

BIOSÍNTESIS Y AISLAMIENTO *IN VIVO* DE ALTO NIVEL DE CANNABINOIDES SOLUBLES EN AGUA EN SISTEMAS DE PLANTAS

La presente solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/476,080, presentada el 24 de marzo de 2017, y 62/588,662, presentada el 20 de noviembre de 2017 y 62/621,166, presentada el 21 de enero de 2018. Toda la memoria descriptiva y las figuras de las solicitudes antemencionadas se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presentó por vía electrónica en formato ASCII y se incorpora en su totalidad mediante esta referencia.

CAMPO TÉCNICO

El campo de la presente invención se refiere generalmente a la biología molecular de plantas y biotecnología de plantas. Más específicamente, se refiere a sistemas, métodos y composiciones novedosos para la producción, modificación y aislamiento *in vivo* de compuestos cannabinoides de sistemas de plantas, que incluyen plantas enteras y/o sistemas de cultivos celulares de plantas. En determinadas modalidades preferidas, la tecnología inventiva incluye un sistema novedoso de modificar genéticamente una planta o cultivo de suspensión de células de plantas para producir, modificar y/o acumular uno o más cannabinoides objetivo en *Cannabis* y/o *Nicotiana benthamiana* y/o *Nicotiana tabacum*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los cannabinoides son una clase de compuestos especializados sintetizados por *Cannabis*. Están formados por condensación de terpeno y precursores de fenol. Incluyen estas formas más abundantes: Delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), cannabicromeno (CBC), y cannabigerol (CBG). Otro cannabinoide, cannabinol (CBN) se forma a partir de THC como un producto de degradación y se puede detectar en algunas cepas de plantas. Típicamente, THC, CBD, CBC, y CBG ocurren juntos en diferentes proporciones en las varias cepas de plantas.

Los cannabinoides generalmente son clasificados en dos tipos, cannabinoides neutros y cannabinoides ácidos, basados en si contienen un grupo carboxilo o no. Se sabe que, en plantas frescas, las concentraciones de cannabinoides neutros son mucho más bajos que aquellos de ácidos cannabinoides. Una cepa de *Cannabis sativa* contiene aproximadamente 61 compuestos que pertenecen a la clase general de cannabinoides. Estos cannabinoides generalmente son lipofílicos, libres de nitrógeno, mayormente compuestos fenólicos y derivan biogenéticamente de un monoterpene y fenol, los cannabinoides ácidos de un ácido carboxílico de fenol y monoterpene, y tienen un material base hasta C21.

Los cannabinoides también encuentran sus ácidos carboxílicos correspondientes en

productos de plantas. En general, los ácidos carboxílicos tienen la función de un precursor biosintético. Por ejemplo, estos compuestos surgen *in vivo* desde los ácidos carboxílicos de THC mediante descarboxilación de THC de los tetrahidrocannabinoides Δ^9 - y Δ^8 - y CBD del cannabidiol asociado. Tal como se muestra generalmente en la Fig. 28, el THC y CBD pueden derivar artificialmente de sus precursores ácidos, el ácido tetrahidrocannabinólico (THCA) y el ácido cannabidiólico (CBDA) mediante descarboxilación no enzimática.

Los cannabinoides se consumen comúnmente en una variedad de formas alrededor del mundo. Las preparaciones ricas en cannabinoides de *Cannabis*, ya sea en hierba (es decir, marihuana) o en forma de resina (es decir, aceite de hachís), son usadas por un estimado de 2.6–5.0 % de la población mundial (UNODC, 2012). Los productos farmacéuticos que contienen cannabinoides ya sea que contienen extractos de cannabis natural (Sativex®) o los cannabinoides sintéticos dronabinol o nabilona, se encuentran disponibles para uso médico en varios países.

Tal como se menciona anteriormente, Δ^9 -tetrahidrocannabinol (también conocido como THC) es uno de los principales componentes biológicamente activos en la planta de *Cannabis* que ha sido aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) para el control de náuseas y vómitos asociados con la quimioterapia, y, más recientemente, para la estimulación del apetito en los pacientes con SIDA que padecen de síndrome consuntivo. El fármaco, sin embargo, muestra otras actividades biológicas que se prestan para posibles aplicaciones terapéuticas, tal como en el tratamiento de glaucoma, dolores de cabeza por migraña, espasticidad, ansiedad y como un analgésico.

De hecho, está bien documentado que los agentes, tales como los cannabinoides y los endocannabinoides que activan los receptores de cannabinoides en el cuerpo modulan el apetito, y alivian las náuseas, vómitos y el dolor (Martin B. R. y Wiley, J. L., *Mechanism of action of cannabinoids: how it may lead to treatment of cachexia, emesis and pain*, Journal of Supportive Oncology 2: 1-10, 2004), esclerosis múltiple (Pertwee, R. G., *Cannabinoids and multiple sclerosis*, Pharmacol. Ther. 95, 165-174, 2002), y epilepsia (Wallace, M. J., Blair, R. E., Falenski, K. WW., Martin, B. R., y DeLorenzo, R. J. Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics, 307: 129-137, 2003). Además, los agonistas receptores CB2 han demostrado ser eficaces para tratar el dolor (Clayton N., Marshall F. H., Bountra C., O'Shaughnessy C. T., 2002. CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. 96, 253-260; Malan T. P., Ibrahim M. M., Vanderah T. W., Makriyannis A., Porreca F., 2002. Inhibition of pain responses by activation of CB(2) cannabinoid receptors. Chemistry and Physics of Lipids 121, 191-200; Malan T. P., Jr., Ibrahim M. M., Deng H., Liu Q., Mata H. P., Vanderah T., Porreca F., Makriyannis A., 2001. CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. 93, 239-245.; Quartilho A., Mata H. P., Ibrahim M. M., Vanderah T. W., Porreca F., Makriyannis A., Malan T. P., Jr., 2003. *Inhibition of inflammatory hyperalgesia by*

activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology* 99, 955-960) and multiple sclerosis (Pertwee, R. G., *Cannabinoids and multiple sclerosis*, *Pharmacol. Ther.* 95, 165-174, 2002) in animal models.

Más recientemente, varios estados han aprobado el uso del *Cannabis* y los productos infusionados con cannabinoides para uso recreacional y médico. A medida que se han desarrollado estos mercados comerciales y médicos nuevos, ha crecido una necesidad de desarrollar producción más eficiente y aislamiento de compuestos cannabinoides. Los métodos tradicionales de producción cannabinoide típicamente se enfoca en la extracción y purificación de cannabinoides de *Cannabis* cultivado crudo. Sin embargo, la extracción de cannabinoides tradicional y los métodos de purificación tienen una cantidad de problemas técnicos y prácticos que limitan su utilidad.

Limitaciones de producción cannabinoide tradicional y métodos de extracción

Por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6,403,126 (Webster et ál.), los cannabinoides, y otros compuestos relacionados están aislados de *Cannabis* cosechado crudo y tratado con un solvente orgánico, típicamente un hidrocarburo derivado de petróleo, o un alcohol de peso molecular bajo para solubilizar los cannabinoides para aislamiento posterior. Este método tradicional está limitado en que depende de materia de planta cultivada de forma natural que puede haber sido expuesta a varios pesticidas, herbicidas tóxicos y similares. Además, tales métodos de extracción tradicionales son imprecisos lo cual da como resultado concentraciones variadas y no confiables de THC extraído. Además, muchas cepas de *Cannabis* se cultivan en entornos hidropónicos que tampoco están regulados y puede tener como resultado la contaminación extendida de tales cepas con químicos y otros compuestos no deseados.

En otro ejemplo, la solicitud de patente estadounidense n.º 20160326130 (Lekhram et ál.), los cannabinoides, y otros compuestos relacionados están aislados del *Cannabis* cosechado bruto usando, una vez más, una serie de solventes orgánicos para convertir los cannabinoides en una sal, y luego de regreso a su forma de ácido carboxílico original. Similar a Webster, este método tradicional está limitado en que depende de materia de planta cultivada de forma natural que puede haber sido expuesta a varios pesticidas, herbicidas tóxicos y similares. Además, los múltiples solventes orgánicos usados en este proceso tradicional se deben recuperar y reciclar y/o desechar de forma apropiada.

Otro método tradicional de extracción de cannabinoides implica la generación de aceites de hachís usando dióxido de carbono supercrítico (sCO₂). Según este método tradicional, una vez más la materia de la planta seca se muele y es sometida a un entorno de extracción de sCO₂. El extracto principal se obtiene inicialmente y luego se separa. Por ejemplo, tal como se describe generalmente por CA2424356 (Muller et ál.) los cannabinoides se extraen con la ayuda de sCO₂ bajo condiciones de temperatura y presión supercrítica y mediante la adición de solventes accesorios (modificadores)

tales como alcoholes. Según este proceso, este CO₂ supercrítico se evapora y disuelve en los cannabinoides. Sin embargo, este proceso tradicional también tiene determinadas desventajas limitantes. Por ejemplo, debido a la baja solubilidad en sCO₂ supercrítico, la recuperación de los cannabinoides de interés es inconsistente. De manera adicional, cualquier solvente usado se debe

5 reciclar y bombear de regreso al extractor, para minimizar los costos de operación.

Otro método utiliza butano para extraer cannabinoides, en particular altas concentraciones de THC, de *Cannabis* cosechado bruto. Dado que el butano es no polar, este proceso no extrae subproductos solubles en agua tal como clorofila y alcaloides de plantas. Dicho esto, este proceso puede tomar hasta 48 horas y como tal está limitado en su capacidad de aumentar para alcanzar

10 viabilidad comercial máxima. La otra gran desventaja de los procesos de extracción basados en butano tradicional es los peligros potenciales de usar solvente inflamables, así como la necesidad de asegurar que todo el butano es quitado por completo de los cannabinoides extraídos.

Otro factor limitante en la viabilidad de estos métodos tradicionales de los métodos de extracción de cannabinoides es la incapacidad de mantener la integridad de la cepa de *Cannabis*.

15 Por ejemplo, los cannabinoides usados en aplicaciones de investigación y médicas, o que están sujetas a ensayos clínicos controlados, están estrictamente regulados por varias agencias gubernamentales en los Estados Unidos y en otras partes. Estas agencias reguladoras requieren que las cepas de *Cannabis* permanezcan químicamente consistentes en el tiempo. Desafortunadamente, las composiciones genéticas/químicas de las cepas de *Cannabis* cambian

20 durante generaciones de modo que no pueden satisfacer los mandatos reguladores presentes en la mayoría de los ensayos clínicos o certificados para usar en otras aplicaciones farmacéuticas.

Se han realizado varios intentos para tratar estas preocupaciones. Por ejemplo, se han realizado esfuerzos para producir cannabinoides en organismos modificados genéticamente. Por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense 14/795,816 (Poulos, et ál.) Aquí, el solicitante reivindica haber generado una cepa modificada genéticamente de levadura capaz de producir un

25 cannabinoide al insertar genes que producen las enzimas apropiadas para su producción metabólica. Sin embargo, tal aplicación está limitada en su capacidad de producir solo una cantidad única o muy limitada de compuestos cannabinoides. Esta limitación es clínicamente significativa. Estudios clínicos recientes han hallado que el uso de un solo cannabinoide aislado como un agente

30 terapéutico no es tan eficaz como tratamiento con el “entorno” de origen natural de cannabinoides primarios y secundarios asociados con varias cepas seleccionadas.

Se han realizado intentos adicionales para sintetizar químicamente cannabinoides, tales como THC. Sin embargo, la síntesis química de varios cannabinoides es un proceso costoso cuando se compara con la extracción de cannabinoides de plantas de origen natural. La síntesis química de

35 cannabinoides también implica el uso de químicos que no son ecológicos, que se pueden considerar

como un costo adicional para su producción. Además, la producción química sintética de varios cannabinoides ha sido clasificada como menos farmacológicamente activa que aquellas extraídas de plantas tal como *Cannabis sativa*.

Esfuerzos para generar cultivos celulares de *Cannabis* a gran escala también han creado una cantidad de problemas técnicos. El principal entre ellos es el hecho que los cannabinoides son citotóxicos. En condiciones naturales los cannabinoides son generados y luego almacenados extracelularmente en pequeñas estructuras glandulares llamadas tricomas. Los tricomas se pueden visualizar como pequeños cabellos u otras excrecencias de la epidermis de una planta de *Cannabis*. Como resultado, en los cultivos celulares de *Cannabis*, la incapacidad de almacenar cannabinoides de forma extracelular significa que cualquier acumulación de cannabinoides sería tóxica para las células cultivadas. Tales limitaciones perjudican la capacidad de los cultivos celulares de *Cannabis* de ser aumentados para niveles industriales de producción.

La toxicidad de biosíntesis de cannabinoides limita los sistemas de producción *in vivo*

Los esfuerzos para generar cepas de *Cannabis*/cultivos celulares que producen o acumulan niveles elevados de cannabinoides han planteado una cantidad de problemas técnicos. El principal entre ellos es el hecho de que la síntesis de cannabinoides produce subproductos tóxicos. De forma notable, las sintasas de CBDA y THCA requieren oxígeno molecular, junto con una molécula de FAD, para oxidar el ácido cannabigerólico (CBGA). Específicamente, tal como se muestra en la Fig. 29, dos electrones del sustrato son aceptados por un FAD unido a enzima, y luego transferidos a oxígeno molecular para volver a oxidar a FAD. CBDA y THCA son sintetizados a partir de los intermedios iónicos mediante ciclación estereoselectiva a través de las enzimas. El ion de hidruro es transferido de la flavina reducida al oxígeno molecular, lo cual tiene como resultado la formación de peróxido de hidrógeno y la reactivación de la flavina para el siguiente ciclo. Como resultado, además de producir CBDA y THCA respectivamente, esta reacción produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es naturalmente tóxico para la célula hospedadora. Debido a esta producción de un subproducto de peróxido de hidrógeno tóxico, la síntesis de cannabinoides genera un bucle de retroalimentación autolimitante que previene la producción de alto nivel y/o acumulación de cannabinoides en sistemas *in vivo*. Una forma en la que las plantas de *Cannabis* tratan con estos efectos citotóxicos celulares es a través del uso de tricomas para la producción y acumulaciones de cannabinoides.

Las plantas de *Cannabis* lidian con esta toxicidad mediante el secuestro de la biosíntesis cannabinoide y el almacenamiento extracelularmente en pequeñas estructuras glandulares llamadas tricomas tal como se menciona anteriormente. Por ejemplo, la sintasa THCA es una enzima soluble en agua que es responsable de la producción de THC. Por ejemplo, la biosíntesis de THC ocurre en tricomas glandulares y comienza con la condensación de pirofosfato de geranilo con ácido olivetólico

para producir ácido cannabigerólico (CBGA); la reacción es catalizada por una enzima llamada geranilpirofosfato:olivatolato geraniltransferasa. CBGA luego es sometido a ciclación oxidativa para generar ácido tetrahidrocannabinólico (THCA) en presencia de sintasa de THCA. THCA luego se transforma en THC mediante descarboxilación no enzimática. Los estudios de localización subcelular que usan análisis de actividad enzimática y RT-PCR demuestran que la THCA sintasa se expresa en las células secretoras de tricomas glandulares, y luego se transloca en la cavidad secretora donde se acumula el THCA producto final. La sintasa THCA presente en la cavidad secretora es funcional, lo cual indica que la cavidad de almacenamiento es el sitio para la biosíntesis de THCA y almacenamiento. De esta manera, el *Cannabis* es capaz de producir cannabinoides extracelularmente y de este modo evitar los efectos citotóxicos de estos compuestos. Sin embargo, como resultado, la capacidad de acceder y alterar químicamente los cannabinoides *in vivo* es impedida por esta compartimentalización celular.

Para abordar estas preocupaciones, algunos han propuesto compuestos cannabinoides modificados químicamente para reducir sus efectos citotóxicos. Por ejemplo, Zipp, et ál. han propuesto usar un método *in vitro* para producir glucósidos de cannabinoides. Sin embargo, esta aplicación está limitada a los sistemas *in vitro* solamente. Específicamente, tal como se menciona anteriormente, las enzimas de sintasa cannabinoide, tal como la sintasa THCA son proteínas solubles en agua que se exportan fuera de las células de tricoma basal en el compartimiento de almacenamiento donde está activa y cataliza la síntesis de THCA. Específicamente, para mediar de forma eficaz la exportación celular de tal sintasa cannabinoide, esta enzima contiene un péptido de señal de 28 aminoácidos que dirige su exportación fuera de la célula y dentro del tricromo extracelular donde ocurre la síntesis cannabinoide. Como resultado de esta compartimentalización extracelular dependiente de señal, en este caso, la sintasa de THCA, esto significa que el THCA se realiza fuera del citoplasma y no sería accesible para las enzimas de glicosilación diseñadas genéticamente. Como tal, la expresión simple de una glucosiltransferasa de UDP en células de plantas, tal como se alude vagamente en Zipp, et ál., no tendría como resultado una glicosilación eficaz de las moléculas cannabinoides en la estructura de tricromo extracelular y compartimentalizada donde ocurre la síntesis de cannabinoide. El método de Zipp tampoco puede generar cannabinoides acetilados, ni moléculas cannabinoides de O-glucósido de acetilo.

