (1978)), el método de acetato de litio (J. Bacteriology, 153: 163 (1983)), y métodos descritos en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929 (1978), Methods in levadura genetics, 2000 Edición: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, etc.

En otra demostración de la presente invención, el transformante puede ser un transformante de planta. La planta transformante de acuerdo a la presente invención puede ser adquirida al introducir el vector recombinante que carga el poli nucleótido de la presente invención dentro de la planta de dicha forma que el poli péptido codificado por dicho poli nucleótido pueda ser expresado.

Donde un vector de expresión de recombinante es usado, el vector de expresión recombinante usado para transformar a la planta no está limitado particularmente mientras que el vector sea capaz de expresar el poli nucleótido de la presente invención en dicha planta. Ejemplos de dichos vectores incluyen

un promotor que contienen vector capaz de expresar constitutivamente el poli nucleótido en las células de las plantas ( ej., un promotor 35S del virus mosaico coliflor), y un vector activado induciblemente por estimulación externa.

Plantas las cuales serán el objetivo de la transformación de la presente invención puede ser cualquiera de los cuerpos de planta completos, órganos de la planta (ej., hojas, pétalos, ramas, raíces, semillas, etc.), tejidos de la planta (ej., epidermis, liber, parénquima, xilema, haces vasculares, tejidos empalizados, tejido esponjoso, etc.) o culturas de células de planta, o varios tipos de células de plantas (ej., células de cultura en suspensión), protoplastos, rodajas de hoja, callos, y sus parecidos. Ejemplos específicos de especies de planta los cuales son usados para la transformación incluyen, pero no están limitados, aquellos que pertenecen a los *Monocotyledoneae* o a los *Dicotyledoneae*.

Para la transformación de genes dentro de las plantas, métodos de transformación convencionales conocidos aquel conocedor del arte (ej., el método *Agrobacterium*, pistola de genes, el método PEG, el método electroporación, etc.) son usados. Por ejemplo, el método mediado- *Agrobacterium* y el método de introducción directa dentro de las células de la planta son bien conocidos. Cuando el método es *Agrobacterium* usado, el vector de expresión de planta construido es introducido dentro de una rama apropiada de *Agrobacterium* (ej., *Agrobacterium tumefaciens*), seguido por la infección de un disco aséptico de cultura de hojas con esta rama de acuerdo al método de discos de hojas (Hirobumi Uchimiya, manuales para la manipulación de genes de plantas (1990), 27-31, Kodansha

Scientific Co., Ltd., Tokyo). Por lo tanto, la planta transgénica puede ser obtenida. Adicionalmente, el método de Nagel, et al. (Micribiol Lett., 67.325 (1990)) puede ser usado. Éste método envuelve genotipo la introducción, ej., un vector de expresión dentro de *Agrobacterium* y después la introducción del *Agrobacterium* transformado dentro de las células de las plantas o tejidos de plantas de acuerdo al método descrito en Plant Molecular Biology Manual (S. B. Gelvin, et. al., Academic Press Publishers). Aquí, el "tejido de plantas" incluye callos, el cual es obtenido al culturizar células de plantas. Cuando la transformación se lleva a cabo usando el método *Agrobacterium*, vectores binarios (p BI 121, p PZP 202, etc.) pueden ser usados.

Para una transferencia directa de genes dentro de las células de la planta con los tejidos de la planta, el método de electroporación y el método de la pistola de genes son conocidos. Cuando la pistola de genes es usada, el cuerpo de la planta entero, órganos de la planta o tejidos de la planta de esta manera pueden ser usados, como pueden ser usados después de la preparación de las secciones, o puede ser usado después de la preparación de protoplastos. Las muestras de esta manera preparadas pueden ser bombardeadas usando un aparato de transferencia de genes (ej., PDS-1000 (BIO-RAD, Inc.), etc.). Condiciones de bomba ardimiento varían dependiendo del tipo de planta muestra. Normalmente, la muestra es bombardeada bajo presión de aproximadamente 450 a 2000 psi a una distancia de aproximadamente 4 a 12 cm.

Las células o tejidos de la planta en los cuales el gen es introducido son genotípicamente seleccionados por la resistencia química como una resistencia a higromicina, etc. y después regenerados dentro del cuerpo de la planta de una manera convencional. La regeneración del cuerpo de la planta de las células transformante puede ser llevada a cabo por métodos conocidos aquel conocedor del arte, dependiendo del tipo de célula de la planta.

Cuando la cultura de células de la planta es usada como una hospedadora, la transformación se lleva a cabo introduciendo el vector recombinante dentro de la célula de cultura por medio de una pistola de genes, el método electroporación, etc. Callos, brotes, raíces peludas por sus parecidos resultantes de la transformación pueden ser usadas como una cultura de células, cultura de tejidos o cultura de órganos como sean. Alternativamente, estos tejidos o células pueden ser permitidos para ser generados dentro de una planta a través de cualquier método convencional conocido para sacar culturas de tejidos de planta al administrar una hormona de planta (auxina, citocinina, giberelina, ácido abscísico, etileno, brasinolida, etc.).

Si el gen es o no es introducido dentro de la planta puede ser confirmado a través de PCR, la hibridación sureña, la invivable acción norteña, o sus parecidos. Por ejemplo, ADN es preparado de las plantas transformadas, genotipos específicos a ADN después son diseñados, y PCR es empleado subsecuentemente. PCR puede ser empleado bajo las mismas condiciones como se usa para preparar los plásmidos descritos anteriormente. Después, la

transformación puede ser confirmada al aplicar el producto amplificado para electroforesis de gel agarosa , electroforesis de gel poliacrilamida, electroforesis capilar o sus parecidos, el producto con un colorante apropiado, como etidio bromuro, SYBR verde, etc. y después detectar el producto amplificado como una banda simple. Adicionalmente, productos amplificados también pueden ser detectados al emplear PCR usando genotipos marcados con una marca adecuada, ej., colorante fluorescente. Aún más, otros métodos que pueden ser empleados aquí envuelven la combinación del producto amplificado a una fase sólida, como un micro lámina, y después confirmando el producto amplificado a través de fluorescencia, una reacción de encima o sus parecidos. Una vez que la planta transformada donde el poli nucleótido de la presente invención es introducido dentro del genoma se ha obtenido, es posible adquirir descendientes del cuerpo de esa planta a través de reproducción sexual o asexual.

Alternativamente, las plantas pueden ser producidas en masa por materiales de crecimiento (por ejemplo, semillas, frutas, orejas, tubérculos, tubos, callos, protoplastos, etc.) obtenidos de la planta, también como descendientes o clones de ella. Cuerpos de la planta transformados capaces de expresar el poli nucleótido de la presente, descendientes del cuerpo de la planta los cuales tienen las mismas calidades cuerpo de la planta, también como tejidos obtenidos de los cuerpos de la planta o de los descendientes, son todos incluidos en la presente invención.

Adicionalmente, métodos para la transformación de varias plantas que ya han sido reportados. Ejemplos de la planta transformante de acuerdo a la presente

invención incluye pero no están limitados, ajonjolí, planta de arroz, tabaco, salvado, trigo, colza, Papa, tomate, chopo, banano, eucalipto, papá dulce, soya, alfalfa, altramuza, maíz, coliflor, Rosa, crisantemo, carburación, boca de dragón, ciclamen, orquídea, lisianthus, Fresia, gerbera, gladiolos, amoles, kalanchoe, lila, pelargonio, geranio, petunia, torenia, tulipán, Forsitia, Arabidopsis, loto, etc.

En una demostración de la presente invención, la planta transformada es una planta para materiales alimenticios funcionales.

En otra demostración de la presente invención, la planta transformada es una planta con un color de flor modificado. Preferiblemente, la planta con el color de flor modificado es una planta con su color de la flor siendo modificada a un color azul.

#### 4. Método de producción de la proteína de la invención

En otra demostración, la presente invención provee un método para producir la proteína de la presente invención usando los transformantes descritos previamente.

Específicamente, la proteína de la presente invención puede ser obtenida al aislar y purificar la proteína de la presente invención de la cultura de los transformantes descritos previamente. Como se usa aquí, la cultura se refiere a cualquiera de los líquidos de cultura, bacteria culturalizada o células culturalizadas, y el conjunto de bacteria culturalizada o células culturalizadas. Métodos convencionales pueden ser usados para aislar y purificar la proteína de la

presente invención. Específicamente, cuando la proteína de la presente invención es acumulada dentro de la cultura de bacterias o de la cultura de células, un extracto en bruto de la proteína de la presente invención puede ser obtenida al culturalizar la bacteria o células, después interrumpiendo la bacteria o células usando una técnica convencional (ej., ultrasonidos, lisosomas, congelamiento y descongelamiento, etc.) y aplicando un método convencional como filtración o centrifugación. Cuando la proteína en la presente invención es acumulada en el líquido de la cultura, el sobrenadante de la cultura que contiene la proteína de la presente invención puede ser obtenido, después del cumplimiento de la incubación, a través de separación de las bacterias o las células de la sobrenadante de la cultura en una manera convencional (ej., centrifugación, filtración, etc.).