Los problemas antemencionados respecto a la producción, desintoxicación y aislamiento de cannabinoides pueden representar una necesidad desde hace mucho tiempo por una solución eficaz -y económica- a lo mismo. Aunque puede estar disponible la implementación de elementos, puede que falten intentos reales de lograr esta necesidad en cierto grado. Esto puede deberse a que los expertos en la técnica no aprecian o entienden completamente la naturaleza de los problemas y desafíos involucrados. Como resultado de esta falta de entendimiento, intentos de lograr estas

necesidades desde hace mucho no han podido resolver de forma eficaz uno o más de los problemas o desafíos identificados en la presente. Estos intentos pueden incluso haber conducido lejos de las direcciones técnicas tomadas por la tecnología inventiva de la presente y pueden incluso tener como resultado los logros de la presente tecnología inventiva que es considerada hasta cierto grado un resultado inesperado del enfoque tomado por algunos en el campo.

Tal como se mencionará en mayor detalle más adelante, la tecnología inventiva actual supera las limitaciones de los sistemas de producción de cannabinoides tradicionales mientras que se logran los objetivos de un sistema de aislamiento, modificación y producción de cannabinoides verdaderamente eficaz y ampliable.

COMPENDIO DE LA O LAS INVENCIONES

La tecnología inventiva puede abarcar sistemas, métodos y composiciones para la producción, modificación y aislamiento *in vivo* de compuestos cannabinoides de plantas de *Cannabis*. En particular, la invención proporciona sistemas y métodos para la biosíntesis *in vivo* de alto nivel de cannabinoides solubles en agua.

La tecnología inventiva actual incluye sistemas y métodos para la producción y/o acumulación de cannabinoides mejorada. En una modalidad, la invención puede incluir sistemas y métodos para la producción y/o acumulación de cannabinoides mejorada en un sistema *in vivo*, tal como una planta, o cultivo de célula de planta.

Otro fin de la invención actual puede incluir la generación de plantas modificadas genéticamente que sobreexpresan determinados genes endógenos/exógenos que tienen como resultado la sobreproducción y/o acumulación de cannabinoides sobre niveles de tipo salvaje. En una modalidad preferida, tales plantas transgénicas pueden exhibir producción aumentada y acumulación localizada de compuestos precursores cannabinoides, tal como THCA (ácido tetrahidrocannabinólico), CBCA (ácido cannabícroménico), y CBDA (ácido cannabidiólico). Tales plantas transgénicas pueden exhibir adicionalmente la producción aumentada y acumulación localizada de cannabinoides, tales como THC, CBC y CBD. Un fin adicional de la invención actual puede incluir la generación de plantas modificadas genéticamente que expresan determinados endógenos/exógenos que tienen como resultado la modificación aumentada de cannabinoides. En una modalidad preferida, tales plantas transgénicas pueden exhibir la modificación de cannabinoides que incluyen la hidroxilación y/o acetilación y/o glicosilación. En modalidades preferidas adicionales, tales plantas transgénicas pueden exhibir la modificación aumentada de cannabinoides que incluyen la acetilación y glicosilación, tal como una forma de O glucósido de acetilo. Por ejemplo, la acetilación agrega un grupo acetilo ($-\text{CH}_3\text{OOH}$) a un cannabinoide de modo que el grupo carboxilato es ácido y cargado a pH neutro que lo vuelve altamente soluble en agua.

Un fin de la tecnología inventiva actual puede ser generar una planta de *Cannabis*

transgénica o modificada que sobreexpresa uno o más factores de transcripción, tal como myb, que aumentan el flujo de metabolitos a través de la vía biosintética cannabinoide. En una modalidad preferida, estos factores de transcripción pueden incluir varios análogos. En determinadas modalidades preferidas, uno o más de estos transgenes pueden estar unidos de forma operativa a uno o más promotores.

Otro fin de la tecnología inventiva actual puede ser generar un cultivo celular de *Cannabis* transgénica o modificada que sobreexpresa uno o más factores de transcripción, que aumentan el flujo de metabolitos a través de la vía biosintética cannabinoide. En una modalidad preferida, estos transgenes pueden estar unidos de forma operativa a uno o más promotores.

Otro fin de la tecnología inventiva actual puede ser generar una planta de *Cannabis* transgénica o modificada genéticamente que expresa uno o más factores de transcripción exógenos/heterólogos que regulan por incremento la formación de tricomas para aumentar la acumulación de cannabinoides. En determinadas modalidades preferidas, uno o más de estos transgenes exógenos pueden estar unidos de forma operativa a uno o más promotores.

Incluso otro fin de la tecnología inventiva actual puede ser generar una planta de *Cannabis* transgénica o modificada genéticamente que expresa una enzima que está configurada para ser capaz de reducir los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que pueden ser generados durante la síntesis de cannabinoides. En una modalidad preferida, la tecnología inventiva actual puede ser generar una planta de *Cannabis* transgénica o modificada genéticamente que expresa una proteína quimérica. En esta modalidad, esta proteína quimérica puede incluir un primer dominio que puede reducir los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que pueden ser generados durante la síntesis de cannabinoides. Esta proteína de fusión/quimérica puede incluir además un segundo dominio que puede comprender un dominio de direccionamiento a tricoma que puede permitir la localización dirigida de la proteína quimérica a ubicaciones de síntesis de cannabinoides activos. En algunas modalidades, un tercer dominio puede incluir un enlazador que puede separar adicionalmente el primer dominio del segundo dominio, de modo que dicho primer dominio y dicho segundo dominio puedan cada uno plegarse en su forma tridimensional apropiada y retener su actividad y dichos intervalos enlazadores en longitud.

Otro fin de la tecnología inventiva actual puede incluir la generación de uno o más de la planta modificada genéticamente antemencionada o cultivos celulares de plantas usando transformación mediada por Ti-plásmido de *Agrobacterium*.

Otro fin de la tecnología inventiva de la presente se refiere a métodos y sistemas para la localización celular *in vivo* de modificación y biosíntesis cannabinoide. Más específicamente, la tecnología inventiva de la presente se refiere a métodos y sistemas para la localización celular *in vivo* de hidroxilación, acetilación y/o glicosilación cannabinoide. La tecnología inventiva puede incluir

sistemas y métodos para la modificación química localizada de alta eficiencia y aislamiento de compuestos cannabinoides de cultivos de suspensión. En la presente modalidad, varios compuestos cannabinoides seleccionados se pueden modificar químicamente en configuraciones solubles y no tóxicas.

5 Las modalidades adicionales de la tecnología inventiva pueden incluir la modificación transitoria de compuestos cannabinoides para reducir y/o eliminar su toxicidad en plantas o sistemas de cultivo de células de plantas. En una modalidad preferida, se puede permitir que tales cannabinoides modificados de forma transitoria se acumulen a niveles que normalmente tendrían un efecto perjudicial en la célula. Las modalidades adicionales pueden incluir el aislamiento de estos
10 cannabinoides modificados de forma transitoria seguido por la conversión enzimática o reconstitución a su estructura original y/o parcialmente modificada.

Otro fin de la invención puede incluir la generación de una planta transgénica y/o cultivos celulares de plantas que pueden expresar genes heterólogos que acoplaron síntesis cannabinoide e hidroxilación y/o glicosilación *in planta*. Específicamente, un fin de la tecnología puede incluir usar
15 *Nicotiana benthamiana* para demostrar la síntesis de CBDA de acoplamiento y la glicosilación *in planta*. Un fin adicional de la presente modalidad puede incluir modificaciones adicionales en la molécula de CBDA, tal como hidroxilación y acetilación. En aun otro fin, esta modificación de cannabinoides puede estar localizada específicamente, por ejemplo en el citosol y/o tricoma.

Otro fin de la invención puede incluir la generación de una planta transgénica y/o cultivos
20 celulares de plantas que pueden sobreexpresar genes endógenos que se pueden configurar para modificar cannabinoides. El fin adicional puede incluir la coexpresión de factores de transcripción heterólogos que pueden aumentar la producción cannabinoide. Otro fin de la invención puede incluir la coexpresión de genes heterólogos que desintoxican los subproductos de peróxido de hidrógeno generados a través de la biosíntesis cannabinoide. La coexpresión de tales genes puede agregarse
25 a la coexpresión de genes configurados para modificar y/o localizar las biomodificaciones cannabinoides.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1 Perfil de elución cromatográfico representativo de glucósidos de CBGA encontrado en ensayos *in vitro*. Los cromatogramas A, B y C representan los cromatogramas de iones extraídos
30 respectivos para cada producto de glucósido. El cromatograma D es representativo del cromatograma de iones totales. Las intensidades pico se ilustran como abundancia relativa para los picos más abundantes en cada cromatograma respectivo.

Fig. 2 Perfiles de elución cromatográficos representativos de CBGA funcionalizado y glucósidos encontrados en ensayos *in vitro*. Los cromatogramas A, B y C representan los
35 cromatogramas de iones clasificados por extracción respectivos para cada producto. El

cromatograma D es representativo del cromatograma de iones totales. Las intensidades pico se ilustran como abundancia relativa para los picos más abundantes en cada cromatograma respectivo.

Fig. 3 Perfil de elución cromatográfica representativo de perfiles de glucósidos de CBDA encontrados en extractos de hojas. Los cromatogramas A, B, C y D representan los cromatogramas de iones clasificados por extracción respectivos para cada producto de glucósido. El cromatograma E es representativo del cromatograma de iones totales. Las intensidades pico se ilustran como abundancia relativa para los picos más abundantes en cada cromatograma respectivo.

Fig. 4 Elución cromatográfica de CBDA funcionalizada y glucósidos funcionalizados en extractos de hojas. Los cromatogramas A, B y C representan los cromatogramas de iones clasificados por extracción respectivos para cada producto. El cromatograma D es representativo del cromatograma de iones totales. Las intensidades pico se ilustran como abundancia relativa para los picos más abundantes en cada cromatograma respectivo.

Fig. 5 Construcción de gen para la expresión del gen de citocromo P450 (CYP3A4), (SEQ ID NO. 1), expresar la proteína de citocromo P450 (CYP3A4) (SEQ ID NO. 2) y el gen de oxidoreductasa P450 (oxred) (SEQ ID NO. 3), que expresa la proteína de oxidoreductasa P450 (SEQ ID NO. 4), en plantas. Ambos genes fueron accionados por el promotor 35S constitutivo (35S) y mostraron regiones no traducidas 5' de alcohol deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana* (AtADH) como potenciadores traduccionales.

Fig. 6 Confirmación de expresión de CYP3A4 y P450 oxidoreductasa en hojas de tabaco. CB1-CB5, duplicados biológicos de hojas infiltradas con la oxidoreductasa CYP3A4/P450; WT = hojas de tabaco de tipo salvaje sin infiltración. L= escalera de más de 1kb (Thermo Fisher Scientific, EUA). Las flechas muestran la banda esperada (500 pb) que indican la expresión del transgén.

Fig. 7 Glicosilación aumentada de cannabinoides en plantas *N. benthamiana* que sobreexpresan a P450. CB1-CB5 son repeticiones biológicas que sobreexpresan CYP3A4+P450 oxidoreductasa, P_control es el supresor de silenciamiento de P19 (control de "vector vacío"). El eje vertical muestra cantidades relativas expresadas como área pico por g de peso fresco.

Fig. 8 Construcción génica para el sistema de producción cannabinoide de cultivo de suspensión y citosol. 35S, promotor 35S mosaico de la coliflor; HSPT, terminador HSP; 35PPDK, promotor híbrido que consiste en el potenciador 35S del virus de mosaico de la coliflor fusionado al promotor basal C4PPDK del maíz (Yoo et ál. 2007); 76G1, glucosiltransferasa UDP de *Stevia rebaudiana*; ABCG2, transportador multi-fármaco humano.

Fig. 9 Demuestra la confirmación RT-PCR de la expresión de sintasa CBDA (a), glucosiltransferasa UDP (b) y ABCG2 (c) en células de hojas de tabaco. L es la escalera de más de 1kb (Thermo Fisher Scientific, EUA). Los números en los carriles representan líneas transgénicas independientes. Las flechas apuntan a la banda esperada que muestra la expresión del transgén.

Fig. 10 Hidroxilación y glicosilación de cannabinoides en tabaco transgénico (SUS, numerado) que sobreexpresan la sintasa de CBDA, glucosiltransferasa de UDP y el transportador de ABC. WTS1 y 2 son tipo salvaje alimentados con sustrato para reacciones endógenas. Hubo algo de glicosilación endógena de CBGA, así como pruebas de actividad de glucosiltransferasa transgénica aumentada (por ejemplo, SUS2, SUS3 y SUS4). Los datos se han corregido al área pico por g de peso fresco.

Fig. 11 La modificación aumentada de cannabinoides en plantas *N. benthamiana* transgénicas infectadas conjuntamente con construcciones para glicosilación, funcionalización mediada por P450 (hidroxilación) y desintoxicación de peróxido de hidrógeno mediante catalasa.

SUS = construcción para sobreexpresar la sintasa de CBDA, glucosiltransferasa de UDP y transportador de ABC; M3S= construcción para sobreexpresar la sintasa de CBDA, glucosiltransferasa de UDP y transportador de ABC con *Cannabis* similar a MYB12 y catalasa de *Arabidopsis thaliana*.

Fig. 12 Actividad de glicosilación aumentada en plantas *N. benthamiana* transgénicas (TSA, TSB, TSC, SUS, SUS/P450) que sobreexpresa una glucosiltransferasa en comparación con el tipo salvaje en ensayos de expresión transitoria de 14 horas.

Fig. 13 Reacción monooxygenasa de ejemplo, catalizada por citocromos P450.

Fig. 14 La construcción de gen 1 para el sistema de producción de cannabinoides de tricoma. Promotor 35S de mosaico de la coliflor; AtADH 5'-UTR, elemento potenciador de traducción (Matsui et ál. 2012); tsCBDAs, sintasa de ácido cannabidiólico con su secuencia objetivo original; terminador de HSP; tsUGT76G1, glucosiltransferasa de UDP de *Stevia rebaudiana* con secuencia objetivo de tricoma de CBDAs.

Fig. 15 La construcción de gen 2 para el sistema de producción de cannabinoides de tricoma. Promotor 35S de mosaico de la coliflor; AtADH 5'-UTR, elemento potenciador; PM-UTR1, transportador de galactosa/UDP-glucosa *Arabidopsis thaliana* dirigido a la membrana plasmática; terminador de HSP.

Fig. 16 RT-PCR sintasa de CBDA dirigido a tricoma (parte superior), RT-PCR de UGT de glucosiltransferasa de UDP dirigida a tricoma (76G1) (parte inferior). A, B y C son duplicados biológicos recolectados después de 2DPI.

Fig. 17 RT-PCR de PM-UTR1. A, B y C son duplicados biológicos recolectados después de 2DPI.

Fig. 18 La construcción de gen para el sistema de producción de cannabinoides citosólicos. Promotor 35S de mosaico de la coliflor; AtADH 5'-UTR, elemento potenciador; cytCBDAs, sintasa de ácido cannabidiólico con la secuencia objetivo de tricoma eliminada; terminador HSP; cytUGT76G1, UDP glucosiltransferasa de *Stevia rebaudiana*.

Fig. 19 SUS-A a SUS-C son duplicados biológicos para la transformación de la suspensión celular (201-SUS) después de 1DPI.

Fig. 20. cytUGT RT-PCR (parte superior), cytCBDAs RT-PCR (parte inferior). A, B y C son duplicados biológicos para la infiltración de la construcción citosólica después de 2DPI.

5 Fig. 21 Detección de cannabinoides en hojas infiltradas con tricoma o construcciones de suspensión de células y alimentado con CBGA 2.7mM. El código de color se refiere al compartimiento objetivo para CBDAs y acumulación de proteína de UGT76G1, ya sea tricoma o citosol de suspensión de células. Eje Y: CBGA y CBDA expresado como partes por millón (ppm). Glicósidos primarios, secundarios y acilados expresados como área pico.

10 Fig. 22 Detección de cannabinoides en hojas infiltradas con citosólico o construcción de suspensión de células y alimentado con CBGA 2.7mM CBGA y UDP-glucosa 4 mM. El código de color se refiere al compartimiento objetivo para CBDAs y acumulación de proteína de UGT76G1. Eje Y: CBGA expresado como partes por millón (ppm). Todos los otros derivados cannabinoides expresados como área pico (no hay estándares disponibles).

15 Fig. 23 Los cromatogramas de iones extraídos de R-OH funcionalizaron 1 x análogo de CBDA glicosilado. (A) Traza cromatográfica, ion m/z, composición elemental calculada, que confirma la presencia de niveles traza de análogo de CBDA (B) Ausencia de análogo de CBDA en extracto de control (C) Ausencia de análogo de CBDA en extracto de control de duplicado biológico.

20 Fig. 24 Espectro de masas de infusión directa de extracto de *Cannabis sativa*. Los recuadros de espectros representan CBDA con una glicosilación individual (519.2546 m/z), y CBDA funcionalizada con R-OH y una glicosilación individual (535.2543 m/z). Las intensidades pico se ilustran como abundancia relativa para los iones más intensos.

25 Fig. 25 La abundancia relativa de CBDA en extractos de varias cepas de *Cannabis sativa* infiltradas con cultivos de *Agrobacterium* que albergan combinaciones de plásmidos de UGT y sintasa de CBDA (CBDAs). Los datos de abundancia relativa normalizada son presentados como la intensidad de iones de cada compuesto dividido por la intensidad de iones del estándar interno 7-hidroxycumarina (20 ppm).

30 Fig. 26 La abundancia relativa de CBDA modificado (glicosilado y/o hidroxilado) en extractos de varias cepas de *Cannabis sativa* infiltradas con cultivos de *Agrobacterium* que albergan combinaciones de plásmidos de UGT y CBDAs. Los datos de abundancia relativa normalizada son presentados como la intensidad de iones de cada compuesto dividido por la intensidad de iones del estándar interno 7-hidroxycumarina (20 ppm).

35 Fig. 27 La construcción de genes aumentaba la producción de cannabinoides y mitigaba la toxicidad. CsMYB12, predijo que el factor de transcripción de MYB de *Cannabis sativa* para aumentar la biosíntesis de flavonol; HSpt, terminador de transcripción eficiente de la proteína del

gen 18.2 de choque térmico *Arabidopsis thaliana*; 35S, promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor; Catalasa, gen de catalasa *Arabidopsis thaliana*.

Fig. 28 Síntesis de THC y CBD del CBGA a partir del precursor común.

Fig. 29 Generación de peróxido de hidrógeno durante la biosíntesis de cannabinoides.

5 Fig. 30 Hidroxilación seguida por oxidación de THC mediante CYP2C9/

Fig. 31 Transferencia de un componente de ácido glucurónico a un sustrato cannabinoide mediante UGT.

Fig. 32 Síntesis de ácido olivetólico, un precursor de CBGA

10 Fig. 33 Comparación de secuencia de aminoácidos de secuencias de proteína catalasa de *Arabidopsis* de ejemplo.

Fig. 34 Diagrama esquemático de aumento de producción de cannabinoides acoplado con el sistema de daño oxidativo en una modalidad de este.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA O LAS INVENCIONES

15 La presente invención incluye una variedad de aspectos, que pueden combinarse de diferentes maneras. Las siguientes descripciones se proporcionan para enumerar elementos y describir algunas de las modalidades de la presente invención. Estos elementos están enumerados con modalidades iniciales, sin embargo, se debería entender que pueden estar combinados de cualquier manera y en cualquier cantidad para crear modalidades adicionales. Los ejemplos y modalidades preferidos descritos de forma variada no deberían considerarse que limitan la presente

20 invención para solo los sistemas, técnicas y aplicaciones descritas explícitamente. Además, se debería entender que la presente descripción soporta y abarca descripciones y reivindicaciones de todas las varias modalidades, sistemas, técnicas, métodos, dispositivos y aplicaciones con cualquier cantidad de los elementos descritos, con cada elemento solo, y también con cualquiera y todas las permutaciones y combinaciones varias de todos los elementos en esta o cualquier solicitud posterior.

25 La tecnología inventiva incluye sistemas y métodos para la producción de alto nivel de compuestos cannabinoides. Tal como se usa en la presente, el término “alto nivel” en este caso puede significar la biosíntesis superior al tipo salvaje o acumulación de uno o más cannabinoides en una planta o célula de planta. En una modalidad, se puede establecer una suspensión o raíz pilosa o cultivo de suspensión celular de una o más cepas de plantas. En una modalidad preferida, se

30 puede establecer una suspensión o raíz pilosa o cultivo de suspensión celular de una o más cepas de plantas de tabaco o *Cannabis*. Cabe destacar que el término cepa puede referirse a una cepa de planta, así como a un cultivo celular, o línea celular derivada de una planta, tal como el *Cannabis*.

En una modalidad preferida, se puede establecer una suspensión o raíz pilosa o cultivo de suspensión celular de planta de tabaco o *Cannabis sativa* en un fermentador u otro aparato similar.

35 Cabe destacar que el uso de *C. sativa* en esta modalidad es a modo de ejemplo solamente. Por

ejemplo, en determinadas otras modalidades, se pueden usar varias cepas de *Cannabis*, mezclas de cepas, híbridos de diferentes cepas o clones, así como diferentes variedades para generar una suspensión o cultivo de raíz pilosa. Por ejemplo, todas las cepas tales como *C. sativa*, *C. indica* y *C. ruderalis* se pueden usar con la tecnología inventiva. En aun otras modalidades, se pueden usar
 5 otras plantas que producen cannabinoides o similar a cannabinoides. Por ejemplo, en una modalidad determinada se puede establecer una suspensión celular o cultivo de raíz pilosa para uno o más de los siguientes: Equinácea; Acmella Oleracea; Helichrysum Umbraculigerum; Radula Marginata (hepática), Theobroma Cacao o tabaco.

En determinadas modalidades, tales fermentadores pueden incluir grandes fermentadores a
 10 escala industrial que permiten que se cultive un gran cantidad de células *C. sativa* que producen cannabinoides. En esta modalidad, puede ser posible cultivar una gran cantidad de células no adulteradas de una sola cepa de, por ejemplo, tabaco o *C. sativa*, que puede establecer un cultivo celular que tiene una producción consistente y/o modificación de compuestos cannabinoides tanto en cantidad como en tipo. Tal crecimiento cultivado puede ser sostenido de continuo con la
 15 suplementación de nutrientes y otros factores de crecimiento al cultivo. Tales características pueden ser automatizadas o se pueden lograr manualmente.

Otra modalidad de la tecnología inventiva puede incluir sistemas y métodos para producción de alto nivel de compuestos cannabinoides modificados. En una modalidad, se puede establecer una suspensión o cultivo de raíz pilosa de una o más cepas de plantas de tabaco. Cabe destacar
 20 que el término cepa puede referirse a una cepa de planta, así como a un cultivo celular, o línea celular derivada de una planta de tabaco. En una modalidad preferida, se puede establecer un cultivo de raíz pilosa o suspensión de la planta cultivo de *Nicotiana benthamiana* en un fermentador u otro aparato similar. Cabe destacar que el uso de *N. benthamiana* en esta modalidad es a modo de ejemplo solamente. Por ejemplo, en determinadas otras modalidades, se pueden usar varias cepas
 25 de *Nicotiana*, mezclas de cepas, híbridos de diferentes cepas o clones, así como diferentes variedades para generar una suspensión celular o cultivo de raíz pilosa.

En determinadas casos, tales fermentadores pueden incluir grandes fermentadores a escala industrial que permiten que se cultive un gran cantidad de células *N. benthamiana*. En esta modalidad, los cannabinoides cultivados se pueden introducir a este cultivo de suspensión, y
 30 modificar tal como se describe generalmente en la presente. De manera similar, tal crecimiento cultivado de células de tabaco puede ser sostenido de continuo con la adición continua de nutrientes y otros factores de crecimiento que se agregan al cultivo. Tales características pueden ser automatizadas o se pueden lograr manualmente.

Otra modalidad de la invención puede incluir la producción de células de tabaco y/o *Cannabis*
 35 modificado genéticamente para expresar varios genes exógenos y/o endógenos que pueden

modificar la estructura química de los compuestos cannabinoides. Tales cepas transgénicas se pueden configurar para producir y/o modificar grandes cantidades de compuestos cannabinoides generalmente, así como aumentos dirigidos en la producción de cannabinoides específicos tal como THC, Cannabidiol (CBD) o Cannabinol (CBN) y similares.

5 Otra modalidad de la invención puede incluir la producción de cultivos celulares de *Cannabis* genéticamente modificados que expresan una mezcla de cannabinoides que se pueden optimizar para el tratamiento de condiciones médicas específicas. Por ejemplo, el CBD es un cannabinoide no psicoactivo que se puede usar para tratar convulsiones en personas con epilepsia. Sin embargo, décadas de cruce selectiva ha tenido como resultado en la mayoría de las cepas de Cannabis que
10 tienen bajas concentraciones de CBD cuando se comparan con el THC cannabinoide psicoactivo. Como tal, en determinadas modalidades, cultivos celulares específicos al síndrome o enfermedad se pueden desarrollar que expresan una mezcla calibrada de cannabinoides para el tratamiento posterior de tales afecciones.

Modalidades adicionales de la tecnología inventiva pueden incluir sistemas, métodos y
15 composiciones novedosas para la producción y modificación *in vivo* de compuestos cannabinoides en un sistema de plantas. En determinadas modalidades, estas modificaciones *in vivo* pueden llevar a la producción de diferentes formas de cannabinoides con propiedades especiales, por ejemplo, cannabinoides de liberación lenta, solubles en agua o profármacos. En una modalidad preferida, la tecnología inventiva puede incluir sistemas, métodos y composiciones novedosos para la
20 hidroxilación, acetilación y/o glicosilación. Los cannabinoides modificados pueden ser solubles en agua, por ejemplo mediante glicosilación.

Como se menciona anteriormente, la producción y/o acumulación de altos niveles de cannabinoides sería tóxica para un hospedador de célula hospedadora. Como tal, una modalidad de la tecnología inventiva puede incluir sistemas y métodos para modificar de forma transitoria los
25 cannabinoides *in vivo*. Un fin de la presente invención puede incluir el uso de monooxigenasas de citocromo p450 (CYP) para modificar de forma transitoria o funcionalizar la estructura química de los cannabinoides. Los CYP constituyen una familia de enzimas principal capaz de catalizar la biotransformación oxidativa de muchos compuestos químicos farmacológicamente activos y otros xenobióticos lipofílicos. Por ejemplo, tal como se muestra en la Fig. 13, la reacción más común
30 catalizada por citocromos P450 es una reacción de monooxigenasa, por ejemplo, la inserción de un átomo de oxígeno en la posición alifática de un sustrato orgánico (RH) mientras que el otro átomo de oxígeno se reduce a agua.

Se ha mostrado que varios cannabinoides, que incluyen THC sirven como un sustrato para los CYP humanos (CYP2C9 y CYP3A4). De manera similar, los CYP han sido identificados que
35 metabolizan el cannabidiol (CYP 2C19, 3A4); cannabinol (CYP 2C9, 3A4); JWH-018 (CYP 1A2,

2C9); y AM2201 (CYP 1A2, 2C9). Por ejemplo, tal como se muestra generalmente en la Fig. 30, en un sistema de ejemplo, CYP2C9 puede “funcionalizar” o hidroxilar una molécula de THC que tiene como resultado una forma de hidroxilo de THC. La oxidación adicional de la forma hidroxilo de THC mediante CYP2C9 puede convertirlo en una forma de ácido carboxílico que pierde sus capacidades psicoactivas, volviéndolo un metabolito inactivo.

Como tal, otra modalidad de la invención puede incluir la creación de una cepa de Cannabis o cultivo celular que se puede transformar con construcciones genéticas creadas artificialmente que codifican uno o más CYP exógenos. En una modalidad preferida, los genes que codifican una o más isoformas y/o análogos no humanos, así como posiblemente otros CYP que pueden funcionalizar cannabinoides, se pueden expresar en *Cannabis sativa* transgénica u otra planta. En otra modalidad preferida, los genes que codifican una o más isoformas y/o análogos no humanos, así como posiblemente otros CYP que pueden funcionalizar cannabinoides, se pueden expresar en *Cannabis sativa* transgénica o cepas de tabaco cultivadas en un cultivo de suspensión. Modalidades adicionales pueden incluir elementos de control genético tales como promotores y/o potenciadores así como elementos reguladores postraduccionales que también se pueden expresar en cepas de Cannabis transgénica de modo que la presencia, cantidad y actividad de cualquier CYP presente en la suspensión o cultivo de raíz pilosa se puede modificar y/o calibrar.

Otra modalidad de la invención puede incluir la creación de una cepa de tabaco o cultivo celular que se puede transformar con construcciones genéticas creadas artificialmente que codifican uno o más CYP exógenos. En una modalidad preferida, los genes que codifican una o más isoformas y/o análogos no humanos, así como posiblemente otros CYP que pueden funcionalizar cannabinoides introducidos a una planta *N. benthamiana* transgénica o cultivo de suspensión. Modalidades adicionales pueden incluir elementos de control genético tales como promotores y/o potenciadores así como elementos reguladores postraduccionales que también se pueden expresar en cepas de *N. benthamiana* transgénica de modo que la presencia, cantidad y actividad de cualquier CYP presente en la suspensión o cultivo de raíz pilosa se puede modificar y/o calibrar.

Otro fin de la invención puede ser modificar adicionalmente, *in vivo*, los cannabinoides y/o cannabinoides ya funcionalizados. En una modalidad preferida, la glicosilación de cannabinoides y/o cannabinoides funcionalizados pueden convertirlos en una forma soluble en agua. En una modalidad de ejemplo mostrada en la Fig. 31, la tecnología inventiva puede usar una o más enzimas de glucosiltransferasa, tal como UDP-glucosiltransferasa (UGT), para catalizar, *in vivo* la glucuronosilación o glucuronidación de cannabinoides, tal como cannabinoides primarios (CBD, CBN) y secundarios (THC, JWH-018, JWH-073). En esta modalidad, la glucuronidación puede consistir en la transferencia de un componente de ácido glucurónico de ácido glucurónico de difosfato de uridina a un sustrato cannabinoide mediante cualquiera de varios tipos de

glucosiltransferasas tal como se describe en la presente. El ácido glucurónico es un ácido de azúcar derivado de la glucosa, con su sexto átomo de carbono oxidado hasta un ácido carboxílico.

Aun otra modalidad de la presente invención puede incluir la conversión *in vivo* de un cannabinoide funcionalizado, en este ejemplo una forma de ácido carboxílico del cannabinoide, hasta una forma glicosilada de cannabinoide que puede ser ambos soluble en agua y no tóxico para la célula hospedadora. Estas modificaciones químicas pueden permitir niveles mayores de acumulación cannabinoide en un cultivo celular de planta sin efectos citotóxicos nocivos que se verían con cannabinoides no modificados debido a esta solubilidad en agua.

Otra modalidad de la invención puede incluir la generación de cepas modificadas genéticamente o transgénicas de *Cannabis*, u otras plantas tales como tabaco, que tienen construcciones genéticas artificiales que pueden expresar uno o más genes que pueden aumentar la solubilidad de los cannabinoides y/o disminuir la citotoxicidad. Por ejemplo, la tecnología inventiva puede incluir la generación de cepas de plantas transgénicas o líneas celulares que tienen construcciones genéticas artificiales que pueden expresar una o más glucosiltransferasas endógenas/o exógenas u otras enzimas capaces de glicosilar compuestos cannabinoides. Por ejemplo, en una modalidad una o más glucosiltransferasas de *N. benthamiana*, u otras plantas que no son cannabis se pueden introducir en una planta de cannabis o cultivo celular y configurar para glicosilar cannabinoides *in vivo*. En otra modalidad, las glucosiltransferasas endógenas de *N. benthamiana* se pueden sobreexpresar para aumentar la glicosilación de cannabinoides *in vivo*.

En una modalidad adicional, de la tecnología inventiva puede incluir la generación de construcciones genéticas artificiales que tienen genes que codifican una o más glucosiltransferasas, que incluyen análogos no humanos de aquellos descritos en la presente así como otras isoformas, que pueden adicionalmente ser expresadas en *N. benthamiana*, *Cannabis sativa* transgénica u otro sistema de plantas que puede además ser cultivada en un cultivo de suspensión. Modalidades adicionales pueden incluir elementos de control genético tales como promotores y/o potenciadores así como elementos de control reguladores postraduccionales que también se pueden expresar en un sistema de planta transgénica de modo que la presencia, cantidad y actividad de cualesquiera glucosiltransferasas presentes en la suspensión o cultivo de raíz pilosa se pueda regular.

Una modalidad adicional de la invención puede incluir construcciones genéticas artificiales que tienen uno o más genes que codifican una o más glucosiltransferasas UDP y/o ADP que tienen dominios o secuencias de localización que pueden ayudar en el movimiento de la proteína a una parte determinada de la célula, tal como las ubicaciones celulares donde los cannabinoides y/o cannabinoides funcionalizados se pueden modificar, producir, almacenar y/o excretar de la célula.

Una modalidad adicional de la invención puede incluir construcciones genéticas artificiales que tienen uno o más genes que codifican una o más glucosiltransferasas UDP y/o ADP que se

expresan conjuntamente con uno o más genes exógenos que pueden ayudar en el movimiento de la proteína a una parte determinada de la célula, tal como las ubicaciones celulares donde los cannabinoides y/o cannabinoides funcionalizados se pueden almacenar y/o excretar de la célula.

Una modalidad preferida de la tecnología inventiva puede incluir el nivel elevado de producción *in vivo* de cannabinoides glicosilados solubles en agua, generalmente a los que se hace referencia como cannabinoides modificados de forma transitoria que se pueden cultivar a partir de una planta o un cultivo celular. En una modalidad, los cannabinoides modificados de forma temporal pueden acumularse dentro de la célula que es parte de un cultivo de suspensión. En este ejemplo, se puede permitir que el cultivo celular crezca a un nivel deseado de célula o densidad óptica, o en otros casos hasta que se haya acumulado un nivel deseado de cannabinoides modificados de forma temporal en las células de *Cannabis* cultivadas. Tales genes exógenos se pueden ubicar, por ejemplo, en el citosol o tricoma tal como se describe generalmente en la presente, y pueden además expresarse conjuntamente con otros genes exógenos que pueden reducir la toxicidad de biosíntesis de cannabinoides y/o facilitar el transporte de cannabinoides a través o fuera de la célula.