Purificación de la proteína de la presente invención contenida en el extracto o en el sobrenadante de la cultura obtenido como se describió previamente puede ser empleada por un método convencional de separación y purificación. Los métodos de separación y purificación incluyen precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de filtración de gel, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de afinidad, cromatografía del líquido de alto rendimiento en fase reversa, diálisis, y ultrafiltración, pueden ser usados uno por uno o en una combinación adecuada.

##### 5. Método para la producción de conjugados glucurónidos

La presente invención además provee un método para la producción de conjugados glucurónidos usando la proteína de la presente invención. La proteína en la presente invención cataliza la reacción transferencia del ácido glucurónico es el donante glicosil (ej., ácido glucurónico- UDP) al substrato selector glicosil (ej., un flavonoide, un estilbeno o un lignano). Por lo tanto, conjugados glucurónico puede ser producido desde el substrato selector glicosil y el donante glicosil como los materiales principales al usar la proteína la presente invención. El substrato selector glicosil preferiblemente es un flavonoide.

El glucurónidos puede ser reproducido, por ejemplo, al preparar una solución que contiene 1mM de substrato selector glicosil, 2mM de donante glicosil, 50mM de buffer de fosfato de calcio (pH 7.5) y 20 uM de la proteína de la presente invención y reaccionar los a 30° C por 30 minutos. El conjugados glucurónidos puede ser aislado purificado de la solución por métodos conocidos. Específicamente, ej., precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de filtración de gel, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de afinidad, cromatografía reversa del líquido de alto rendimiento, ultrafiltración, diálisis, etcétera. Pueden ser usados uno por uno o en una combinación apropiada.

El conjugados glucurónidos así obtenido es útil como un re agente para materiales alimenticios funcionales, para inspeccionar sus funciones en vivo, o como un antioxidante, etcétera. (Gao, Z., Huang, K., Yang, X., and Xu, H. (1999) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472, 643-650).

## Ejemplos

La presente invención es descrita en más detalle con referencia a los ejemplos de bajo pero no está dispuesta a ser limitada a ellos.

### Ejemplo 1

#### Clonación genética

Los procedimientos biológicos moleculares usados en este ejemplo cueros llevados a cabo de acuerdo con los métodos descritos en clonación molecular (Sambrook et al., Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001), a menos de que se indique en otro lado en detalle.

Se encontró por búsqueda de homología usando el análisis BLAST que el gen de transferasa glucosil (AmUGTcg10, Accesoión No. AB362988) para *Scrophulariaceae Antirrhinum majus* tuvo 55% de homología en el nivel secuencial del aminoácido al gen de transferasa glucosil SbUBGAT (Nagashima S. et al., Phytochemistry 53, 533-538, 2000) para *Lamiaceae Scutellaria baicalensis* (Ono, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 11075-11080, 2006).

Para aislar la codificación del gen del flavonoide de 7- O- transferasa glucuronosilo VpF7GAT of *Veronica persica* del mismo género *Scrophulariaceae*, los dos genotipos (SEQ ID NOS: 1 and 2) demostrados próximamente fueron diseñados basados en la secuencia de *Antirrhinum majus* en la misma familia.

SEQ ID NO: 1

AmF7GAT-F1: 5'-GTG ATA GAT TTC TTT TGC AAT-3'

SEQ ID NO: 2

AmF7GAT-R3: 5'-ACC CTA TTC ATC CTC TGC TCC-3'

Después de que todo el ARN fue extraído de los pétalos de *Veronica pérsica* usando el mini equipo de plantas RNeasy (QUIAGEN), cADN fue sintetizado desde RT-PCR (Invitrogen) de acuerdo al protocolo recomendado por el productor. Usando el cADN como un plantilla, PCR fue llevado a cabo usando genotipos de SEQ ID NOS: 1 y 2 descritos previamente para tratar de aislar el gen codificando VpF7GAT.

Específicamente, la solución de reacción PCR (50 ul) fue compuesta de 1 ul de cADN de *Veronica pérsica*, 1 x buffer ExTaq(Takara- Bio), 0.2 mM dNTPs, 0.4 pmol cada /□l de los genotipos (SEQ ID NOS: 1 y 2) y 2.5 U ExTaq polimerasa. PCR fue realizado por la reacción a 94°C por 3 minutos y después amplificando por 35 ciclos con cada ciclo a 94° C. Por 1 minuto, 50° C. por 1 minuto y 72° C. por 2 minutos.

La solución PCR fue separada por 0.8% electroforesis de gel agarosa del fragmento de amplificación correspondiente a un tamaño de aproximadamente 1.0 kb. El fragmento amplificado fue insertado dentro del sitio de multi clonación del vector pCR- TOPOII (Invitrogen). La secuencia de nucleótido del fragmento insertado fue secuenciado por el método de para el genotipo caminante usando para el genotipo polígono creado sintético con un modelo de secuencia de ADN 3100 (bio sistemas aplicados). La secuencia de nucleótido determinada fue

analizada usando el programa CLUSTAL- W (MACVECTOR 7. 2. 2 Software, Accerly) y como resultado, demostró una homología de secuencia alta a *Antirrhinum majus* AmUGTcg10 y *Scutellaria baicalensis* SbUBGAT. Este cADN fue por lo tanto identificado como un gen candidato para VpF7GAT.

Sin embargo, la línea acción de los resultados con AmUGTcg 10 demuestra el fragmento amplificado de c ADN obtenido fue un ORF incompleto (cuadro de lectura abierto) borrado de las regiones 5' y 3'. Por consiguiente, la amplificación rápida del extremo c ADN (aquí abreviado como RACE) fue empleado usando el equipo corredor de genes (Invitrogen) de acuerdo a los métodos recomendados por el productor para amplificar las regiones 5' y 3' del fragmento de cADN. Para RACE, se usaron un equipo de genotipos específicos para el gen VpF7GAT, los son mostrados por SEQ ID NOS: 3 a 6 debajo.

SEQ ID NO: 3

GR-VpF7GAT-RV: 5'-TTC CAG GAG GGT TTC GAA CGG ACC ATA-3'

SEQ ID NO: 4

GR-VpF7GAT-nest-RV: 5'-CTA GAG GTG CAA CGA ATA AAA CTT-3'

SEQ ID NO: 5

GR-VpF7GAT-Fw: 5'-TAT GGT CCG TTC GAA ACC CTC CTG GAA-3'

SEQ ID NO: 6

GR-VpF7GAT-nest-Fw: 5'-AGG ATC CTG ACC TGG AAA CA-3'

La secuencia de nucleótido del fragmento amplificado tenía por RACE fue determinada por el método caminante de genotipo para dar un gen candidato para

VpF7GAT que contiene el largo completo ORF y su secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7 (cDNA secuencia de VpF7GAT), SEQ ID NO: 8 (amino ácido secuencia de VpF7GAT)).

Este gen candidato VpF7GAT demostró 61% y 51% de homología de secuencia, respectivamente, a *Antirrhinum majus* AmUGTcg10 y *Scutellaria baicalensis* SbUBGAT, en el nivel de secuencia de aminoácido.

## Ejemplo 2

### Construcción del vector

Para clarificar las funciones biológicas de la proteína candidata VpF7GAT para el obtenido en el ejemplo 1 (de aquí en adelante esta enzima), un vector de expresión de *Escherichia coli* capaz de expresar cADN para esta enzima fue construido. cADN conteniendo la longitud completa ORF fue amplificado por PCR usando un equipo de genotipos representados por SEQ ID NOS: 9 y 10, en específico para el gen candidato para VpF7GAT. Como el plantilla fue usado, cADNs sintetizado usando el ARN total extraído de los pétalos de *Veronica persica* descrita previamente.

### SEQ ID NO: 9

CACC-NdeI-VpF7GAT-Fw: 5'-CAC CCA TAT GGA AGA CAC AAT CAT CCT-3'

### SEQ ID NO: 10

XhoI-VpF7GAT-Rv: 5'-CTC GAG TTT TTA CCC AAT AAC CAA CTT GAT-3'

PCR (KOD Plus Polimerasa, TOYOBO) fue empleado, después de la desnaturalización termal a 94° C. por 2 minutos, con [94° C. por 15 segundos., 50° C. por 30 segundos y 68° C. por 1.5 minutos.] x 35 ciclos. El fragmento de ADN amplificado fue sub clonado al vector pCR-Blunt II-TOPO (equipo de clonación Zero Blunt TOPO PCR, Invitrogen). La secuencia de nucleótido fue confirmada por ABI 3,100 analizador genético Avant (Applied Biosystems).

El plásmido fue completamente digerido con enzimas de restricción NdeI y XhoI, y el fragmento de ADN restante de aproximadamente 1.5 kb que contiene el largo completo ORF fue ligado al vector de expresión. *E. coli* pET- 15b (Novagen) en el sitio NdeI y XhoI para dar el vector de expresión *E. coli*

### Ejemplo 3

#### Expresión y purificación de la proteína recombinante *Escherichia coli*

Usando los respectivos plásmidos obtenidos previamente, la cepa *E. coli* BL 21 (DE 3) fue transformada de una manera convencional. El transformante obtenido fue agitado y cultivado en un medio LB de 4 ml (10 g/l triptona peptona, 5 g/l extracto de levadura, 1 g/l NaCl) conteniendo 50 µg/ml de ampicilina a 37° C. por toda la noche. Cuando las células llegaron a su fase estacionaria, 4 ml del líquido del cultivo fue inoculado dentro de un medio de 80 ml de la misma composición, seguido por cultivo en agitación a 37° C. En este punto cuando la turbidez de las células (OD 600) se convirtió aproximadamente 0.7, IPTG fue añadido a las

células en una concentración final 0.5mM, seguido por agitación de la cultura a 22° C. Por 20 horas.

Los siguientes procedimientos fueron todos llevados a cabo a 4° C. El transformante cultivado fue recolectado por centrifugación (7,000 x g, 15 mins.) y 2 ml/ g células de buffer S [20 mM fosfato de sodio buffer (pH 7.4), 20 mM imidazol, 0.5 M NaCl, 14 mM  $\beta$ -mercaptoetanol] para suspender las células.

Subsecuentemente, ultrasonidos fue empleada (15 secs. X 8 intentos), seguido por centrifugación (15,000 x g, 10 mins.). Polietilenimina fue añadido al sobrenadante obtenido en una concentración final de 0.12% (p/v) y el resultado de la suspensión fue permitida mantenerse quieta por 30 minutos. Después de la centrifugación (15,000 x g, 10 mins.), el sobrenadante fue recuperado como una solución de encima en bruto. La solución de encima en bruto fue aplicada a su trampa espiral (GE Healthcare) equilibrada con Buffer S y después centrifugada (70 x g, 30 secs.). Después fue lavada con 600 ul de Buffer S, la proteína unida a la columna fue eluida a través de pasos con 600 ul cada uno de Buffer S conteniendo 100, 200 y 500 mM imidazol. En cada una de las fracciones eluidas, el buffer fue reemplaza con 20 mM de buffer de fosfato de potasio (pH 7.5) conteniendo 14 mM  $\beta$ -mercaptoetanol usando un Microcon YM-30 (Amicon).

Como resultado del análisis SDS- PAGE, la proteína purificada expresada aproximadamente 50 kDa deducida de la secuencia de aminoácido de VpF7GAT fue confirmada en la fracción eluida con 200 mM imidazol por lo tanto, esta

fracción fue usada para el análisis de enzimas (FIG. 1, flecha: proteína del objetivo).

#### Ejemplo 4

##### Reacción de enzimas y análisis del producto

Las condiciones predeterminadas de la reacción son las siguientes. Después de 50  $\mu$ l de la solución de la reacción (2 mM ácido glucurónico- UDP, 100  $\mu$ M sustrato selector glicosil, 50 mM de buffer de fosfato de potasio (pH 7.5), solución de enzimas) fue preparada, la solución de enzimas fue añadida a y para iniciar la reacción. La mezcla fue reaccionada a 30° C. por un minuto. La reacción fue después terminada al añadir 50  $\mu$ l de CH<sub>3</sub>CN conteniendo 0.5% TFA. El producto fue analizado por una fase revertida HPLC (LC-2010 System, Shimadzu Corporation).

Las siguientes son las condiciones para HPLC. Columna de velosil C30- UG- 5 (4.6 mm x 150 mm, Nomura Chemical) color de Colón a 40° C., y la fase móvil A (0.1% TFA/H<sub>2</sub>O) y la fase móvil B (0.1% TFA/90% CH<sub>3</sub>CN) las condiciones para la elución incluyen una gradiente lineal de densidad (B20%→B70%) por 15 minutos, después retención con B70% por 1 minuto más y después revirtiendo a B 20%, seguido por equilibración a 20 minutos. HPLC fue empleado en el flujo de 1 ml/min. La detección fue llevada a cabo a 280 t 360 nm usando un detector de fotodiodo de matriz SPD/ M 10 A (Shimadzu Corporation). Bajo las condiciones, apigenina (Funakoshi) como estandar apigenina 7- O- glucurónido purificado de

los pétalos de *Antirrhinum majus* y apigenina 7- O- glucósido (Funakoshi) fueron eluidos a lapsos de tiempo de retención de aproximadamente 11. 75 minutos, 8. 36 minutos y 8. 22 minutos, respectivamente (FIG. 2 (A): apigenina, FIG. 2 (C): apigenina 7- O- glucurónido).

La solución de reacción de enzimas obtenidas usando apigenina como el substrato selector glucosil ácido glucurónico- UDP como el donante glucosil fueron analizados por HPLC. Como resultado, la formación de un producto novedoso teniendo un tiempo de retención coincidente con apigenina 7- O- glucurónido usado como estándar fue confirmado (FIG. 2(B)).

Las condiciones para LC- MS son las siguientes. Columna usada: Develosil C30- UG- 3 (Nomura Chemical, 3.0 mm x 150 mm); fase móvil utilizada: agua conteniendo 0.1% ácido fórmico como agentes de elución A y como agentes de elución B 100% acetonitrilo conteniendo 0.1% ácido fórmico. Elución fue llevada a cabo usando una gradiente lineal de densidad (agentes de elución B: 20% → 70%) por 20 minutos, seguida por elución isocrática con 70% de agentes de elución B por 5 minutos (ritmo de flujo: 0.2 ml/min., horno de columna: 40° C.).

La detección fue lograda al coleccionar la información de 230-500 nm y monitoreando el cromatograma a A 337 nm usando un detector de gama de fotodiodo (SPD-M10A, Shimadzu Corporation). A TOF-MS detector (Q-TOF Premier, Micromass, UK) fue conectado al detector PDA al respaldo. El peso molecular del producto fue determinado bajo las siguientes condiciones. MS fue

determinado bajo las condiciones de medida en un modo negativo (fuente de ión: ESI, de resguardo de aerosol: leucina encefalinas ( $m/z$  554.2615  $[M-H]^-$ ), capilar: 2.7 kV, cono: 30 V, MS/MS energía de colisiones: 20 eV).

Bajo las condiciones, apigenina el cual es el sustrato eluido en el tiempo de retención de 17.51 minutos dio iones moleculares de  $m/z$  269.0441  $[M-H]^-$ . Por otra parte, en el tiempo de retención el producto eluido de 11.72 minutos dio iones moleculares de  $m/z$  445.0759  $[M-H]^-$ , y fue identificado como teniendo un ácido glucurónico pegado a la apigenina (FIG. 2(D)). Aún más a través de análisis MS/MS, los iones fragmentados de  $m/z$  269.0450  $[M-H]^-$  que coinciden con apigenina fueron detectados en este producto.

Los siguientes resultados revelaron que esta enzima fue encontrada como una proteína que tiene actividad F7GAT de *Veronica pèrsica*.

#### Ejemplo 5

##### Análisis de las funciones de las enzimas de VpF7GAT

La selectividad de esta enzima a los donantes glicosil de UDP (sustrato selector glicosil: apigenina) fue determinado de una forma similar al método de Noguchi, A. et al., Plant J. 54, 415-427, 2008. Cuando la actividad del ácido glucurónico –UDP fue creado al 100 %, la actividad relativa de la glucosa UDP fue 5.8% y la de la galactosa UDP fue a un nivel por debajo del límite de detección. La alta especificidad de esta enzima al ácido glucurónico UDP fue por lo tanto confirmada. Aún más, las especificidades del sustrato ( $K_m$ ) de esta enzima a la

apigenina y al ácido glucurónico UDP fueron  $10.7 \pm 1.7 \mu\text{M}$  y  $36.6 \pm 8.7 \mu\text{M}$ , respectivamente, y la actividad catalítica (kcat) para la apigenina fue de  $8.64 \text{ S}^{-1}$ .