Toda o una parte de las células de *Cannabis* que contienen los cannabinoides modificados de forma temporal acumulados pueden entonces ser cosechados del cultivo, que en una modalidad preferida puede ser un fermentador a escala industrial u otro aparato adecuado para el cultivo a gran escala de células de plantas. Las células de *Cannabis* cultivadas se pueden lisar de modo que los cannabinoides acumulados modificados de forma temporal se puedan liberar al lisado que los rodea. Etapas adicionales pueden incluir tratar este lisado. Ejemplos de tal tratamiento pueden incluir filtrar o analizar este lisado para quitar material de plantas extraño así como tratamientos químicos para mejorar los rendimientos de cannabinoides posteriores.

Otra modalidad de la tecnología inventiva puede incluir el nivel elevado de generación *in vivo* de cannabinoides glicosilados solubles en agua, generalmente a los que se hace referencia como cannabinoides modificados de forma transitoria que se pueden cultivar a partir de una planta o un cultivo celular. En una modalidad, los cannabinoides se pueden introducir a un cultivo celular que no produce cannabinoides, tal como *N. benthamiana*. En esta modalidad preferida, el cultivo celular que no produce cannabinoides puede ser modificado genéticamente para expresar uno o más genes endógenos o exógenos que pueden modificar los cannabinoides, por ejemplo a través de hidroxilación, acetilación y/o glicosilación. Tales genes endógenos o exógenos se pueden ubicar, por ejemplo, en el citosol o tricoma tal como se describe generalmente en la presente, y pueden además expresarse conjuntamente con otros genes exógenos que pueden reducir la toxicidad de biosíntesis de cannabinoides y/o facilitar el transporte de cannabinoides a través o fuera de la célula.

Se puede permitir que este no cannabinoide que produce el cultivo celular crezca hasta un nivel deseado de célula o densidad óptica, o en otros casos hasta que se haya acumulado un nivel

deseado de cannabinoides modificados de forma temporal en las células cultivadas. Toda o una parte de las células de *N. benthamiana* que contienen los cannabinoides acumulados pueden entonces ser cosechados del cultivo, que en una modalidad preferida puede ser un fermentador a escala industrial u otro aparato adecuado para el cultivo a gran escala de células de plantas. Las células de *N. benthamiana* cultivadas se pueden lisar de modo que los cannabinoides acumulados modificados de forma temporal se puedan liberar al lisado que los rodea. Etapas adicionales pueden incluir tratar este lisado. Ejemplos de tal tratamiento pueden incluir filtrar o analizar este lisado para quitar material de plantas extraño así como tratamientos químicos para mejorar los rendimientos de cannabinoides posteriores.

Otro fin de la tecnología inventiva puede incluir métodos para aislar y purificar cannabinoides modificados de forma temporal a partir de un cultivo de suspensión o planta. En una modalidad preferida, un lisado de *Cannabis* se puede generar y procesar usando cromatografía de afinidad u otros métodos de purificación. En esta modalidad preferida, una columna de afinidad que tiene un ligando o receptor de proteína configurado para unirse con los cannabinoides modificados de forma temporal, por ejemplo a través de la asociación con un grupo funcional de ácido glucurónico o glicosilo entre otros, se puede inmovilizar o acoplar a un soporte sólido. El lisado se puede luego pasar sobre la columna de modo que los cannabinoides modificados de forma temporal, que tienen afinidad de unión específica al ligando se unen e inmovilizan. En algunas modalidades, las proteínas de unión no específica y no de unión que pueden haber estado presentes en el lisado se pueden quitar. Finalmente, los cannabinoides modificados de forma temporal pueden ser eluidos o desplazados de la columna de afinidad mediante, por ejemplo, un azúcar correspondiente u otro compuesto que puede desplazar o interrumpir el enlace de cannabinoide-ligando. Los cannabinoides eluidos modificados de forma temporal se pueden recolectar y purificar o procesar adicionalmente.

Un fin de la invención puede incluir una modalidad donde los cannabinoides modificados de forma temporal se pueden excretar de forma pasiva y/o activa a partir de una célula o en una pared celular. En un modelo de ejemplo, un transportador de casete de unión a ATP exógeno (transportadores de ABC) u otra estructura molecular similar puede reconocer el grupo funcional de ácido glucurónico o glicosilo (conjugado) en el cannabinoide modificado de forma temporal y transportarlo de forma activa a través de la pared celular/membrana y dentro del medio que lo rodea. En esta modalidad, se puede dejar que el cultivo celular crezca hasta que se alcance un parámetro de salida. En un ejemplo, un parámetro de salida puede incluir permitir que el cultivo celular crezca hasta una densidad óptica/celular deseada, o hasta que se alcance una concentración deseada de cannabinoide modificado de forma temporal. En esta modalidad, el medio de cultivo que contiene los cannabinoides modificados de forma temporal se pueden cultivar para su posterior extracción de cannabinoides. En algunas modalidades, este medio cultivado se puede tratar en una manera similar

al lisado generalmente descrito anteriormente. De manera adicional, los cannabinoides modificados de forma temporal presentes en el medio tratado y/o sin tratar pueden ser aislados y purificados, por ejemplo, a través de cromatografía de afinidad en una forma similar a la descrita anteriormente.

En determinadas modalidades, este aislado de cannabinoide purificado puede contener una
5 mezcla de cannabinoides glicosilados primarios y secundarios. Tal como se menciona anteriormente, tales cannabinoides glicosilados purificados pueden ser solubles en agua y ser metabolizados más lentamente que los cannabinoides no modificados que proporcionan una capacidad de liberación lenta que puede ser deseable en determinadas aplicaciones farmacéuticas, tal como para usar en aplicaciones específicas al tejido, o como un profármaco. Como tal, es un fin
10 de la invención incorporar tales cannabinoides glicosilados purificados en una variedad de aplicaciones farmacéuticas y/o nutracéuticas.

Por ejemplo, los cannabinoides glicosilados purificados se pueden incorporar en varios vectores de administración líquida y/o sólida para usar en aplicaciones farmacéuticas. Tal como se describe anteriormente, estos cannabinoides modificados de forma temporal puede que ya no
15 posean su componente psicoactivo, lo cual vuelve su aplicación en aplicaciones terapéuticas y farmacéuticas y de investigación especialmente beneficiosa. Por ejemplo, el tratamiento de niños puede ser logrado a través de la administración de una dosis terapéutica de cannabinoides modificados de forma temporal purificados y aislados, sin el efecto psicoactivo no deseado. Las aplicaciones terapéuticas adicionales pueden incluir el cultivo y posterior administración de una dosis
20 terapéutica de un “entorno” de cannabinoides modificados de forma temporal aislados y purificados.

Otra modalidad de la invención puede incluir un sistema para convertir o reconstituir los cannabinoides modificados de forma temporal. En una modalidad preferida, los cannabinoides glicosilados se pueden convertir en cannabinoides no glicosilados a través de su tratamiento con una o más glicosidasas generalizadas o específicas. El uso y disponibilidad de enzimas de
25 glicosidasa serían reconocidos por los expertos en la técnica sin necesitar experimentación no debida. En esta modalidad, estas enzimas de glicosidasa pueden quitar un resto de azúcar. Específicamente, estas glicosidasas pueden quitar el resto de ácido glucurónico o glicosilo que reconstituye el compuesto cannabinoide a una forma que exhibe actividad psicoactiva. Este proceso de reconstitución puede generar un “entorno” altamente purificado de cannabinoides primarios y
30 secundarios. Estos compuestos cannabinoides reconstituidos pueden también ser incorporados en varios vectores de administración líquidos y/o sólidos para usar en una variedad de aplicaciones farmacéuticas y otras comerciales.

Tal como se menciona anteriormente, en una modalidad de la invención, las cepas de *Cannabis* que producen cannabinoides, así como otras plantas se pueden usar con la tecnología En
35 determinadas modalidades preferidas, en vez de cultivar la planta que produce cannabinoides

objetivo en un cultivo celular, el material de planta bruto se puede cultivar y ser sometido a extracción cannabinoide que usa uno o más de los métodos descritos en la presente. Estos cannabinoides extraídos de forma tradicional se pueden luego modificar a partir de sus formas nativas a través de la aplicación *in vitro* de uno o más CYP que pueden generar formas de hidroxilo y ácido carboxílico de estos cannabinoides respectivamente. Estos cannabinoides funcionalizados pueden ser modificados adicionalmente a través de la aplicación *in vitro* de una o más glucosiltransferasas tal como se describe generalmente en la presente. En esta modalidad, los nuevos cannabinoides modificados de forma temporal se pueden aislar y purificar a través de un proceso de cromatografía de afinidad, y otro protocolo de extracción, y luego aplicar a varios usos comerciales y otros terapéuticos. En otras modalidades, los cannabinoides modificados de forma temporal se pueden restaurar y reconstituir a través de la aplicación *in vitro* de una o más enzimas de glicosidasa. Estos cannabinoides restaurados también se pueden aplicar a varios usos comerciales y otros terapéuticos.

Otra modalidad de la invención puede incluir el uso de otras plantas que producen no cannabinoides en vez de cultivar una planta que produce cannabinoides en un cultivo celular. Aquí, el cannabinoide se puede introducir a plantas modificadas genéticamente, o cultivos celulares de plantas que expresan uno o más CYP que puede generar formas de ácido carboxílico e hidroxilo de estos cannabinoides respectivamente. Estos cannabinoides funcionalizados se pueden modificar adicionalmente a través de la acción de una o más glicosidasas que se pueden expresar también en la planta o cultivo celular que no produce cannabinoides. En una modalidad preferida, un cultivo celular que no produce cannabinoides puede incluir la planta de tabaco o cultivos celulares.

Una modalidad de la invención puede incluir un método *in vivo* de modificación y acumulación de cannabinoides dirigidos a tricoma. Una modalidad preferida de este sistema *in vivo* puede incluir la creación de una proteína recombinante que puede permitir la translocación de un CYP o glucosiltransferasas a un sitio de síntesis de cannabinoide extracelular en una planta entera. Más específicamente, en esta modalidad preferida, uno o más CYP o glucosiltransferasas pueden ser diseñados genéticamente para expresar todo o parte de la secuencia objetivo extracelular de extremo N tal como está presente en la proteína de sintasa de cannabinoide, tal como sintasa de THCA o sintasa de CBDA.

Otra modalidad de la invención puede incluir un método *in vivo* de biosíntesis, modificación y/o acumulación de cannabinoides dirigidos a tricoma de alto nivel. Una modalidad preferida de este sistema *in vivo* puede incluir la creación de una proteína recombinante que puede permitir la translocación de una catalasa a un sitio de síntesis de cannabinoide extracelular en una planta entera. Más específicamente, en esta modalidad preferida, uno o más enzimas de catalasa pueden ser diseñados genéticamente para expresar todo o parte de la secuencia objetivo extracelular de

extremo N tal como está presente en la proteína de sintasa de cannabinoide, tal como sintasa de THCA o sintasa de CBDA. En esta modalidad, la catalasa se puede dirigir al sitio de biosíntesis de cannabinoides que le permite neutralizar de forma más eficiente los subproductos de peróxido de hidrógeno.

5 En esta modalidad preferida, este dominio o secuencia de direccionamiento a tricoma de extremo N puede incluir generalmente los primeros 28 residuos de aminoácidos de una sintasa generalizada. Una secuencia que se dirige a tricoma de ejemplo para la sintasa de THCA se identifica como SEQ ID NO. 40, mientras que la secuencia que se dirige a tricoma para la sintasa de CBDA se identifica como SEQ ID NO. 41 Esta secuencia de direccionamiento extracelular puede
10 ser reconocido por la célula de la planta y hacer que el transporte de la glucosiltransferasa del citoplasma al tricoma de la planta, y en particular el compartimiento de almacenamiento del tricoma de la planta donde puede ocurrir la glicosilación de cannabinoide extracelular. Más específicamente, en esta modalidad preferida, una o más glucosiltransferasas, tal como glucosiltransferasa de UDP, pueden ser diseñadas genéticamente para expresar todo o parte de la secuencia objetivo
15 extracelular de extremo N tal como está presente en una enzima de sintasa de ejemplo.

Otra modalidad de la invención puede incluir un método *in vivo* de producción, acumulación y/o modificación de cannabinoides dirigidos a citosólicos. Una modalidad preferida de este sistema *in vivo* puede incluir la creación de una proteína recombinante que puede permitir la localización de sintasas de cannabinoides y/o glucosiltransferasas al citosol.

20 Más específicamente, en esta modalidad preferida, una o más sintasas cannabinoides se pueden modificar para quitar toda o parte de la secuencia objetivo extracelular de extremo N. Una secuencia que se dirige a tricoma de ejemplo para la sintasa de THCA se identifica como SEQ ID NO. 40, mientras que la secuencia que se dirige a tricoma para la sintasa de CBDA se identifica como SEQ ID NO. 41. La coexpresión con esta sintasa dirigida a citosólico con un CYP dirigido a
25 citosólico o glucosiltransferasa, puede permitir la localización de síntesis, acumulación y modificación de cannabinoides al citosol. Tales enzimas objetivo citosólicas se pueden coexpresar con catalasa, transportador ABC u otros genes que pueden reducir la toxicidad de la biosíntesis de cannabinoides y/o facilitar el transporte a través o fuera de la célula.

Otra modalidad de la invención puede incluir la generación de un vector de expresión que
30 comprende este polinucleótido, a saber una secuencia objetivo extracelular de extremo N de sintasa cannabinoide y genes de glucosiltransferasa, unidos de forma operativa a un promotor. Una planta alterada genéticamente o partes de esta y su progenie que comprenden este polinucleótido unido de forma operativa a un promotor, donde dicha planta o partes de esta y su progenie producen dicha proteína quimérica, es aun otra modalidad. Por ejemplo, las semillas y polen contienen esta
35 secuencia de polinucleótidos o un homólogo de esta, una célula de planta alterada genéticamente

que comprende este polinucleótido unido de forma operativa a un promotor de modo que dicha célula de planta produce dicha proteína quimérica. Otra modalidad comprende un cultivo de tejido que comprende una pluralidad de las células de planta alterada genéticamente.

Otra modalidad de la invención proporciona una célula o planta alterada genéticamente que
 5 expresa una proteína de fusión o quimérica que tiene una secuencia objetivo extracelular de extremo N de sintasa cannabinoide (ver, es decir, la SEQ ID: 40-41; ver también la SEQ ID NO. 42 para la secuencia de aminoácidos completa de sintasa de THCA) acoplada con genes de glucosiltransferasa de UDP, unidos de forma operativa a un promotor. Otra modalidad proporciona un método para construir una planta alterada genéticamente o parte de esta que tiene glicosilación
 10 de cannabinoides en el compartimiento de almacenamiento extracelular del tricoma de la planta en comparación con una planta alterada de forma no genética o parte de esta, el método que comprende las etapas de: introducir un polinucleótido que codifica la proteína anterior en una planta o parte de esta para proporcionar una planta alterada genéticamente o parte de esta, donde dicha proteína quimérica que comprende un primer dominio, un segundo dominio, y donde dicho primer
 15 dominio comprende una secuencia objetivo extracelular de extremo N de sintasa de cannabinoide, y un segundo dominio comprende una secuencia de glucosiltransferasa. Estos dominios pueden ser separados por un tercer dominio o enlazador. Este enlazador puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que puede separar un primer dominio de un segundo dominio de modo que el primer dominio y el segundo dominio puede cada uno plegarse en su forma tridimensional apropiada y
 20 retener su actividad.

Una modalidad preferida de la invención puede incluir una planta alterada genéticamente o célula que expresa una proteína de sintasa de cannabinoide dirigida a citosólico que tiene una secuencia objetivo extracelular de extremo N de sintasa cannabinoide (SEQ ID 40-41) inactivada o
 quitada. En una modalidad, una sintasa de THCA dirigida citosólica (ctTHCAs) se puede identificar
 25 como SEQ ID NO. 46, mientras que en otra modalidad la sintasa de CBDA dirigida citosólica (cytCBDAs) se identifica como la SEQ ID NO. 22-23. Tal proteína de sintasa de cannabinoide dirigido a citosólico puede estar unida de forma operativa a un promotor. Otra modalidad proporciona un método para construir una planta alterada genéticamente o parte de esta que tiene glicosilación de cannabinoides en el citosol de la planta en comparación con una planta alterada de forma no
 30 genética o parte de esta, el método que comprende las etapas de: introducir un polinucleótido que codifica la proteína anterior en una planta o parte de esta para proporcionar una planta alterada genéticamente o parte de esta, donde dicha secuencia objetivo extracelular de extremo N de sintasa de cannabinoide ha sido alterada o quitada.