La selectividad de esta enzima al sustrato aceptante glicosil (donantes glicosil: ácido glucurónico UDP) fue examinado. Esta enzima demostró la mayor actividad al sustrato de apigenina endógeno (FIG. 3). Cuando la actividad a esta apigenina fue llevada a cabo a un 100%, las actividades relativas de escutelareína, baicaleína, luteolina, diosmetina y chrysoeriol los cuales son flavonas; quercetina y kaempferol los cuales son flavonol; y naringenina el cual es un flavanona fueron 88.3%, 13.1%, 14.9%, 12.9%, 34.0%, 1.0%, 13.3%, y 18.0%, respectivamente.

Especialmente en diosmetina en el cual el 4'-hidroxi en el aro flavonoide B es metilado y en los flavonoides que tienen 2 o más grupos hidroxilo en el aro B, la actividad de esta enzima fue menor que la de las que tienen un único grupo hidroxilo en la 4' posición. Adicionalmente, ya que la actividad a baicaleína teniendo ningún grupo hidroxilo en el aro B fue menor, el grupo hidroxilo 4' en el aro B flavonoide fue redondeado al ser extremadamente importante para el reconocimiento del sustrato selector glicosil.

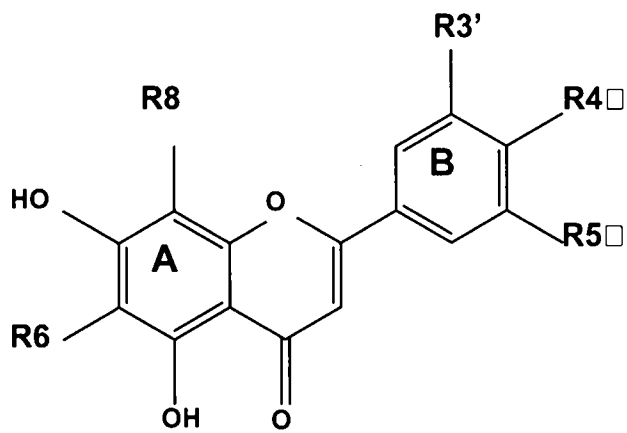
También bajo las condiciones de reacción para esta enzima, la actividad de transferasa glucuronosilo no fue observada para resveratrol el cual es estilbenos, esculetina el cual es cumarinas, sesaminol el cual es lignano, daidzeína y genisteína los cuales son isoflavonas, y isovitexina y orientina los cuales son

glucósidos- C de flavona. Entre flavonoides, estas enzimas se demostraron que tenían una fuerte actividad especialmente en las flavonas que tienen el grupo hidroxilo en la 4' posición en el aro B.

Flavonas: apigenina, luteolina, diosmetina, chrysoeriol, baicaleína y escutelareína

C- glucósidos de Flavona: isovitexina y orientina

En las siguientes fórmulas. Glc representa glucosa.



**Apigenina** (R4'=OH)

**Luteolina** (R3'=OH, R4'=OH)

**Diometina** (R3'=OH, R4'=OCH<sub>3</sub>)

**Chrysoeriol** (R3'=OCH<sub>3</sub>, R4'=OH)

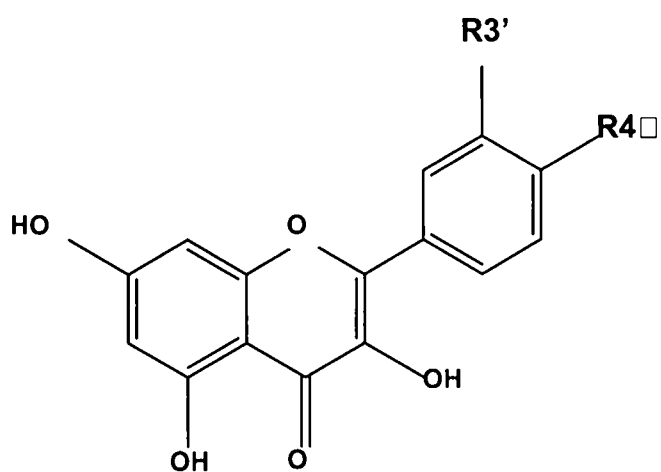
**Baicaleína** (R6=OH)

**Escutelareína** (R4'=OH, R6=OH)

**Isovitexina** (R4'=OH, R6=C-Glc)

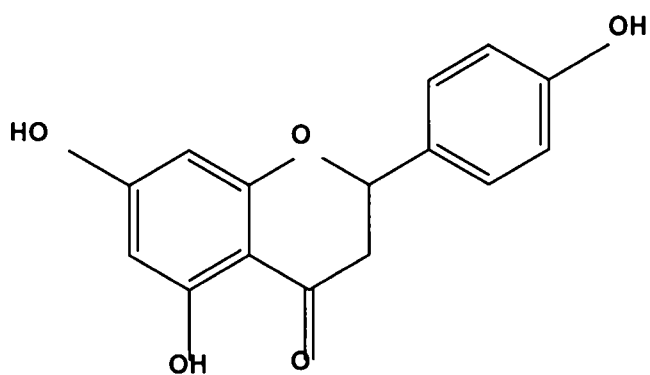
**Orientina** (R3'=OH, R4'=OH, R8=C-Glc)

Flavonol: quercetina y kaempferol



**Kaempferol** (R4'=OH)

**Quercetina** (R3'=OH, R4'=OH)



Flavanona: naringenina

**Naringenina**

### Ejemplo 6

#### Análisis de expresión del gen VpF7GAT

El patrón de expresión del gen VpF7GAT en distintos órganos fue analizado por usando el sistema de tiempo real PCR RT- PCR 7500 cuantitativo (Applied Biosystems) de una forma similar al método de Noguchi, A. et al., Plant J. 54, 415-427, 2008. El ARN total fue extraído del órgano respectivo (hojas, flores, frutas, tallos y raíces) de *Veronica pèrsica* de una forma similar al ejemplo 1. Después, 1 ug de cada órgano fue sujeto a transcripción reversa (RT) para dar el cADN de cada órgano. Éste cADN fue usado como un plantilla para el PCR.

Los siguientes 4 genotipos fueron diseñados como los genotipos específicos a cada gen usado en el PCR cuantitativo, usando un programa genotipos Express 3.0 (Applied Biosystems). Los genotipos específicos a VpF7GAT usados fueron aquellos de SEQ ID NOS: 11 y 12. Ribosoma ARN (AF509785) de *Veronica pèrsica* fueron dotados como el gen interno estándar. La amplificación fue efectuada usando genotipos específicos para cada gen de SEQ ID NOS: 13 y 14 como se muestran de aquí en adelante.

#### SEQ ID NO: 11

qVpF7GAT-Fw: 5'-GCG GTT TCG GCC TCT GT-3'

#### SEQ ID NO: 12

qVpF7GAT-Rv: 5'-TCC GAT ATC TTG AGG GAT GAT TTC-3'

#### SEQ ID NO: 13

qVprRNA-Fw: 5'-GCG GAA GGA TCA TTG TCG AT-3'

SEQ ID NO: 14

qVprRNA-Rv: 5'-CTA GCG GGC GGA GCT TAT TA-3'

El nivel de expresión de VpF7GAT fue hecho estándar por el nivel de expresión del gen interno estándar. El nivel de expresión relativo fue determinado por el método  $\Delta\Delta Ct$  (Applied Biosystems). El resultado reveló que el gen VpF7GAT fue altamente expresado en los pétalos (FIG. 4). Ya que el sitio de la acumulación de 7- O- ácido glucurónico de flavona dado por esta enzima coincide con la región en la que el gen para esta enzima fue expresada, se sugiere fuertemente que esta enzima sea usada en el desarrollo del color de la flor de *Verónica persica* a través de la formación de un copigmento. Adicionalmente, ningún desarrollo de color notable fue observado incluso después que la expresión del VpF7 GAT fue reconocida también en las hojas. Esto se considera causado por la cantidad mayor del pigmento de color antocianina ya que fue extremadamente baja al comparar la a la cantidad en los pétalos.

Como se describió previamente, la enzima (VpF7GAT) que puede transferir ácido glucurónico a la posición 7- O del flavonoide puede ser aislada para formar *Verónica persica*. Al usar esta enzima, las plantas con flores de color modificadas (ej., flores azules) pueden ser producidas y materiales alimenticios funcionales pueden ser desarrollados.

51

### **Aplicación industrial**

La transferasa glucuronosilo UDP de la presente invención tiene una especificidad de sustrato más amplia y es útil para la producción de varios conjugados glucurónidos. Al usar la transferasa glucuronosilo de la presente invención, por ejemplo, plantas con colores de flor modificados (ej., flores azules) o materiales alimenticios funcionales pueden ser desarrollados.

### Reivindicaciones

1. Un poli nucleótido de cualquiera de (a) a (f):

(a) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido en las posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 7;

(b) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8;

(c) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 en la cual 1 a 15 aminoácidos son removidos, substituidos, insertados y o añadidos y teniendo una actividad de transferasa glucuronosilo UDP;

(d) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos tiene por lo menos 80% de homología a la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 y teniendo una actividad de transferasa glucuronosilo UDP;

(e) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido en las posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 7 y codifica una proteína teniendo una actividad de transferasa coros y UDP; y,

(f) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido de un poli nucleótido que codifica a una proteína que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8, y codifica una proteína teniendo una actividad de transferasa glucuronosilo UDP.

2. El poli nucleótido de acuerdo a la reivindicación 1, el cual es cualquiera de (g) a (j) aquí descritos:

(g) nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 en el cual un máximo de 10 aminoácidos son removidos, substituidos, insertados y o añadidos y teniendo actividad de transferasa glucuronosilo UDP;

(h) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de por lo menos 90% de homología a la secuencia del aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 y teniendo una actividad de transferasa glucuronosilo UDP;

(i) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que consiste de una secuencia nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido en las posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 7 y codifica una proteína que tiene actividad de transferasa glucuronosilo UDP; y,

(j) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido de un poli nucleótido que codifica a una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 y codifica una proteína que tiene actividad de transferasa glucuronosilo UDP.

3. El poli nucleótido de acuerdo a la reivindicación 1, que comprende un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido en posiciones 1 a 1362 en la secuencia nucleótido representada por SEQ ID NO: 7.

4. El poli nucleótido de acuerdo a la reivindicación 1, el cual comprende un poli nucleótido que codifica a una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8.

5. El poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el cual es ADN.

6. Una proteína codificada por el poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Un vector que comprende un poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

8. Un transformante transformado con el poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

SS

9. Un transformante transformado con el vector de acuerdo a la reivindicación
10. Un método para la producción de la proteína de la reivindicación 6, el cual comprende el uso del transformante de acuerdo a la reivindicación 8 o 9.
11. Un método para la producción de glucurónidos conjugados, el cual comprende la formación de un glucurónido conjugado del ácido glucurónico UDP y el substrato selector glicosil usando la proteína de acuerdo a la reivindicación 6 como el catalizador.

## Resumen

La presente invención provée una transferasa glucuronosilo novedosa, un polinucleótido que codifica al mismo (ej., un polinucleótido que comprende un poli nucleótido que consiste de la secuencia de nucleótido en las posiciones 1 a 1362 en la secuencia nucleótido representada por SEQ ID NO: 7, o un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína teniendo la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8); y continuando de esa manera. Una transferasa glucuronosilo novedosa que tiene una especificidad de sustrato más amplia y otros pueden por lo tanto ser provistos.