Aun otra modalidad de la invención puede incluir un método *in vivo* de glicosilación de
 35 cannabinoide en un cultivo celular de *cannabis*. En una modalidad preferida, para facilitar la

glicosilación de los cannabinoides en el cultivo celular de *cannabis*, al que le faltaría una estructura de tricoma extracelular, un gen de sintasa de cannabinoide puede estar modificado genéticamente para quitar o alterar, por ejemplo a través de una mutación dirigida, el dominio objetivo de extremo N extracelular que puede luego ser usado para transformar una célula de planta de *Cannabis* en un cultivo celular. En esta modalidad, sin este dominio objetivo la sintasa cannabinoide, por ejemplo, las sintasas de THCA o CBDA, pueden permanecer dentro de la célula de la planta, en oposición a ser transportadas de forma activa fuera de la célula, donde se pueden expresar con una o más glucosiltransferasas, tal como glucosiltransferasa de UDP en el citoplasma.

Otra modalidad de la tecnología inventiva puede incluir sistemas y métodos para la producción aumentada y/o acumulación de compuestos cannabinoides en un sistema *in vivo*. En una modalidad preferida, la invención puede incluir la generación de una planta de *Cannabis* transgénica o genéticamente modificada que puede producir y/o acumular uno o más cannabinoides a niveles de tipo salvaje más altos. En una modalidad, una planta de *Cannabis* transgénica se puede generar para expresar uno o más factores de transcripción de *Cannabis sativa* que pueden aumentar la o las vías metabólicas cannabinoides. En una modalidad preferida, se puede generar un polinucleótido que codifica uno o más genes de factores de transcripción myb de *Cannabis sativa*, y/o uno o más genes ortólogos exógenos que aumentan el flujo de metabolitos a través de la vía biosintética cannabinoide.

En esta modalidad preferida, se puede generar un polinucleótido que codifica uno o más genes de factores de transcripción myb de *Cannabis sativa*, tal como CAN833 y/o CAN738. Tal como se muestra en la Fig. 32, estos factores de transcripción pueden accionar la producción de ácido olivetólico, que es un precursor de CBGA, que a su vez es un precursor en la vía biosintética de THC, CBD y CBC. En una modalidad alternativa, se puede generar un polinucleótido que codifica uno o más ortólogos de genes de factores de transcripción myb de *Cannabis sativa*, especialmente Myb12 (SEQ IDs. 11-12), Myb8 (SEQ ID NO. 43), AtMyb12 (SEQ ID NO.44), y/o MYB112 de *cannabis* (SEQ ID NO. 45) que también pueden accionar la producción de ácido olivetólico, que es un precursor de CBGA, que a su vez es un precursor en la vía biosintética de THC, CBD y CBC.

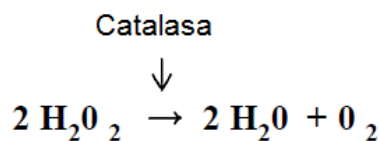
En una modalidad preferida, la invención puede incluir métodos para generar un polinucleótido que expresa una o más de las SEQ ID relacionadas con la producción de cannabinoides aumentada identificada en la presente. En determinadas modalidades preferidas, las proteínas de la invención se pueden expresar usando cualquiera de una cantidad de sistemas para obtener las cantidades deseadas de la proteína. Típicamente, se coloca el polinucleótido que codifica la proteína o componente de esta bajo el control de un promotor que es funcional en la célula hospedadora deseada. Una variedad extremadamente amplia de promotores puede estar disponible, y se puede utilizar en los vectores de expresión de la invención, según la aplicación

particular. Comúnmente, el promotor seleccionado depende de la célula en la cual el promotor estará activo. Otras secuencias de control de expresión como los sitios de unión al ribosoma, los sitios de terminación de transcripción y similares también se incluyen opcionalmente. Las construcciones que incluyen una o más de estas secuencias de control se denominan “casetes de expresión” o “construcciones”. Por consiguiente, los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos unidos se incorporan para la expresión de alto nivel en una célula hospedadora deseada.

Las modalidades adicionales de la invención pueden incluir seleccionar una planta alterada genéticamente o parte de esta que expresa la proteína de factor de transcripción de producción de cannabinoides, donde la proteína expresada tiene capacidades de biosíntesis de cannabinoides aumentadas. En determinadas modalidades, un polinucleótido que codifica la proteína de factor de transcripción de la producción de cannabinoides se introduce mediante la transformación de dicha planta con un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido unido de forma operativa a un promotor. La proteína del factor de transcripción de producción de cannabinoides puede comprender una SEQ ID que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 11-2 o 43-45, o un homólogo de este.

Tal como se mencionó anteriormente, una modalidad de la invención puede incluir sistemas y métodos para la desintoxicación localizada y/o general de la biosíntesis de cannabinoides en un sistema *in vivo*. En una modalidad preferida, la invención puede incluir la generación de una planta de *Cannabis* transgénica o modificada genéticamente u otra planta que se pueda configurar para ser capaz de desintoxicar los subproductos de peróxido de hidrógeno que resultan de la biosíntesis de cannabinoides a niveles de tipo salvaje más altos. Además, esta desintoxicación se puede configurar para estar ubicada en la estructura de tricoma y/o citosol de la planta de *Cannabis* donde los cannabinoides están siendo sintetizados de forma activa en un sistema de planta entero. En esta modalidad preferida de la invención, una planta transgénica, tal como una célula o planta de tabaco o *cannabis*, que expresa uno o más genes que pueden regular por aumento la desintoxicación de peróxido de hidrógeno.

En una modalidad preferida, se puede generar un polinucleótido que codifica uno o más genes de catalasa de transcripción endógenos y/o exógenos, y/u ortólogos que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno.



Como tal, en una modalidad, la invención comprende la generación de un polinucleótido que codifica una proteína catalasa exógena que se puede expresar dentro de una planta transformada

y/o cultivo celular. En una modalidad preferida, una enzima de catalasa configurada para reducir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generada durante una síntesis de cannabinoides se puede usar para transformar una planta de cannabis u otra, tal como una planta de tabaco. Mientras que se puede incluir una cantidad de enzimas de catalasa genéricas en este primer dominio, como apenas un modelo de ejemplo, un primer dominio puede incluir una catalasa exógena derivada de *Arabidopsis* (SEQ ID NO. 13-14; ver también la Fig. 33), o *Escherichia coli* (SEQ ID NO. 15-16), o cualquier ortólogo de catalasa apropiado, fragmento de proteína, o catalasas con una homología entre alrededor de 70 % - y aproximadamente 100 % como se define en la presente.

Otra modalidad de la presente invención puede incluir la localización de la enzima de catalasa a una estructura de tricoma. Tal como se indica generalmente antes, en la presente modalidad una secuencia objetivo de tricoma de una sintasa de cannabinoides se puede acoplar con una o más enzimas de catalasa en una fusión o quimera - cuyos términos generalmente son intercambiables en la presente solicitud. Este gen de catalasa de objetivo de tricoma artificial se puede usar para transformar una planta que tiene estructuras de tricoma, tal como Cannabis o tabaco. En una modalidad preferida, una catalasa dirigida a tricoma de *Arabidopsis thaliana* con un dominio objetivo de tricoma de sintasa de THCA es identificada como SEQ ID NO. 47, mientras que una catalasa dirigida a tricoma de *Arabidopsis thaliana* con un dominio objetivo de tricoma de sintasa de CBDA es identificada como SEQ ID NO. 48. En otra modalidad, una catalasa dirigida a tricoma de *Escherichia coli* con un dominio objetivo de tricoma de sintasa de THCA es identificada como SEQ ID NO. 49, mientras que una catalasa dirigida a tricoma de *Escherichia coli* con un dominio objetivo de tricoma de sintasa de CBDA es identificada como SEQ ID NO. 50.

Otra modalidad de la invención comprende generar un polinucleótido de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de catalasa de fusión/quimérica. Otra modalidad incluye un vector de expresión que comprende este polinucleótido unido de forma operativa a un promotor. Una planta alterada genéticamente o partes de esta y su progenie que comprenden este polinucleótido unido de forma operativa a un promotor, donde dicha planta o partes de esta y su progenie producen dicha proteína de fusión es aun otra modalidad. Por ejemplo, las semillas y polen contienen esta secuencia de polinucleótidos o un homólogo de esta, una célula de planta alterada genéticamente que comprende este polinucleótido unido de forma operativa a un promotor de modo que dicha célula de planta produce dicha proteína quimérica. Otra modalidad comprende un cultivo de tejido que comprende una pluralidad de las células de planta alterada genéticamente.

En una modalidad preferida, un polinucleótido que codifica una proteína de fusión dirigida a tricomas puede estar unido de forma operativa a un promotor que puede ser apropiado para la expresión de proteínas en una planta de *Cannabis*, tabaco u otra. Los promotores de ejemplo pueden incluir, de modo no taxativo: un promotor no constitutivo; un promotor inducible, un promotor

preferido por el tejido; un promotor específico para el tejido, un promotor específico para la planta, o un promotor constitutivo. En una modalidad preferida, uno o más genes seleccionados se pueden unir de forma operativa a un promotor de gen específico para la hoja, tal como Cab1. Los promotores adicionales y configuraciones operables para expresión, así como la coexpresión de uno o más de los genes seleccionados son generalmente conocidos en la técnica.

Otra modalidad de la invención puede proporcionar un método para construir una planta alterada genéticamente o parte de esta que tiene resistencia aumentada a la citotoxicidad por peróxido de hidrógeno durante la síntesis del cannabinoide en comparación con una planta alterada de forma no genética o parte de esta, el método que comprende las etapas de: introducir un polinucleótido que codifica una proteína de fusión en una planta o parte de esta para proporcionar una planta alterada genéticamente o parte de esta, donde dicha proteína de fusión que comprende una catalasa y una secuencia que se dirige a tricoma de una sintasa de cannabinoide.

En una modalidad, la invención puede abarcar un sistema para aumentar la producción cannabinoide general y acumulación en tricomas mientras se previenen efectos de citotoxicidad potenciales. Tal como se muestra generalmente en la Fig. 34, el sistema puede incluir, en una modalidad preferida, crear un *Cannabis* transgénico, tabaco u otra planta o planta de cultivo de suspensión que sobreexpresa al menos un factor de transcripción de Myb para aumentar la biosíntesis de cannabinoides general. En modalidades preferidas adicionales, esta planta transgénica puede coexpresar una enzima catalasa para reducir el daño oxidativo que resulta de la producción de peróxido de hidrógeno asociada con la síntesis de cannabinoides que reduce la toxicidad celular. En determinadas modalidades preferidas, esta catalasa se puede fusionar con un dominio objetivo de tricoma sintasa de extremo N, por ejemplo de sintasa de THCA y/o CBDA, que ayuda a localizar la catalasa en el tricoma en el caso de los sistemas de plantas enteras, y reducir potencialmente los niveles tóxicos de peróxido de hidrógeno producidos por la actividad de sintasa de THCA, CBCA y/o CBDA.

Otra modalidad de la invención puede comprender un polinucleótido de combinación de una secuencia de ácido nucleico que codifica una combinación de: 1) una proteína de factor de transcripción de producción de cannabinoides, tal como un gen myb; y/o una proteína catalasa, o cualquier homólogo de este, que puede incluir además un objetivo de tricoma o señal de localización. Una planta alterada genéticamente o partes de esta y su progenie que comprenden este polinucleótido de combinación unido de forma operativa a un promotor, donde dicha planta o partes de esta y su progenie producen dicha proteína es aun otra modalidad. Por ejemplo, las semillas y polen contienen esta secuencia de polinucleótidos o un homólogo de esta, una célula de planta alterada genéticamente que comprende este polinucleótido unido de forma operativa a un promotor de modo que dicha célula de planta produce dichas proteínas. Otra modalidad comprende un cultivo

de tejido que comprende una pluralidad de las células de planta alterada genéticamente.

Otra modalidad de la invención puede proporcionar un método para construir una planta alterada genéticamente o parte de esta que tiene: 1) producción de cannabinoides aumentada en comparación con una planta no genéticamente alterada o parte de esta; y/o y 2) resistencia
 5 aumentada a la citotoxicidad por peróxido de hidrógeno generado durante la síntesis de cannabinoides en comparación con una planta no genéticamente alterada o parte de esta, el método que comprende las etapas de: introducir un polinucleótido de combinación en una planta o parte de esta para proporcionar una planta genéticamente alterada o parte de esta.

Las modalidades adicionales de la invención pueden incluir seleccionar una planta alterada
 10 genéticamente o parte de esta que expresa una o más de las proteínas, donde la o las proteínas expresadas pueden tener: 1) capacidades de producción de cannabinoides aumentadas, por ejemplo a través de la sobreexpresión de un gen myb endógeno; y 2) catalasa con/o sin una capacidad de localización de tricoma, o cualquier combinación de estos. En determinadas modalidades, un polinucleótido de combinación que codifica las proteínas se introduce mediante la
 15 transformación de dicha planta con un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido de combinación unido de forma operativa a un promotor. La proteína del factor de transcripción de producción de cannabinoides puede comprender una SEQ ID que se selecciona de las secuencias identificadas en la presente, u homólogos de estos. Naturalmente, tales combinaciones y estrategias de combinación de expresión, tal como las identificadas en las Tablas 7-8, 10 debajo y en otra parte,
 20 son a modo de ejemplo, ya que múltiples combinaciones de los elementos tal como se describen en la presente están incluidas en la invención.

En una modalidad preferida, la tecnología inventiva puede incluir sistemas, métodos y composiciones con altos niveles de hidroxilación, acetilación y/o glicosilación de cannabinoides *in vivo* y/o una combinación de los tres. En una modalidad preferida, la hidroxilación, acetilación y/o
 25 glicosilación de cannabinoides *in vivo* y/o una combinación de los tres puede ocurrir en una planta que produce cannabinoides o sistema de cultivo celular. Mientras que modalidades alternativas pueden incluir un sistema de cultivo celular o planta que no produce cannabinoides tal como una planta de tabaco, como *N. benthamiana*.

En una modalidad, la invención puede incluir un sistema de producción, acumulación y
 30 modificación de cannabinoides. En una modalidad preferida, una planta, tal como *cannabis* o tabaco, puede ser genéticamente modificada para expresar uno o más genes de citocromo P450 heterólogos. En esta modalidad preferida, un citocromo P450 humano heterólogo (CYP3A4) SEQ ID NO. 1 se puede expresar en un sistema de cultivo celular o planta que produce cannabinoides. En modalidades alternativas, un citocromo P450 humano heterólogo (CYP3A4) se puede expresar
 35 como un sistema de cultivo celular o planta que no produce cannabinoides tal como una planta de

tabaco, como *N. benthamiana*. En esta modalidad, la sobreexpresión de una proteína de citocromo P450 humano heterólogo, identificado como SEQ ID NO. 2, puede funcionalizar cannabinoides creados de forma endógena para que puedan ser glicosilados y/o acetilados *in vivo* de forma más eficiente, lo cual los vuelve solubles en agua.

5 En una modalidad alternativa, la invención puede incluir un sistema de producción, acumulación y modificación de cannabinoides. En una modalidad preferida, una planta, tal como *cannabis* o tabaco, puede ser genéticamente modificada para expresar uno o más genes de oxidorreductasa de citocromo P450 heterólogos. En esta modalidad preferida, una oxidorreductasa (oxred) de citocromo P450 heterólogo identificada como SEQ ID NO. 3, se puede expresar en una
10 planta que produce cannabinoides o sistema de cultivo celular. En modalidades alternativas, una oxidorreductasa (oxred) de citocromo P450 heterólogo humano se puede expresar como un sistema de cultivo celular o planta que no produce cannabinoides tal como una planta de tabaco, como *N. benthamiana*. En esta modalidad, la sobreexpresión de una proteína de oxidorreductasa (oxred) de citocromo P450 heterólogo, identificado como SEQ ID NO. 4, puede funcionalizar cannabinoides
15 creados de forma endógena para que puedan ser glicosilados más eficientemente y/o acetilados *in vivo*, lo cual los vuelve solubles en agua.

En una modalidad, la invención puede incluir un sistema de producción, acumulación y modificación de cannabinoides en una planta que no produce cannabinoides. En una modalidad preferida, una planta, tal como tabaco, puede ser genéticamente modificada para expresar uno o
20 más genes de oxidorreductasa de citocromo P450 heterólogos. En esta modalidad preferida, una oxidorreductasa (oxred) de citocromo P450 heterólogo identificada como SEQ ID NO. 3, se puede expresar en una planta que produce cannabinoides o sistema de cultivo celular. En modalidades alternativas, una oxidorreductasa (oxred) de citocromo P450 heterólogo se puede expresar como un sistema de cultivo celular o planta que no produce cannabinoides tal como una planta de tabaco,
25 como *N. benthamiana*. En esta modalidad, la sobreexpresión de una proteína de oxidorreductasa (oxred) de citocromo P450 heterólogo, identificado como SEQ ID NO. 4, puede ayudar a funcionalizar cannabinoides introducidos a la planta modificada genéticamente o sistema de cultivo de células de plantas para que puedan ser glicosilados y/o acetilados más eficientemente, *in vivo*, lo cual los vuelve solubles en agua.

30 En una modalidad preferida, el citocromo 450 y oxidorreductasa P450 están expresadas conjuntamente.

En otra modalidad, la invención puede incluir la expresión de uno o más exógenos o heterólogos, los términos que generalmente son intercambiables, el gen de sintasa de cannabinoide en una planta que no produce cannabinoides o sistema de cultivo planta-célula. En una modalidad
35 preferida, tal gen puede incluir uno o más genes de sintasa de CBG, THCA, CBDA o CBCA. Por

ejemplo, en una modalidad, una sintasa de ácido Cannabidiólico (CBDA), identificada como SEQ ID NO. 5 (gen) o SEQ ID NO. 6 (proteína) de *Cannabis sativa* se puede usar de forma expresa en una planta que no produce cannabis, tal como el cultivo de suspensión de planta-célula de *N. benthamiana*. En otra modalidad preferida, una sintasa de ácido Tetrahidrocannabinólico (THCA),
 5 identificada como SEQ ID NO. 42 (gen) de *Cannabis sativa* se puede usar de forma expresa en una planta que no produce cannabis, tal como un cultivo de suspensión de células de plantas de *N. benthamiana*.

En otra modalidad preferida, tales genes de sintasa de cannabinoides expresados en un cultivo de suspensión de planta-célula o planta cannabinoide y/o no cannabinoide o pueden ser
 10 objetivo o localizados en determinadas partes de una célula. Por ejemplo, en una modalidad preferida, la producción de cannabinoides se puede ubicar en el citosol lo cual permite que los cannabinoides se acumulen en el citoplasma. En una modalidad de ejemplo, se puede generar una proteína sintasa de cannabinoides modificados de forma artificial. En esta modalidad de ejemplo, puede que la secuencia que se dirige a tricoma haya sido quitada de una sintasa de CBDA lo cual
 15 forma una sintasa de CBDA citosólica (cytCBDAs) identificada como la SEQ ID NO. 22, (gen) o 23 (proteína). Las modalidades alternativas incluirían la generación de otros genes de sintasa dirigidas a citosol artificial, tal como sintasa de THCA (cytTHCAs) citosólica identificada como la SEQ ID NO. 46 (gen).

Estas modalidades preferidas pueden ser particularmente adecuadas para los sistemas de
 20 expresión de cannabinoides de cultivos de suspensión de células cannabinoides, dado que tales sistemas de cultivo no tienen los tricomas presentes en plantas enteras. Como tal, en una modalidad preferida, una planta que produce cannabinoides se puede transformar en uno o más de los genes de sintasa de cannabinoides dirigidos a citosólicos artificiales a los que le falta una señal que se dirige a tricoma. En una modalidad alternativa, tales genes de sintasa de cannabinoides dirigidos a
 25 citosólicos artificiales se pueden expresar en un cultivo de suspensión de plantas que producen cannabinoides donde el gen de sintasa de tipo salvaje endógeno correspondiente ha sido inhibido y/o inactivado.

En una modalidad, la invención puede incluir un sistema de producción, acumulación y modificación de cannabinoides que puede generar cannabinoides solubles en agua. En una
 30 modalidad preferida, una planta, tal como *cannabis* o tabaco, puede ser genéticamente modificada para expresar uno o más genes de glucosiltransferasa heterólogos, tal como glucosiltransferasa de UDP. En esta modalidad preferida, la glucosiltransferasa de UDP (76G1) (SEQ ID NO. 7) (gen) / SEQ ID NO. 8 (proteína) de *Stevia rebaudiana* se puede expresar en un cultivo de suspensión celular o planta que produce cannabinoides. En una modalidad preferida, el cultivo celular de suspensión
 35 celular o la planta que produce cannabinoides puede ser *Cannabis*. En otra modalidad, una o más

glucosiltransferasas de *Nicotiana tabacum* y/o una glucosiltransferasa homóloga de *Nicotiana benthamiana*, se puede expresar en una planta que produce cannabinoides, tal como cannabis, o puede estar sobreexpresado en una planta endógena y/o sistema de cultivo de células de plantas. En una modalidad preferida, un gen de glucosiltransferasa y/o proteína se puede seleccionar de la planta de ejemplo, tal como *Nicotiana tabacum*. Tal proteína y/o gen de glucosiltransferasa y/o proteína puede incluir, de modo no taxativo: Glucosiltransferasa (NtGT5a) de *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO. 26) (Aminoácido); Glucosiltransferasa (NtGT5a) de *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO. 27) (ADN); Glucosiltransferasa (NtGT5b) de *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO. 28) (aminoácido); Glucosiltransferasa (NtGT5b) de *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO. 29) (ADN); UDP-glucosiltransferasa 73C3 (NtGT4) de *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO. 30) (Aminoácido); UDP-glucosiltransferasa 73C3 (NtGT4) de *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO. 31) (ADN); Glucosiltransferasa (NtGT1b) de *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO. 32) (Aminoácido); Glucosiltransferasa (NtGT1b) de *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO. 33) (ADN); Glucosiltransferasa (NtGT1a) de *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO. 34) (Aminoácido); Glucosiltransferasa (NtGT1a) de *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO. 35) (ADN); Glucosiltransferasa (NtGT3) de *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO. 36) (Aminoácido); Glucosiltransferasa (NtGT3) de *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO. 37) (ADN); Glucosiltransferasa (NtGT2) de *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO. 38) (aminoácido); y/o Glucosiltransferasa (NtGT2) de *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO. 39) (ADN). Las secuencias de *Nicotiana tabacum* son a modo de ejemplo solo ya que otras glucosiltransferasas de tabaco se pueden usar.

Tal como se menciona anteriormente, tales glicosiltransferasas pueden glicosilar los cannabinoides y/o cannabinoides funcionalizados en una planta o cultivo de suspensión de células de plantas tal como se describe generalmente en la presente. Naturalmente, otros genes de glicosiltransferasa de fuentes alternativas se pueden incluir en la invención actual.

Tal como se menciona anteriormente, en una modalidad, una o más glucosiltransferasas se pueden seleccionar como objetivo o localizar en una parte de la célula de la planta. Por ejemplo, en esta modalidad preferida, la glicosilación de cannabinoides se puede ubicar en el tricoma lo cual permite que los cannabinoides se acumulen en niveles mayores que de tipo salvaje en esa estructura. En una modalidad de ejemplo, se puede generar una glucosiltransferasa modificada artificialmente. En esta modalidad de ejemplo, una glucosiltransferasa de UDP (76G1) se puede fusionar con una secuencia que se dirige a tricoma en su cola de extremo N. Esta secuencia que se dirige a tricoma puede ser reconocida por la célula y hacer que sea transportada al tricoma. Esta construcción génica artificial se identifica como SEQ ID NO. 19 (gen), o SEQ ID NO. 20 (proteína). En una modalidad, un dominio o secuencia que se dirige a tricoma puede derivar de cualquier cantidad de sintasas. Por ejemplo, en una modalidad un dominio de tricoma de sintasa de THCA (SEQ ID NO. 40) puede estar acoplado con una glucosiltransferasa tal como se descritos en general

anteriormente. Además, en otro ejemplo, un dominio de direccionamiento de tricoma de sintasa de CBDA (SEQ ID NO. 41) puede estar acoplado con una glucosiltransferasa tal como se descritos en general anteriormente.

En otra modalidad, la invención puede incluir una modalidad donde los cannabinoides modificados de forma temporal se pueden excretar de forma pasiva y/o activa a partir de una célula o en una pared celular. En un modelo de ejemplo, un transportador de casete de unión a ATP exógeno (transportadores de ABC o ABCt) u otra estructura molecular similar puede reconocer el grupo funcional de acetilo o de ácido glucurónico o glicosilo (conjugado) en el cannabinoide modificado de forma temporal y transportarlo de forma activa a través de la pared celular/membrana y dentro del medio que lo rodea.

En una modalidad, una planta se puede transformar para expresar un transportador de ABC heterólogo. En esta modalidad, un ABCt puede facilitar el transporte de cannabinoides fuera de las células en cultivos de suspensión, tal como un cultivo de suspensión celular de tabaco o cannabis. En esta modalidad preferida, un transportador multifármaco humano (ABCG2) puede ser expresado en un cultivo de suspensión de células de plantas del mismo respectivamente. ABCG2 es una proteína dirigida a la membrana de plasma y puede adicionalmente ser identificada como la SEQ ID NO. 9 (gen), o 10 (proteína).

Generalmente, una estructura de tricoma, tal como en el *Cannabis* o el tabaco, tendrán muy poco sustrato o nada en absoluto para una enzima de glucosiltransferasa para usar para efectuar la glicosilación. Para resolver este problema, en una modalidad, la invención puede incluir sistemas, métodos y composiciones para aumentar sustratos para glucosiltransferasa, a saber azúcares seleccionados en un tricoma. En una modalidad preferida, la invención puede incluir el objetivo o localización del transporte de azúcar al tricoma. En esta modalidad preferida, un transportador de UDP-glucosa/UDP-galactosa exógena o endógena (UTR1) se puede expresar en una planta que produce tricomas, tal como cannabis o tabaco y similares. En esta modalidad, el transportador de UDP-glucosa/UDP-galactosa (UTR1) se puede modificar para que incluya un dominio y/o secuencia que se dirige al plasma-membrana. Con este dominio objetivo, el transportador de UDP-glucosa/UDP-galactosa (UTR1) puede permitir que la proteína de fusión artificial sea anclada a la membrana plasmática. En esta configuración, los sustratos de azúcar del citosol pueden pasar a través del transportador de UDP-glucosa/UDP-galactosa unido a la membrana plasmática (PM-UTR1) en el tricoma. En esta modalidad, los sustratos para la glucosiltransferasa se pueden ubicar en el tricoma y se deja que se acumulen adicionalmente lo cual permite la glicosilación aumentada de cannabinoides en el tricoma. En un ejemplo, la SEQ ID NO: 21 se identifica como la secuencia del gen de polinucleótido para un transportador de UDP-glucosa/galactosa heterólogo (UTR1) de *Arabidopsis thaliana* que tiene una secuencia objetivo de plasma-membrana que reemplaza una

secuencia que se dirige a tonoplasto. La secuencia que se dirige a la membrana de plasma de esta proteína de fusión de ejemplo puede incluir la siguiente secuencia (ver SEQ ID NO 21) TGCTCCATAATGAACTTAATGTGTGGGTCTACCTGCGCCGCT, o una secuencia que tiene 70-99 % de homología con la secuencia.

5 Cabe destacar que una cantidad de combinaciones y permutaciones de los genes/proteínas descritos en la presente se pueden expresar conjuntamente y de este modo cumplir uno o más de los fines de la presente invención. Tales combinaciones son a modo de ejemplo de modalidades preferidas solamente, y no son taxativos de ninguna forma.

10 En una modalidad, un gen, tal como una sintasa de cannabinoide, o un fragmento de gen que corresponde con, por ejemplo, un dominio de señal se puede inhibir, regular por disminución, alterar o incluso se puede inactivar. Un experto en la técnica reconocerá los varios procesos que pueden lograr esto sin experimentación indebida. En otra modalidad, una inactivación significa la sobreexpresión de un gen endógeno o exógeno modificado en comparación con la versión de tipo salvaje.

15 Por ejemplo, en una modalidad, se pueden generar niveles elevados de glicosilación de cannabinoides al expresar conjuntamente CYP3A4 y CYP oxidorreductasa (citocromo P450 con oxidorreductasa P450) y al menos una glucosiltransferasa endógena en *N. benthamiana*. En otra modalidad, uno o más de los genes endógenos o exógenos se pueden expresar en una planta o cultivo de células de plantas con la expresión conjunta de myb y/o una catalasa. En esta
20 configuración, existe un efecto aditivo de sobreexpresar un factor de transcripción Myb y una catalasa, uno o más de los cuales se pueden seleccionar como objetivo o localizar, en la síntesis de cannabinoides solubles en agua (glicosilados e hidroxilados) en *Cannabis sativa*.

 En determinadas modalidades, los endocannabinoides se pueden funcionalizar y/o acetilar y/o glicosilar tal como se describe generalmente en la presente.

25 Todas las secuencias descritas en la presente incluyen secuencias que tienen entre 70-99 % de homología con la secuencia identificada.

 Los compuestos cannabinoides modificados de la presente invención son útiles para una variedad de aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, los compuestos son útiles para tratar o aliviar síntomas o enfermedades y trastornos que implican los receptores CB1 y CB2, que incluyen la
30 pérdida de apetito, náuseas y vómitos, dolor, esclerosis múltiple y epilepsia. Por ejemplo, se pueden usar para tratar el dolor (es decir, como analgésicos) en una variedad de aplicaciones que incluyen de modo no taxativo el manejo del dolor. En modalidades adicionales, tales compuestos cannabinoides modificados se pueden usar como un supresor del apetito. La modalidad adicional puede incluir administrar los compuestos cannabinoides modificados.

35 Al “tratar” los inventores de la presente significa que el compuesto se administra para aliviar

síntomas de la enfermedad o trastorno que se trata. Los expertos en la técnica reconocerán que los síntomas de la enfermedad o trastorno que se trata pueden ser completamente eliminados, o pueden simplemente ser disminuidos. Además, los compuestos se pueden administrar en combinación con otros fármacos o modalidades de tratamiento, tal como con quimioterapia u otros fármacos que luchan contra el cáncer.

La implementación puede generalmente implicar identificar pacientes que padecen de los trastornos indicados y administrar los compuestos de la presente invención en una forma aceptable mediante una vía apropiada. La dosificación exacta a ser administrada puede variar dependiendo de la edad, género, peso y estado de salud en general del paciente individual, así como la etiología precisa de la enfermedad. Sin embargo, en general, para la administración en mamíferos (por ejemplo, humanos), las dosificaciones en el intervalo de desde alrededor de 0.1 a alrededor de 30 mg de compuesto por kg de peso corporal por 24 hr., y más preferentemente alrededor de 0.1 a alrededor de 10 mg de compuesto por kg de peso corporal por 24 hr., son eficaces.

La administración puede ser oral o parenteral, que incluye por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, mediante inyección intradérmica, inyección intraperitoneal, etc., o mediante otras vías (por ejemplo, transdérmica, sublingual, oral, rectal y bucal, inhalación de un aerosol, etc.). En una modalidad preferida de la invención, los análogos de cannabinoides solubles en agua se proporcionan oral o intravenosamente.

En particular, los ésteres fenólicos de la invención (Fórmula 1) se administran preferentemente de forma sistémica para proporcionar una oportunidad para la activación metabólica mediante escisión *in vivo* del éster. Además, los compuestos solubles en agua con restos de azol en la cadena lateral de pentilo (Fórmula 2, por ejemplo, con restos de imidazol) no requieren activación *in vivo* y pueden ser adecuados para la administración directa (por ejemplo, inyección específica al sitio).

Los compuestos se pueden administrar en la forma pura o en una formulación farmacéuticamente aceptable que incluye elíxires, aglutinantes y similares adecuados (generalmente referidos como “portadores”) o como sales farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, sales de metal alcalino tales como sodio, potasio, calcio o sales de litio, amonio, etc.) u otros complejos. Se debe entender que las formulaciones farmacéuticamente aceptables incluyen materiales líquidos y sólidos usados convencionalmente para preparar ambas formas de dosificación inyectables y formas de dosificación sólidas tales como tabletas y cápsulas y formas de dosificación en aerosol. Además, los compuestos se pueden formular con vehículos a base de aceite o acuosos. El agua se puede usar como el portador para la preparación de composiciones (por ejemplo, composiciones inyectables), que pueden también incluir amortiguadores convencionales y agentes para volver la composición isotónica. Otros aditivos potenciales y otros materiales (preferentemente

aquellos que generalmente son vistos como seguros [GRAS]) incluyen: colorantes; saborizantes; tensioactivos (TWEEN, ácido oleico, etc.); solventes, estabilizadores, elíxires, y aglutinantes o encapsulantes (lactosa, liposomas, etc). Los excipientes y diluyentes sólidos incluyen lactosa, almidón, agentes desintegrantes convencionales, recubrimientos y similares. Conservantes tales como parabeno de metilo o cloruro de benzalconio también se pueden usar. Dependiendo de la formulación, se espera que la composición activa consistirá en alrededor de 1 % a alrededor de 99 % de la composición y el “portador” vehicular constituirá alrededor de 1 % a alrededor de 99 % de la composición. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir cualesquiera aditivos o adjuntos farmacéuticamente aceptables en la medida que no perjudiquen o interfieran con el efecto terapéutico del compuesto activo.

La administración de los compuestos de la presente invención puede ser intermitente, dosis de bolo, o en una velocidad gradual o continua, constante o controlada a un paciente. Además, el momento del día y la cantidad de veces por día que la formulación farmacéutica es administrada puede variar son mejor determinadas por un experto tal como un médico. Además, la dosis eficaz puede variar dependiendo de los factores tales como el modo de administración, género, edad y otras condiciones del paciente, así como el alcance o evolución de la enfermedad. Los compuestos se pueden proporcionar solos, en una mezcla que contiene dos o más de los compuestos, o en combinación con otros medicamentos o modalidades de tratamiento. Los compuestos también se pueden agregar a la sangre ex vivo y luego se proporcionan al paciente.