57

Fig. 1

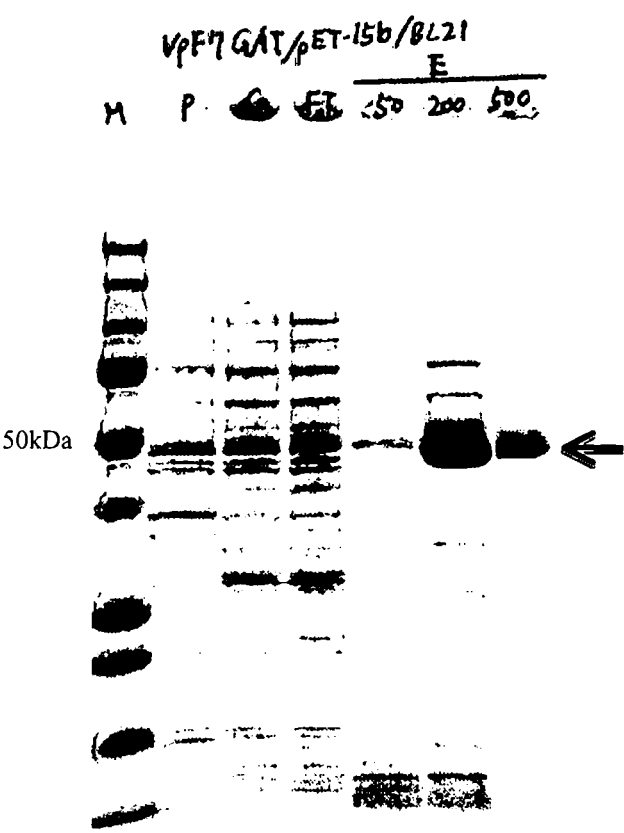


Fig. 2

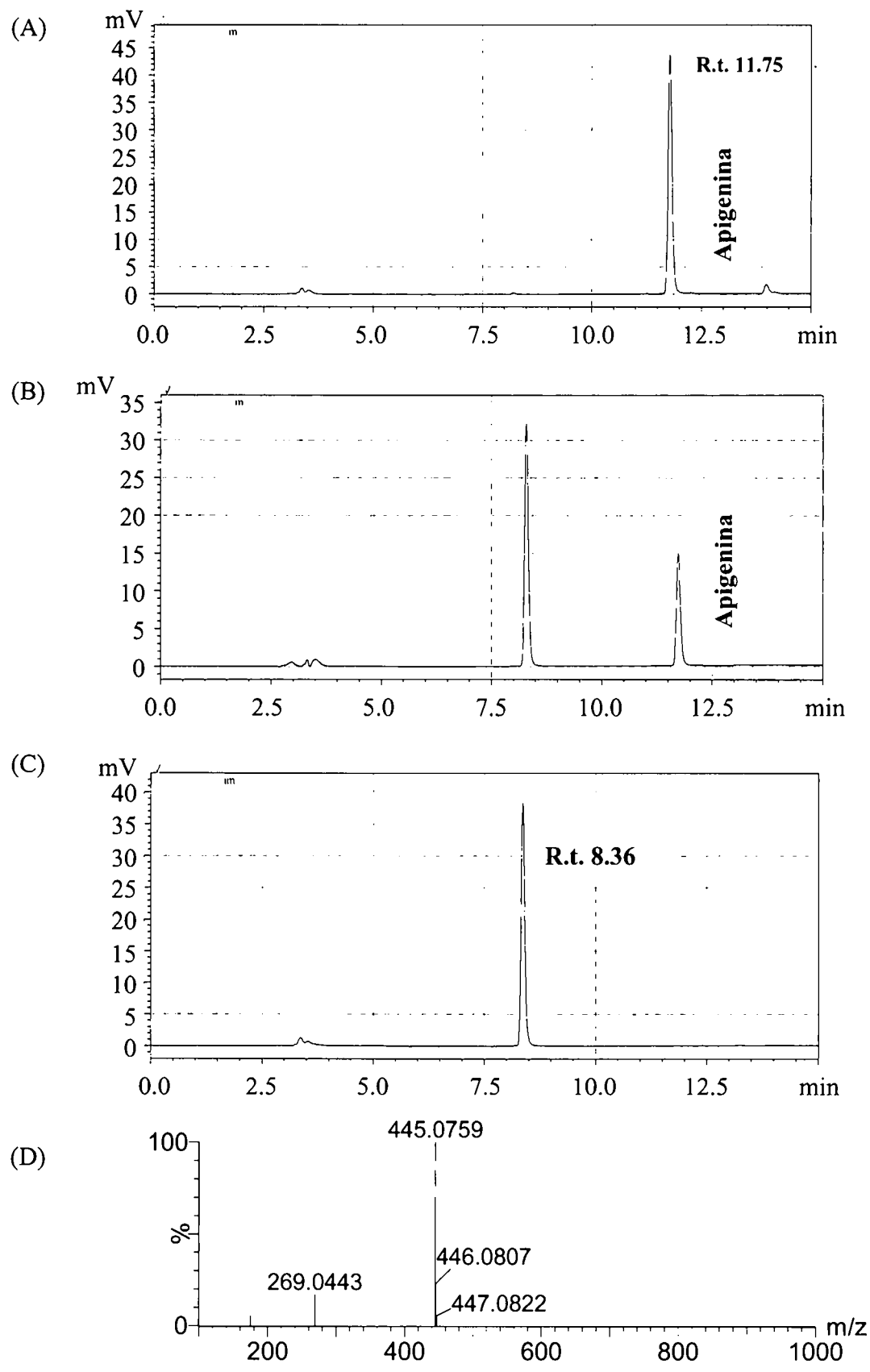


Fig. 3

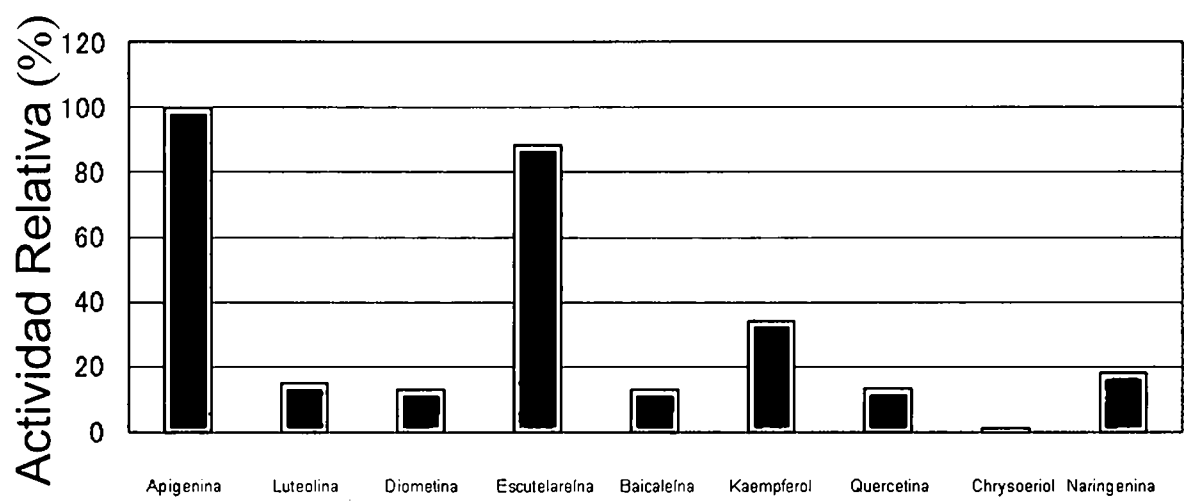
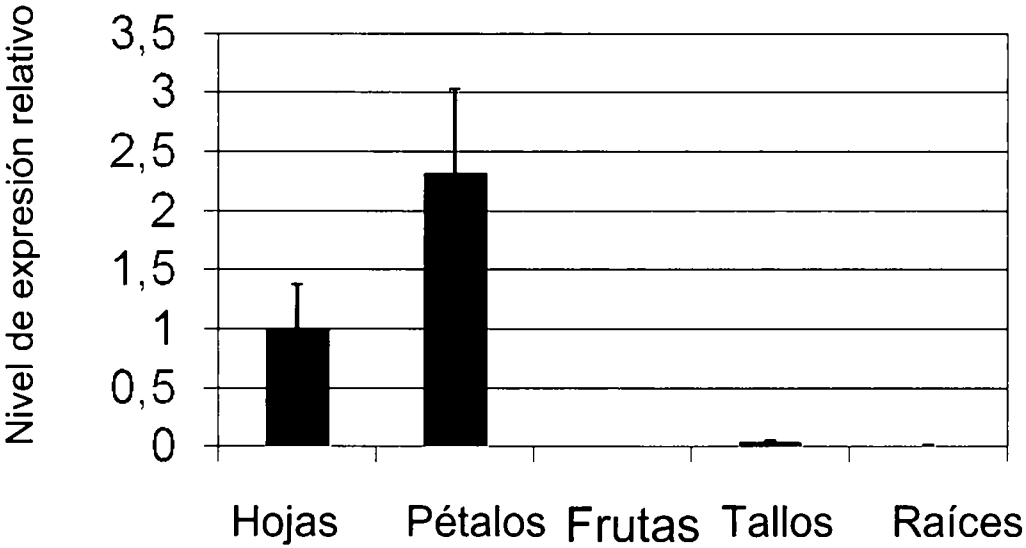


Fig. 4



Listado de Secuencia

- <110> SUNTORY Limitada.
- <120> transferasa glucuronilo y poli nucleótido codificando el mismo.
- <130> PCT08-0056
- <160> 14
- <170> Patente en versión 3.4
- <210> 1
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> ADN sintético
- <400> 1
- gtgatagatt tcttttgcaa t
- 21

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 2

accctattca

tcctctgctc

C

21

<210> 3

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> ADN sintético

<400> 3

ttccaggagg

gtttcgaacg

gaccata

27

- <210> 4
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> ADN sintético

<400> 4

ctagaggtgc

aacgaataaa

actt

24

- <210> 5
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> ADN sintético

|            |   |            |         |
|------------|---|------------|---------|
| <400>      | 5 |            |         |
| tatggtccgt |   | tcgaaaccct | cctggaa |
| 27         |   |            |         |

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN sintético

|            |   |  |            |
|------------|---|--|------------|
| <400>      | 6 |  |            |
| aggatcctga |   |  | cctggaaaca |
| 20         |   |  |            |

<210> 7

<211> 1365

<212> ADN

<213> Veronica persica

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1365)

<400> 7

atg gaa gac aca atc atc ctc tat gct tca tcc gtg cac ctg aac tct 48  
Met Glu Asp Thr Ile Ile Leu Tyr Ala Ser Ser Val His Leu Asn Ser  
1 5 10 15

gtg cta gta ata gcc aag ttc ata aac aaa cat cat cct tct atc tcc 96  
Val Leu Val Ile Ala Lys Phe Ile Asn Lys His His Pro Ser Ile Ser  
20 25 30

ata atc ata ctc agc aat gct cct gat tca gcc gca tct tcc att acc 144  
Ile Ile Ile Leu Ser Asn Ala Pro Asp Ser Ala Ala Ser Ser Ile Thr  
35 40 45

tct gaa gcc tca tca atc act tac cat cga ctc cct act ccc gac att 192

Ser Glu Ala Ser Ser Ile Thr Tyr His Arg Leu Pro Thr Pro Asp Ile

50 55 60

cct ccc aac atc atc act aat cca gtc gaa ctt ctt ttc gag gtt cca 240

Pro Pro Asn Ile Ile Thr Asn Pro Val Glu Leu Leu Phe Glu Val Pro

65 70 75

80

cgc ctc aac aat ccc aat gtc aaa caa tac ctt gaa caa atc tcc caa 288  
Arg Leu Asn Asn Pro Asn Val Lys Gln Tyr Leu Glu Gln Ile Ser Gln  
85 90 95

aaa act aat gtc aaa gca ttc atc att gat ttc ttt tgc aac tca gct 336  
Lys Thr Asn Val Lys Ala Phe Ile Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ser Ala  
100 105 110

ttt gaa gtt tct acg agt ttg aac att cca acc tac ttc tac gtc agc 384  
Phe Glu Val Ser Thr Ser Leu Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Tyr Val Ser  
115 120 125

agt ggc ggt ttc ggc ctc tgt gct ttc ctc cac ttc cca acc acg gac 432  
Ser Gly Gly Phe Gly Leu Cys Ala Phe Leu His Phe Pro Thr Thr Asp  
130 135 140

gaa atc atc cct caa gat atc gga gac ttg aac gat tat ctg gaa atc 480  
Glu Ile Ile Pro Gln Asp Ile Gly Asp Leu Asn Asp Tyr Leu Glu Ile  
145 150 155  
160

cca ggc tgc cca ccc gtt cac tct tta gat ttc cct aaa gga atg ttt 528

67

Pro Gly Cys Pro Pro Val His Ser Leu Asp Phe Pro Lys Gly Met Phe  
165 170 175

ttc agg cac act aat acc cac aat cat ttc ctt gac act gcc aga aac 576  
Phe Arg His Thr Asn Thr His Asn His Phe Leu Asp Thr Ala Arg Asn  
180 185 190

atg agg aaa gcc aat ggg att ctg gtg aac tcg ttc gat gct ctt gag 624  
Met Arg Lys Ala Asn Gly Ile Leu Val Asn Ser Phe Asp Ala Leu Glu  
195 200 205

tat aga tct aaa gca gct tta ttg aac gga att tgc gtt ccg aac ggt 672  
Tyr Arg Ser Lys Ala Ala Leu Leu Asn Gly Ile Cys Val Pro Asn Gly  
210 215 220