Los genes que se codifican mediante un polinucleótido de combinación y/o un homólogo de este, se pueden introducir en una planta, y/o célula de planta mediante el uso de varios tipos de enfoques de transformación desarrollados para la generación de plantas transgénicas. Las técnicas de transformación estándar, tal como la transformación mediada por *Agrobacterium* de plásmido Ti, bombardeo de partículas, microinyección y electroporación se pueden usar para construir plantas transgénicas transformadas de forma estable.

Tal como se usa en la presente, un “cannabinoide” es un compuesto químico (tal como cannabinal, THC o cannabidiol) que se encuentra en las especies de plantas *Cannabis* entre otras como *Equinácea*; *Acmella Oleracea*; *Helichrysum Umbraculigerum*; *Radula Marginata* (hepática) y *Theobroma Cacao*, y metabolitos y análogos sintéticos de estos que pueden o no tener propiedades psicoactivas. Los cannabinoides por lo tanto incluyen (de modo no taxativo) compuestos (tal como THC) que tienen afinidad elevada para el receptor cannabinoide (por ejemplo $K_i < 250$ nM), y compuestos que no tienen afinidad considerable respecto al receptor cannabinoide (tal como cannabidiol, CBD). Los cannabinoides también incluyen compuestos que tienen una estructura de anillo de dibenzopirano característica (del tipo visto en THC) y cannabinoides que no poseen un anillo de pirano (tal como cannabidiol). Por lo tanto, una lista parcial de cannabinoides incluye THC,

CBD, cannabidiol de dimetilheptilpentilo (DMHP-CBD), 6,12-dihidro-6-hidroxi-cannabidiol (descrita en la patente estadounidense n.º 5,227,537, incorporada mediante esta referencia); homólogos y derivados de (3S,4R)-7-hidroxi- Δ^6 -tetrahidrocannabinol descritos en la patente estadounidense n.º 4,876,276, incorporado mediante referencia; (+)-4-[4-DMH-2,6-diacetoxi-fenil]-2-carboxi-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-en, y otros derivados de 4-fenilpineno descritos en la patente estadounidense n.º 5,434,295, que se incorpora mediante referencia; y análogos de cannabidiol (-)(CBD) tales como (-)CBD-monometiléter, (-)CBD dimetil éter; (-)CBD diacetato ; (-)3'-acetil-CBD monoacetato; y $\pm$ AF11, todos los cuales se describen en Consroe et ál., J. Clin. Pharmacol. 21:428S-436S, 1981, que también se incorpora mediante esta referencia. Muchos otros cannabinoides se describen de manera similar en Agurell et ál., Pharmacol. Rev. 38:31-43, 1986, que también está incorporada mediante esta referencia.

Tal como se reivindica en la presente, el término "cannabinoides" también puede incluir diferentes formas modificadas de un cannabinoide tal como un cannabinoide hidroxilado o ácido carboxílico de cannabinoide. Por ejemplo, si una glicosiltransferasa fuera capaz de glicosilar un cannabinoide, sería incluir el término cannabinoide tal como se define en otra parte, así como las formas modificadas antemencionadas. Puede incluir adicionalmente múltiples restos de glicosilación.

Ejemplos de cannabinoides son tetrahidrocannabinol, cannabidiol, cannabigerol, cannabicromeno, cannabiciolol, cannabivarina, cannabielsoin, cannabicitrán, ácido cannabigerólico, monometiléter de ácido cannabigerólico , monometiléter de cannabigerol, ácido cannabigerovarínico, cannabigerovarina, ácido cannabicroménico, ácido cannabicromevarínico, cannabicromevarina, ácido cannabidólico, cannabidiol monometiléter, cannabidiol-C4, ácido cannabidivarínico, cannabidiorcol, ácido delta-9-tetrahidrocannabinólico A, ácido delta-9-tetrahidrocannabinólico B, ácido delta-9-tetrahidrocannabinólico-C4, ácido delta-9-tetrahidrocannabivarínico, delta-9-tetrahidrocannabivarina, ácido delta-9- tetrahidrocannabiorcólico, delta-9-tetrahidrocannabiorcol, delta-7-cis-iso- tetrahidrocannabivarina, ácido delta-8-tetrahidrocannabiniólico, delta-8- tetrahidrocannabinol, ácido cannabiciclólico, cannabicilovarina, ácido cannabielsoico A, ácido cannabielsoico B, ácido cannabinólico, metiléter de cannabinol, cannabinol-C4, cannabinol-C2, cannabiorcol, 10-etoxi-9-hidroxi-delta-6a-tetrahidrocannabinol, 8,9-dihidroxi-delta-6a-tetrahidrocannabinol, cannabitriolvarin, etoxi- cannabitriolvarina, dehidrocannabifurano, cannabifurano, cannabicromeno, cannabicitrán, 10-oxo-delta-6a-tetrahidrocannabinol, delta-9-cis- tetrahidrocannabinol, 3, 4, 5, 6-tetrahidro-7-hidroxi-alfa-alfa-2-trimetil-9-n- propil-2, 6-metano-2H-1 -benzoxocin-5-metanol-cannabiripsol, trihidroxi-delta- 9-tetrahidrocannabinol, y cannabinol. Los ejemplos de cannabinoides dentro del contexto de la presente descripción incluye tetrahidrocannabinol y cannabidiol.

El término "endocannabinoides" se refiere a compuestos que incluyen araquidonoil etanolamida (anandamida, AEA), 2-araquidonoil etanolamida (2-AG), 1-araquidonoil etanolamida (1-AG), y docosahexaenoil etanolamida (DHEA, sinaptamida), oleoil etanolamida (OEA), eicsapentaenoil etanolamida, prostaglandina etanolamida, docosahexaenoil etanolamida, linolenoil etanolamida, 5(Z),8(Z),11(Z)- ácido eicosatrienoico etanolamida (ácido de aguamiel etanolamida), heptadecanol etanolamida, estearoil etanolamida, docosanoil etanolamida, nervonoil etanolamida, tricosanoil etanolamida, lignoceroil etanolamida, miristoil etanolamida, pentadecanoil etanolamida, palmitoleoil etanolamida, ácido docosahexaenoico (DHA). Los endocannabinoides particularmente preferidos son AEA, 2-AG, 1-AG, y DHEA.

La hidroxilación es un proceso químico que introduce un grupo hidroxilo (-OH) en un compuesto orgánico. La acetilación es una reacción química que agrega un grupo químico de acetilo. La glicosilación es el acoplamiento de un donante de glicosilo, a un aceptor de glicosilo que forma un glucósido.

El término "profármaco" se refiere a un precursor de un agente farmacéutico biológicamente activo (fármaco). Los profármacos deben ser sometidos a conversión química o metabólica para volverse un agente farmacéutico biológicamente activo. Un profármaco se puede convertir ex vivo en el agente farmacéutico biológicamente activo mediante procesos transformativos químicos. In vivo, un profármaco se convierte en el agente farmacéutico biológicamente activo mediante la acción de un proceso metabólico, un proceso enzimático o un proceso de degradación que quita el resto de profármaco para formar el agente farmacéutico biológicamente activo.

Tal como se utiliza en la presente, el término "homólogo" con respecto a una secuencia de ácido nucleico contigua, hace referencia a secuencias de nucleótidos contiguas que hibridan en condiciones apropiadas con la secuencia de ácido nucleico de referencia. Por ejemplo, las secuencias homólogas pueden tener de alrededor de 70 %-100, o más generalmente 80 % a 100 % identidad de secuencia, tal como alrededor de 81 %, alrededor de 82 %, alrededor de 83 %, alrededor de 84 %, alrededor de 85%, alrededor de 86 %, alrededor de 87%, alrededor de 88 %, alrededor de 89 %, alrededor de 90 %, alrededor de 91 %, alrededor de 92 %, alrededor de 93 %, alrededor de 94 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 98.5 %, alrededor de 99 %, alrededor de 99.5 % y alrededor de 100 %. La propiedad de homología sustancial está íntimamente relacionada con la hibridación específica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede hibridar específicamente cuando existe un grado suficiente de complementariedad como para evitar la unión no específica del ácido nucleico a las secuencias no objetivo en condiciones en las que se desea la unión específica, por ejemplo, en condiciones de hibridación rigurosas.

La expresión "unidos de forma operativa", cuando se utiliza al hacer referencia a una

secuencia reguladora y a una secuencia de codificación, significa que la secuencia reguladora afecta la expresión de la secuencia de codificación unida. Las "secuencias reguladoras" o "elementos de control" hacen referencia a secuencias de nucleótidos que influyen en el momento y el nivel/cantidad de transcripción, procesamiento de ARN o estabilidad, o traducción de la secuencia de codificación asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líderes de traducción, intrones, potenciadores, estructuras tallo-bucle, secuencias de unión al represor, secuencias de terminación, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, etc. Las secuencias reguladoras particulares se pueden ubicar antes y/o después de una secuencia de codificación unida de forma operativa a estas. Además, las secuencias reguladoras particulares unidas de forma operativa a una secuencia de codificación se pueden ubicar en la cadena complementaria asociada de una molécula de ácido nucleico de cadena doble.

Tal como se usa en la presente, el término "promotor" se refiere a una región de ADN que puede ser corriente arriba del inicio de transcripción, y que puede estar implicado en el reconocimiento y unión de polimerasa de ARN y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un promotor puede estar unido de forma operativa a una secuencia de codificación para la expresión en una célula, o un promotor puede estar unido de forma operativa a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de señal que puede estar unida de forma operativa a una secuencia de codificación para la expresión en una célula. Un "promotor de planta" puede ser un promotor capaz de iniciar la transcripción en las células de plantas. Ejemplos de promotores bajo control de desarrollo incluyen promotores que preferentemente inician la transcripción en determinados tejidos, tal como hojas, raíces, semillas, fibras, vasos de xilema, traqueidas o esclerénquima. Tales promotores son referidos como "preferidos por tejido". Los promotores que inician la transcripción solo en determinados tejidos son referidos como "específicos al tejido". Un promotor "específico al tipo de célula" principalmente impulsa la expresión en determinados tipos de células en uno o más órganos, por ejemplo, células vasculares en raíces u hojas. Un promotor "inducible" puede ser un promotor que puede estar bajo control medioambiental. Ejemplos de condiciones medioambientales que pueden iniciar la transcripción mediante promotores inducibles incluyen condiciones anaeróbicas y la presencia de luz. Los promotores específicos al tejido, preferidos por tejido, específicos al tipo de célula, e inducibles constituyen la clase de promotores "no constitutivos". Un promotor "constitutivo" es un promotor que puede estar activo en condiciones medioambientales o en la mayoría de los tipos de tejido o célula.

Se puede usar cualquier promotor inducible en algunas modalidades de la invención. Ver Ward et ál. (1993) Plant Mol. Biol. 22:361-366. Con un promotor inducible, la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. Los promotores inducibles de ejemplo incluyen, de modo no taxativo: Los promotores del sistema de ACEI que responde al cobre; gen In2 del maíz que

responde a los protectores de herbicidas de bencenesulfonamida; represor de Tet de Tn10; y el promotor inducible de un gen de hormonas esteroides, la actividad transcripcional de la cual puede ser inducida mediante una hormona glucocorticoide son ejemplos generales (Schena et ál. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:0421).

5 Tal como se usa en la presente, el término “transformación” o “modificado genéticamente” se refiere a la transferencia de una o más moléculas de ácido nucleico en una célula. Una planta se “transforma” o “modifica genéticamente” mediante una molécula de ácido nucleico que se transduce en la planta cuando la molécula de ácido nucleico es duplicada de forma estable por la planta. Tal como se usa en la presente, el término “transformación” o “modificado genéticamente” abarca todas
10 las técnicas en las que una molécula de ácido nucleico se puede introducir en, por ejemplo, una planta.

El término “vector” se refiere a algunos medios por los que el ADN, ARN, una proteína o polipéptido se puede introducir en un hospedador. Los polinucleótidos, proteínas, y polipéptidos que se introducen en un hospedador pueden ser terapéuticos o profilácticos por naturaleza; pueden
15 codificar o ser un antígeno; puede ser reguladores por naturaleza, etc. Existen varios tipos de vectores que incluyen virus, plásmido, bacteriófago, cósmidos y bacteria.

Tal como se conoce en la técnica, diferentes organismos preferentemente usan diferentes codones para generar polipéptidos. Tales preferencias de “uso de codones” se puede usar en el diseño de moléculas de ácido nucleico que codifica las proteínas y quimeras de la invención para
20 optimizar la expresión en un sistema de célula hospedadora particular.

Un “vector de expresión” es un ácido nucleico capaz de duplicarse en un organismo o célula hospedadora seleccionada. Un vector de expresión puede duplicarse como una estructura autónoma, o alternativamente puede integrarse, en totalidad o en parte, en los cromosomas de célula hospedadora o los ácidos nucleicos de un organelo, o se usa como un transporte para
25 administrar ADN foráneo a células, y por lo tanto duplicarse junto con el genoma de la célula hospedadora. Por lo tanto, un vector de expresión son polinucleótidos capaces de duplicarse en una célula hospedadora seleccionada, organelo u organismo, por ejemplo, un plásmido, virus, cromosoma artificial, fragmento de ácido nucleico, y para el cual determinados genes en el vector de expresión (que incluye genes de interés) se transcriben y traducen en un polipéptido o proteína
30 dentro de la célula, organelo u organismo; o cualquier construcción adecuada conocida en la técnica, que comprende un “casetes de expresión”. Por el contrario, tal como se describe en los ejemplos en la presente, un “casete” es un polinucleótido que contiene una sección de un vector de expresión de la presente invención. El uso de casetes ayuda en el ensamblaje de los vectores de expresión. Un vector de expresión es un replicón, tal como plásmido, fago, virus, virus quimérico o cósmido, y que
35 contiene la secuencia de polinucleótido deseada unida de forma operativa a la o las secuencias de

control de expresión.

Una secuencia de polinucleótidos está unida de forma operativa a una secuencia de control de expresión (por ejemplo, un promotor y, opcionalmente, un potenciador) cuando la secuencia de control de expresión controla y regula la transcripción y/o traducción de esa secuencia de polinucleótidos.

A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico en particular también abarca de manera implícita las variantes modificadas de manera conservadora de esta (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), la secuencia complementaria (o de complemento), así como también la secuencia indicada de manera explícita. En específico, las sustituciones de codones redundantes pueden lograrse mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxinosina (ver, por ejemplo, Batzer et ál., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et ál., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); y Rossolini et ál., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). Debido a la degeneración de los codones de ácido nucleico, uno puede usar varios diferentes polinucleótidos para codificar polipéptidos idénticos. La Tabla 1a, infra, contiene información sobre qué codones de ácido nucleico codifican a qué aminoácidos.

TABLA 4 Codones de ácido nucleico aminoácido

Aminoácido	Codones de ácido nucleico
Ala/A	GCT, GCC, GCA, GCG
Arg/R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Asn/N	AAT, AAC
Asp/D	GAT, GAC
Cys/C	TGT, TGC
Gln/Q	CAA, CAG
Glu/E	GAA, GAG
Gly/G	GGT, GGC, GGA, GGG
His/H	CAT, CAC
Ile/I	ATT, ATC, ATA
Leu/L	TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG
Lys/K	AAA, AAG
Met/M	ATG
Phe/F	TTT, TTC
Pro/P	CCT, CCC, CCA, CCG
Ser/S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC

Thr/T	ACT, ACC, ACA, ACG
Trp/W	TGG
Tyr/Y	TAT, TAC
Val/V	GTT, GTC, GTA, GTG

El término “planta” o “sistema de plantas” incluye plantas enteras, órganos de plantas, progenie de plantas enteras u órganos de plantas, embriones, embriones somáticos, estructuras tipo embriones, protocormos, cuerpos tipo protocormo (PLB) y cultivo y/o suspensiones de células de plantas. Los órganos de plantas comprenden, por ejemplo, estructuras y/u órganos vegetativos del brote (por ejemplo, hojas, tallos y tubérculos), raíces, flores y estructuras/órganos florales (por ejemplo, brácteas, sépalos, pétalos, estambres, carpelos, anteras y óvulos), semillas (que incluye el embrión, endosperma y recubrimiento de la semilla) y fruta (el ovario maduro), tejido de plantas (por ejemplo, tejido vascular, tejido molido y similares) y células (por ejemplo, célula oclusiva, óvulos, tricomas y similares). La invención puede también incluir Cannabaceae y otras cepas de *Cannabis*, tales como *C. sativa* generalmente.

El término “expresión”, tal como se usa en la presente, o “expresión de una secuencia de codificación” (por ejemplo, un gen o un transgén) se refiere al proceso mediante el cual la información codificada de una unidad transcripcional de ácido nucleico (que incluye, por ejemplo, ADN genómico o ADNc) se convierte en una parte operacional, no operacional o estructural de una célula, a menudo que incluye la síntesis de una proteína. La expresión génica puede ser influenciada por señales externas; por ejemplo, la exposición de una célula, tejido u organismo a un agente que aumenta o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen también se puede regular en cualquier lugar en el camino del ADN al ARN a la proteína. La regulación de la expresión génica ocurre, por ejemplo, a través de controles que actúan en la transcripción, traducción, transporte del ARN y procesamiento, degradación de moléculas intermediarias, tales como ARNm o mediante la activación, inactivación, compartimentalización o degradación de moléculas de proteínas específicas luego que se han sido realizadas o mediante combinaciones de estos. La expresión génica se puede medir a nivel del ARN o a nivel de la proteína mediante cualquier método conocido en el técnica, lo que incluye, de modo no taxativo, transferencia Northern, RT-PCR, transferencia Western, o ensayo/s de actividad de proteínas *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*.