cca aca ccc caa gtt tta ttc gtt gca cct cta gtt act gga atg aac 720  
Pro Thr Pro Gln Val Leu Phe Val Ala Pro Leu Val Thr Gly Met Asn  
225 230 235  
240

agt aga aaa ggc gac tcg gag cat gaa tgt tta agc tgg ctt gac tca 768  
Ser Arg Lys Gly Asp Ser Glu His Glu Cys Leu Ser Trp Leu Asp Ser  
245 250 255

caa cca agt aag agt gta att ttc cta tgt ttt ggc aga aag ggt ttt 816

Gln Pro Ser Lys Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Lys Gly Phe

260 265 270

ttc tcc aaa caa cag ttg caa gaa ata gca act ggc ttg gaa aac agt 864

Phe Ser Lys Gln Gln Leu Gln Glu Ile Ala Thr Gly Leu Glu Asn Ser

275 280 285

ggc cat agg ttt cta tgg tcc gtt cga aac cct cct gga att aat aat 912

Gly His Arg Phe Leu Trp Ser Val Arg Asn Pro Pro Gly Ile Asn Asn

290 295 300

gag gat cct gac ctg gaa aca ctt ctt cca gag ggt ttt ctg gaa agg 960

Glu Asp Pro Asp Leu Glu Thr Leu Leu Pro Glu Gly Phe Leu Glu Arg

305 310 315

320

act aaa gaa cga gga ttc gtg ata aag tca tgg gcg cct cag aaa gaa 1008

Thr Lys Glu Arg Gly Phe Val Ile Lys Ser Trp Ala Pro Gln Lys Glu

325 330 335

gta cta agc cat gag tcc gtt gga ggg ttc gtg aca cat tgt ggt agg 1056

Val Leu Ser His Glu Ser Val Gly Gly Phe Val Thr His Cys Gly Arg

340 345 350

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| agc tgc ata tta gaa gca gtg tca ttc ggt gtg cct atg att ggt ttt | 1104 |
| Ser Ser Ile Leu Glu Ala Val Ser Phe Gly Val Pro Met Ile Gly Phe |      |
| 355360365                                                       |      |
| cca ata tac gcg gag caa agg atg aat cgg gta ttc atg gtt gag gaa | 1152 |
| Pro Ile Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Arg Val Phe Met Val Glu Glu |      |
| 370375380                                                       |      |
| atg aaa gtg tca ttg ccg tta gat gag gct ggt gat gga ctt gtt acg | 1200 |
| Met Lys Val Ser Leu Pro Leu Asp Glu Ala Gly Asp Gly Leu Val Thr |      |
| 385390395                                                       |      |
| 400                                                             |      |
| tcc ggt gag ctc gaa aag cga gtg aag gaa ttg atg ggt tcg gtt agt | 1248 |
| Ser Gly Glu Leu Glu Lys Arg Val Lys Glu Leu Met Gly Ser Val Ser |      |
| 405410415                                                       |      |
| ggg aaa gcg att cga caa cga gtt aat gag ttg aaa gtt tcg ggc gag | 1296 |
| Gly Lys Ala Ile Arg Gln Arg Val Asn Glu Leu Lys Val Ser Gly Glu |      |
| 420425430                                                       |      |
| gca gcg gtg aag gaa ggt ggt tct tca gtg gtt gat ctg gac aag ttc | 1344 |
| Ala Ala Val Lys Glu Gly Gly Ser Ser Val Val Asp Leu Asp Lys Phe |      |

435 440 445  
atc aag ttg gtt att ggg taa

1365  
Ile Lys Leu Val Ile Gly  
450

<210> 8  
<211> 454  
<212> PRT  
<213> Veronica persica

<400> 8  
  
Met Glu Asp Thr Ile Ile Leu Tyr Ala Ser Ser Val His Leu Asn Ser  
1 5 10 15

Val Leu Val Ile Ala Lys Phe Ile Asn Lys His His Pro Ser Ile Ser  
20 25 30

Ile Ile Ile Leu Ser Asn Ala Pro Asp Ser Ala Ala Ser Ser Ile Thr

35 40 45

Ser Glu Ala Ser Ser Ile Thr Tyr His Arg Leu Pro Thr Pro Asp Ile

50 55 60

Pro Pro Asn Ile Ile Thr Asn Pro Val Glu Leu Leu Phe Glu Val Pro

65 70 75  
80

Arg Leu Asn Asn Pro Asn Val Lys Gln Tyr Leu Glu Gln Ile Ser Gln

85 90 95

Lys Thr Asn Val Lys Ala Phe Ile Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ser Ala

100 105 110

Phe Glu Val Ser Thr Ser Leu Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Tyr Val Ser

115 120 125

72

Ser Gly Gly Phe Gly Leu Cys Ala Phe Leu His Phe Pro Thr Thr Asp

130 135 140

Glu Ile Ile Pro Gln Asp Ile Gly Asp Leu Asn Asp Tyr Leu Glu Ile

145 150 155  
160

Pro Gly Cys Pro Pro Val His Ser Leu Asp Phe Pro Lys Gly Met Phe

165 170 175

Phe Arg His Thr Asn Thr His Asn His Phe Leu Asp Thr Ala Arg Asn

180 185 190

Met Arg Lys Ala Asn Gly Ile Leu Val Asn Ser Phe Asp Ala Leu Glu

195 200 205

Tyr Arg Ser Lys Ala Ala Leu Leu Asn Gly Ile Cys Val Pro Asn Gly

210 215 220

Pro Thr Pro Gln Val Leu Phe Val Ala Pro Leu Val Thr Gly Met Asn

225                  230                  235

240

Ser Arg Lys Gly Asp Ser Glu His Glu Cys Leu Ser Trp Leu Asp Ser

245                      250                      255

Gln Pro Ser Lys Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Lys Gly Phe

260                      265                      270

Phe Ser Lys Gln Gln Leu Gln Glu Ile Ala Thr Gly Leu Glu Asn Ser

275                      280                      285

Gly His Arg Phe Leu Trp Ser Val Arg Asn Pro Pro Gly Ile Asn Asn

290                      295                      300

Glu Asp Pro Asp Leu Glu Thr Leu Leu Pro Glu Gly Phe Leu Glu Arg

305                      310                      315

320

Thr Lys Glu Arg Gly Phe Val Ile Lys Ser Trp Ala Pro Gln Lys Glu

325 330 335

Val Leu Ser His Glu Ser Val Gly Gly Phe Val Thr His Cys Gly Arg

340 345 350

Ser Ser Ile Leu Glu Ala Val Ser Phe Gly Val Pro Met Ile Gly Phe

355 360 365

Pro Ile Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Arg Val Phe Met Val Glu Glu

370 375 380

Met Lys Val Ser Leu Pro Leu Asp Glu Ala Gly Asp Gly Leu Val Thr

385 390 395

400

75

Ser Gly Glu Leu Glu Lys Arg Val Lys Glu Leu Met Gly Ser Val Ser  
405 410 415

Gly Lys Ala Ile Arg Gln Arg Val Asn Glu Leu Lys Val Ser Gly Glu  
420 425 430

Ala Ala Val Lys Glu Gly Gly Ser Ser Val Val Asp Leu Asp Lys Phe  
435 440 445

Ile Lys Leu Val Ile Gly  
450

- <210> 9
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> ADN sintético

<400> 9  
cacccatattg                      gaagacacaa                      tcatcct  
27

<210> 10  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> ADN sintético

<400> 10  
ctcgagtttt                      tacccaataa                      ccaacttgat  
30

<210> 11  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 11

gcggttccgg

17

cctctgt

<210> 12

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 12

tccgatatct

24

tgagggatga

tttc

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

78

<220>

<223> ADN sintético

<400> 13

gcggaaggat

cattgtcgat

20

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 14

ctagcgggcg

gagcttatta

20

79

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/066365

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/10(2006.01)i, C12P19/18(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12N15/09, A01H5/00, C12N1/21, C12N9/10, C12P19/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                       | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | Antirrhinum majus AmUGTcg10 mRNA for UGT88D4, complete cds., DDBJ [online], Accession No.AB362988, 2008.05.08, [retrieved on 4 December 2008], <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?187761612:DDBJ:9066545">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?187761612:DDBJ:9066545</a> | 1-11                  |
| X         | Sesamum indicum SiUGT23 mRNA for UGT88D6, complete cds., DDBJ [online], Accession No.AB362990, 2008.05.08, [retrieved on 4 December 2008], <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?187761616:DDBJ:9066547">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?187761616:DDBJ:9066547</a>     | 1-11                  |
| A         | WO 2005/059141 A1 (Suntory Ltd.), 30 June, 2005 (30.06.05), Full text<br>& US 2008/0009032 A1 & EP 1702987 A1<br>& CA 2550507 A                                                                                                                                                                          | 1-11                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
04 December, 2008 (04.12.08)

Date of mailing of the international search report  
16 December, 2008 (16.12.08)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

80

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/066365

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                       | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | Ono E., et al., Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway, Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 2006.07.18, Vol,103, No.29, p.11075-11080, full text | 1-11                  |

2008

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                       |          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------|
| 国際調査報告                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 6 6 3 6 5                  |          |
| A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））<br>Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/10(2006.01)i, C12P19/18(2006.01)i                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                       |          |
| B. 調査を行った分野<br>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））<br>Int.Cl. C12N15/09, A01H5/00, C12N1/21, C12N9/10, C12P19/18                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                       |          |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの<br>日本国実用新案公報 1922-1996年<br>日本国公開実用新案公報 1971-2008年<br>日本国実用新案登録公報 1996-2008年<br>日本国登録実用新案公報 1994-2008年                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                       |          |
| 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）<br>BIOSIS/WPI(DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                       |          |
| C. 関連すると認められる文献                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                       |          |
| 引用文献の<br>カテゴリー*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                                                                        | 関連する<br>請求の範囲の番号                                      |          |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Antirrhinum majus AmUGTcg10 mRNA for UGT88D4, complete cds., DDBJ [online], Accession No.AB362988, 2008.05.08, [retrieved on 4 December 2008], <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?187761612:DDBJ:9066545">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?187761612:DDBJ:9066545</a> | 1-11                                                  |          |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Sesamum indicum SiUGT23 mRNA for UGT88D6, complete cds., DDBJ [online], Accession No.AB362990, 2008.05.08,                                                                                                                                                                                               | 1-11                                                  |          |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                       |          |
| * 引用文献のカテゴリー<br>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの<br>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの<br>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）<br>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献<br>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの<br>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの<br>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの<br>「&」同一パテントファミリー文献 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                       |          |
| 国際調査を完了した日<br>04.12.2008                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 国際調査報告の発送日<br>16.12.2008                              |          |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁（ISA/J P）<br>郵便番号100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 特許庁審査官（権限のある職員）<br>高堀 栄二<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3488 | 4 N 9281 |

81/82

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 6 6 3 6 5

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                              |                  |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                            | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|                       | [retrieved on 4 December 2008],<br><a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?187761616:DDBJ:9066547">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?187761616:DDBJ:9066547</a> |                  |
| A                     | WO 2005/059141 A1 (サントリー株式会社) 2005.06.30, 全文<br>& US 2008/0009032 A1 & EP 1702987 A1 & CA 2550507 A                                                                                          | 1-11             |
| A                     | Ono E.,et al., Yellow flowers generated by expression of the<br>aurone biosynthetic pathway, Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,<br>2006.07.18, Vol,103,No.29, p.11075-11080, 全文                        | 1-11             |

|                                                                                                                                      |                                |                                                                                                                                                                             |                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA |                                | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN</b><br><b>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT</b> |                  |
| (21) N° de solicitud:                                                                                                                |                                | (51) Int Cl: C012N/015/009                                                                                                                                                  |                  |
| 22) Fecha de solicitud:                                                                                                              |                                | (71) Solicitante(s) SUNTORY HOLDINGS LIMITED                                                                                                                                |                  |
| (30) Prioridad                                                                                                                       | (31) <b>Prioridad</b>          | (32) <b>Fecha</b>                                                                                                                                                           | (33) <b>País</b> |
|                                                                                                                                      |                                | (72) Inventor(es) EIICHIRO ONO<br>YUKO FUKUI                                                                                                                                |                  |
|                                                                                                                                      |                                | (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ                                                                                                                                       |                  |
| (85) Fecha limite inicio fase nacional: 04/04/2011                                                                                   | (87) Publicación internacional |                                                                                                                                                                             |                  |
| (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT                                                                           | Fecha: 11/03/2010              |                                                                                                                                                                             |                  |
| Fecha de presentación de la solicitud: 04/09/2008                                                                                    | N° publicación: WO 2010/026666 |                                                                                                                                                                             |                  |
| No. de solicitud PCT/JP2008/066365                                                                                                   |                                |                                                                                                                                                                             |                  |
| (54) Titulo: TRANSFERASA GLUCURONILO Y UN POLINUCLEÓTIDO QUE CODIFICA EL MISMO                                                       |                                |                                                                                                                                                                             |                  |

Reivindicación(es):

1. Un poli nucleótido de cualquiera de (a) a (f):
- (a) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido en las posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 7;
  - (b) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8;
  - (c) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 en la cual 1 a 15 aminoácidos son removidos, substituidos, insertados y o añadidos y teniendo una actividad de transferasa glucuronosilo UDP;
  - (d) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos tiene por lo menos 80% de homología a la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 y teniendo una actividad de transferasa glucuronosilo UDP;
  - (e) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido en las posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 7 y codifica una proteína teniendo una actividad de transferasa coros y UDP; y,
  - (f) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido de un poli nucleótido que codifica a una proteína que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8, y codifica una proteína teniendo una actividad de transferasa glucuronosilo UDP.
2. El poli nucleótido de acuerdo a la reivindicación 1, el cual es cualquiera de (g) a (j) aquí descritos:
- (g) nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 en el cual un máximo de 10 aminoácidos son removidos, substituidos, insertados y o añadidos y teniendo actividad de transferasa glucuronosilo UDP;

- (h) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de por lo menos 90% de homología a la secuencia del aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 y teniendo una actividad de transferasa glucuronosilo UDP;
  - (i) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que consiste de una secuencia nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido en las posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 7 y codifica una proteína que tiene actividad de transferasa glucuronosilo UDP; y,
  - (j) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido de un poli nucleótido que codifica a una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 y codifica una proteína que tiene actividad de transferasa glucuronosilo UDP.
3. El poli nucleótido de acuerdo a la reivindicación 1, que comprende un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido en posiciones 1 a 1362 en la secuencia nucleótido representada por SEQ ID NO: 7.
4. El poli nucleótido de acuerdo a la reivindicación 1, el cual comprende un poli nucleótido que codifica a una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8.
5. El poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el cual es ADN.
6. Una proteína codificada por el poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector que comprende un poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
8. Un transformante transformado con el poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. Un transformante transformado con el vector de acuerdo a la reivindicación

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2

8384

Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0018700

Bogotá D.C., Marzo 01 de 2011 - 17:09:59

NI 860.041.367

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR PAGO       |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 411748374 | 01/03/2011 | 36.726.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. RENTISTICO          | CONCEPTO                                   | VR UNDITARIO | VR CONCEPTO         |
|---------------------------|--------------------------------------------|--------------|---------------------|
| 1 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN | 571.000.00   | 571.000.00          |
|                           |                                            |              | <u>\$571.000.00</u> |

SON: \*\*QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-025903-00000-0000

Fecha: 2011-03-03 11:21:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 84

0020: 17511-841-002-6

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 1 de 2011 - 17:10:08

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

NIT : 800.176.089-2

-/-

85  
84  
150

**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

**RECIBO DE CAJA**

**No. 11 - 0015577**

Bogotá D.C., Febrero 21 de 2011 - 16:45:23

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 142703304 | 21/02/2011 | 34.450.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                                                     | Vr. UNDITARIO | Vr. CONCEPTO       |
|-------|-------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------|--------------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL<br>A LAS 10 INICIALES | 27.000.00     | 27.000.00          |
|       |                         |                                                              |               | <u>\$27.000.00</u> |
| ===== |                         |                                                              |               |                    |

**SON: \*\*VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\***

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



**No. 11-025903- -00000-0000**

Fecha: 2011-03-03 11:21:26    Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11    PATENTEIYII    Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION    Folios: 84

Coto: 17511-841-002-6

~~Coto 15004-841-001-6~~

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co) e-mai: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co) Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 21 de 2011 - 16:45:30

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisi3n 486/00

☐

Indicaci3n que se solicita una patente.

☐

Datos de identificaci3n del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripci3n de la invenci3n

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisi3n 486/00, Circular 3nica

☒

Indicaci3n que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en espa3ol, tal como fue presentada inicialmente (capitulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISE2O INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisi3n 486/00)

☐

Indicaci3n que se solicita Dise2o industrial

☐

Datos de identificaci3n del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representaci3n gr1fica y fotogr1fica del Dise2o industrial o muestra del material que incorpora el dise2o

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisi3n 486/00)

☐

Indicaci3n que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificaci3n del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representaci3n gr1fica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