El término “ácido nucleico” o “moléculas de ácido nucleico” incluyen formas de cadena simple o cadena doble de ADN; formas de cadena simple de ARN; y formas de cadena doble de ARN (ARNcd). El término “secuencia de nucleótidos” o “secuencia de ácido nucleico” se refiere a las cadenas sentido y antisentido de un ácido nucleico como ya sea cadenas simples individuales o en el dúplex. El término “ácido ribonucleico” (ARN) es inclusivo ARNi (ARN inhibidor), ARNcd (ARN de

cadena doble), ARNip (ARN interferente pequeño), ARNm (ARN mensajero), miARN (micro ARN), ARNh (ARN horquilla), ARNt (ARN de transferencia), esté cargado o descargado con un aminoácido acilado correspondiente), y ARNc (ARN complementario). El término “ácido desoxirribonucleico” (ADN) es inclusivo de ADNc, ADN genómico y de híbridos de ADN-ARN. Los términos “segmento de ácido nucleico” y “segmento de secuencia de nucleótidos”, o más generalmente “segmento”, serán entendidos por los expertos en la técnica como un término funcional que incluye ambas secuencias genómicas, secuencias de ARN ribosómico, secuencias de ARN de transferencia, secuencias de ARN mensajero, secuencias de operón, y secuencias de nucleótidos modificados genéticamente más pequeños que se pueden codificar o se pueden adaptar para codificar péptidos, polipéptidos o proteínas.

El término “gen” o “secuencia” se refiere a una región de codificación unida de forma operativa a secuencias reguladoras apropiadas capaces de regular la expresión del producto génico (por ejemplo, un polipéptido o un ARN funcional) en alguna manera. Un gen incluye regiones reguladoras no traducidas de ADN (por ejemplo, promotores, potenciadores, represores, etc.) que preceden (posición anterior) y (posición posterior) la región de codificación (marco de lectura abierto, ORF) así como, donde es aplicable, secuencias intervinientes (es decir, intrones) entre las regiones codificantes individuales (es decir, exones). El término “gen estructural” tal como se usa en la presente pretende significar una secuencia de ADN que se transcribe en ARNm que luego se traduce en una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico.

Una molécula de ácido nucleico puede incluir tanto nucleótidos de origen natural como modificados, unidos entre sí por enlaces de nucleótidos de origen natural o de origen no natural. Las moléculas de ácido nucleico se pueden modificar químicamente o bioquímicamente, o pueden contener bases de nucleótidos derivatizados o no naturales, como lo podrán apreciar fácilmente los expertos en el técnica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones de internucleótidos (por ejemplo, enlaces no cargados: por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.; enlaces cargados: por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.; restos pendientes: por ejemplo, péptidos; intercaladores: por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.; quelantes; alquilantes y enlaces modificados: por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). El término “molécula de ácido nucleico” también incluye cualquier conformación topológica, lo que incluye, conformaciones de cadena simple, cadena doble, parcialmente doble, triple, de horquillas, circulares y con candado.

Tal como se usa en la presente con respecto al ADN, el término “secuencia de codificación”, “secuencia de nucleótidos estructural” o “molécula de ácido nucleico estructural” se refiere a una secuencia de nucleótidos que es en última instancia traducida en un polipéptido, mediante

transcripción y ARNm, cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Con respecto al ARN, el término “secuencia de codificación” se refiere a una secuencia de nucleótidos que se traduce en un péptido, polipéptido o proteína. Los límites de una secuencia de codificación están determinados por un codón de inicio de la traducción en el extremo 5' y un codón de detención de la traducción en el extremo 3'. Las secuencias de codificación incluyen, de modo no taxativo:

ADN genómico; ADNc; EST; y secuencias de nucleótidos recombinantes.

El término “identidad de secuencia” o “identidad” tal como se utiliza en la presente en el contexto de dos ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, hace referencia a los residuos en las dos secuencias que son idénticas cuando se alinean para obtener la máxima correspondencia en una ventana de comparación especificada.

El término “recombinante”, cuando se utiliza con referencia a, por ejemplo, una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, organismo, ácido nucleico, proteína o vector ha sido modificado mediante la introducción de una proteína o ácido nucleico heterólogo, o mediante la alteración de una proteína o ácido nucleico natural, o que la célula deriva de una célula modificada de este modo. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes pueden expresar genes que no se encuentran dentro de la forma natural (no recombinante o de tipo salvaje) de la célula o expresan genes naturales que de lo contrario se expresan/sobreexpresan de forma anómala, se subexpresan o no se expresan en lo absoluto.

Los términos “aproximadamente” y “alrededor de” se refieren a una cantidad, nivel, valor o cantidad que varía en tanto como 30 %, o en otra modalidad en tanto como 20 %, y en una tercera modalidad en tanto como 10 % respecto a una cantidad, nivel, valor o monto de referencia. Tal como se utilizan en la presente, las formas singulares “un”, “una”, “el/la” incluyen las referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se utiliza en la presente, “heterólogo” o “exógeno” con referencia a un ácido nucleico es un ácido nucleico que se origina a partir de una especie diferente o, se diseña sintéticamente, o, si es de la misma especie, se modifica sustancialmente de su forma nativa en la composición y/o locus genómico mediante intervención humana deliberada. Una proteína heteróloga puede originarse de una especie externa o, si es de la misma especie, es modificada sustancialmente de su forma original mediante intervención humana deliberada. “Célula hospedadora” significa una célula que contiene una construcción de ácido nucleico introducida y soporta el duplicado y/o expresión de la construcción. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas tal como *E. Coli*, o células eucariotas tal como células de hongos, levaduras, insectos, anfibios, nemátodos o de mamíferos. De manera alternativa, las células hospedadoras son monocotiledóneas o células de plantas dicotiledóneas. Un ejemplo de una célula hospedadora monocotiledónea es una célula hospedadora de maíz.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Funcionalización de cannabinoides mediante citocromos P450.

Los inventores de la presente han demostrado que los cannabinoides se pueden funcionalizar en un sistema de plantas *in vivo*. Específicamente, los inventores de la presente usaron monoxigenasas de citocromo P450 (CYP) para modificar o funcionalizar la estructura química de los cannabinoides. Tal como se muestra debajo, los CYP hacen esto al insertar un átomo de oxígeno en moléculas hidrofóbicas para hacerlas más reactivas e hidrofílicas. Una reacción representativa puede incluir la reacción generalizada en la Fig. 13.

El sistema de enzima P450 implica varias especies de citocromo P450 y oxidorreductasas de citocromo P450 no específico. Tal como se muestra en la Fig. 5, los inventores de la presente usaron un citocromo P450 humano (CYP3A4) en una construcción doble con una oxidorreductasa de citocromo P450 humano de ejemplo, ambos expresados bajo el control del promotor 35S de CaMV constitutivo con regiones no traducidas 5' para mejorar la traducción. Las secuencias de ADN y proteína para la funcionalización de cannabinoides (oxidorreductasa P450 y CYP3A4) son identificados como las SEQ ID NO. 1-4. La expresión se confirmó usando RT-PCR que utiliza los cebadores directos e inversos identificados en la Tabla 3 más adelante. Tal como se menciona anteriormente, los inventores de la presente demostraron que la sobreexpresión de P450 generó cannabinoides funcionalizados que luego podrían ser glicosilados, lo cual los vuelve solubles en agua.

Ejemplo 2: La sobreexpresión de P450 mejora la hidroxilación *in vivo* y la glicosilación de cannabinoides en los sistemas de plantas.

Los inventores de la presente han demostrado que la sobreexpresión mejoró la hidroxilación *in vivo* y la glicosilación de CBDA en un sistema de plantas de ejemplo. Específicamente, tal como se muestra generalmente en la Fig.6, los inventores de la presente demuestran que la infiltración de hojas de tabaco con *Agrobacterium* que porta oxidorreductasa P450 y CYP3A4 fue logrado tal como se describe en la presente. La confirmación de expresión se realizó usando RT-PCR 2-3 días después de la infiltración (Fig. 6).

Tal como se muestra generalmente en la Fig. 7 los inventores de la presente demuestran que la sobreexpresión de la construcción de oxidorreductasa CYP3A4+P450 y posterior alimentación de al menos un cannabinoide, en este caso CBDA, luego de la confirmación de la expresión tuvo como resultado la glicosilación *in vivo* de CBDA en hojas de tabaco (Fig. 7). En promedio, la glicosilación aumentó 3 veces en plantas *N. benthamiana* transgénicas en comparación con el control mientras que la hidroxilación aumentó hasta 13 veces. Como tal, en determinadas modalidades, las glicosiltransferasas de tabaco se pueden usar como objetivos clave en la tecnología inventiva actual para la glicosilación de cannabinoides.

Ejemplo 3: Identificación de cannabinoides solubles en agua modificados mediante espectrometría de masas.

Los inventores de la presente demostraron la biosíntesis de cannabinoides modificados funcionalizados así como solubles en agua en sistemas de plantas *in vitro* e *in vivo*. Específicamente, los inventores de la presente identificaron las biotransformaciones de cannabinoides asociadas con las construcciones génicas en ambos ensayos *in vitro* y expresión de hojas temporal. A través del uso de mediciones de espectrometría de masas precisa, los inventores de la presente fueron capaces de identificar y confirmar la biosíntesis de cannabinoides solubles en agua modificados.

Específicamente, como se muestra generalmente en las Fig. 1-4, los inventores de la presente fueron capaces de identificar los cannabinoides solubles en agua glicosilados en los análisis cromatográficos y fueron capaces de producir cromatogramas de iones extraídos para integración pico. Por ejemplo, la Fig. 1 panel B, ilustra la identificación de múltiples isómeros de cannabinoides constitucionales de un resto de glucósido individual, mientras que en el panel B de la Fig. 2, se ilustra un ejemplo de múltiples isómeros constitucionales de la oxidación de citocromo P450. Las áreas pico para cada molécula identificada fueron usadas para cuantificación relativa entre tratamientos. Basándose en estos resultados se confirmó que la biosíntesis de moléculas de cannabinoides modificados que contienen hasta dos restos de glucósidos, O-glucósido de acetilo, así como biotransformaciones de hidroxilación (R-OH).

Las Tablas 1 y 2 se proporcionan más adelante que demuestran adicionalmente la producción de las moléculas de cannabinoides modificados seleccionados. Generalmente, con referencia a las Tablas 1-2 más adelante, los inventores de la presente demostraron que basándose en el tiempo de retención reducido en el gradiente de HPLC de agua: acetonitrilo, los cannabinoides glicosilados e hidroxilados, que eluyeron antes que sus formas no modificadas, demostraron ser más solubles en agua que sus formas no modificadas.

Ejemplo 4: Generación de síntesis citosólica heteróloga y construcciones de genes de glicosilación para expresiones en hojas de tabaco y suspensiones celulares.

Tal como se muestra en la Fig. 8, los inventores de la presente generaron una construcción de genes triple para la expresión sintasa de ácido cannabidiólico (CBDA) en la que la secuencia objetivo de tricoma ha sido quitada, y la glicosiltransferasa 76G1 de *Stevia rebaudiana*. En esta construcción el transportador de ABC multi-fármaco ABCG2 también estaba incluido.

En una modalidad de la presente tecnología inventiva, la construcción génica se puede usar para transformar una célula de planta que puede adicionalmente estar configurada para ser cultivada en un cultivo de suspensión. En una modalidad preferida, una célula de cannabis se puede transformar con la construcción generalmente delineada en la Fig. 8. En esta modalidad preferida, los cannabinoides producidos por las células de cannabis en el cultivo celular se pueden

funcionalizar a través de la sobreexpresión de la oxidorreductasa CYP3A4+P450 tal como se describe anteriormente, y se glicosila adicionalmente mediante la expresión y acción de la glicosiltransferasa de UDP heteróloga (76G1) de *Stevia rebaudiana* referida anteriormente. Además, tal como se describe en general en la presente, los cannabinoides se pueden modificar para que sean funcionalizados y/o glicosilados, o generalmente son solubles en agua, y pueden ser secretados en el área de la pared celular, en el caso de una planta entera, o el medio que lo rodea en cultivos de suspensión, con la ayuda del transportador de ABC. En una modalidad, esta construcción se puede usar para la síntesis y modificación de los cannabinoides en cultivos de suspensión celular, usando células amarillas brillante de tabaco o células de cannabis.

Tal como se muestra en general en la Fig. 9, se confirmó la expresión *in vivo* de la sintasa de CBDA, la glicosiltransferasa UDP 76G1 y ABCG2. Los cebadores inversos y directos usados en las reacciones de RT-PCR se proporcionan más adelante en la Tabla 4 más adelante.

Las identificaciones de secuencia de proteínas y genes para la sintasa de CBDA se proporcionan como las SEQ ID NO 5 y 6 respectivamente. Cabe destacar que una variedad de proteínas/genes de sintasa de cannabinoide se pueden usar con la tecnología inventiva actual, siendo la sintasa de CBDA solo a modo de ejemplo. De hecho, se contempla específicamente que la enzima sintasa asociada con cualquiera de los cannabinoides identificados en la presente se pueden incorporar en la invención actual sin experimentación indebida. En una modalidad, una o más de tal enzima de sintasa exógena o endógena puede además hacer que la secuencia objetivo de tricoma se escinda, una vez más una etapa que se puede cumplir fácilmente sin experimentación indebida. Algunos ejemplos pueden ser la sintasa de THCA, sintasa de CBG, sintasa de THCA, sintasa de CBDA o sintasa de CBCA, que puede en la presente modalidad hacer que la secuencia objetivo de tricoma sea quitada.

Las identificaciones de secuencia de proteínas y genes para la glicosiltransferasa 76G1 de *Stevia rebaudiana* se proporcionan como las SEQ ID NO 7 y 8 respectivamente. Las identificaciones de secuencia de proteínas y genes para el transportador de ABC multi-fármaco ABCG2 se proporcionan como las SEQ ID NO 9 y 10 respectivamente.

Ejemplo 5: Síntesis citosólica *in vivo* y glicosilación de cannabinoides en hojas de *N. benthamiana* y suspensiones de células.

Tal como se muestra en la Fig. 10, los inventores de la presente demuestran que en las plantas, en la presente modalidad *N. benthamiana*, que expresan la construcción citosólica referida anteriormente, ocurrió la glicosilación de CBGA así como la formación de CBDA modificada o hidroxilada. La glicosilación de CBGA muestra la glicosilación *in vivo* de cannabinoides al sobreexpresar una glucosiltransferasa en plantas *N. benthamiana*. La presencia de cannabinoides glicosilados en plantas de tipo salvaje sugiere la presencia de una glucosiltransferasa fuerte en el

tabaco. Como tal, en una modalidad, la sobreexpresión de una glucosiltransferasa de tabaco heteróloga u homóloga se puede expresar o sobreexpresar lo cual tiene como resultado la biosíntesis *in vivo* aumentada de cannabinoides soluble en agua en plantas enteras, así como en cultivos de suspensión. Por ejemplo, en una modalidad, una glucosiltransferasa de tabaco heteróloga se puede expresar en una planta de cannabis o cultivo celular que tiene como resultado la biosíntesis *in vivo* de cannabinoides solubles en agua en la planta de *Cannabis* y/o cultivos de suspensión de *Cannabis*.

Ejemplo 6: Sistemas de producción de cannabinoides solubles en agua mediante el uso del factor de transcripción de MTB y/o catalasa.

Los inventores de la presente han desarrollado una pluralidad de sistemas para la biosíntesis y modificación de cannabinoides basándose en la ubicación celular usando métodos novedosos de direccionamiento de la proteína. Tal como se muestra en la Tabla 10, los inventores de la presente diseñaron tales sistemas novedosos y métodos para mejorar la producción y modificación (glicosilación, acetilación y funcionalización) de cannabinoides así como para mitigar la toxicidad que resulta de la acumulación de cannabinoides. Determinadas modalidades incluyeron la expresión de un factor de transcripción MYB y una catalasa (Fig. 27) para degradar el peróxido de hidrógeno que resulta de la actividad de sintasa de CBDA. En una modalidad preferida, los inventores de la presente usaron *Arabidopsis thaliana* o un gen de catalasa de *E. coli* y un factor de transcripción de MYB de *Cannabis* previsto implicado en elevar los genes involucrados en la biosíntesis de cannabinoides. Las secuencias de proteínas y ADN para *Cannabis* predijeron el factor de transcripción MYB (SEQ ID NO. 11-12, ADN y secuencias de aminoácidos respectivamente), catalasa de *Arabidopsis thaliana* SEQ ID NO. 13-14, ADN y secuencias de aminoácidos respectivamente) y/o catalasa de *E. coli* (SEQ ID NO. 15-16, ADN y secuencias de aminoácidos).

Ejemplo 7: Síntesis citosólica *in vivo* aumentada y glicosilación de cannabinoides en hojas de tabaco y suspensiones de células.

Los inventores de la presente han demostrado la modificación *in vivo* mejorada de cannabinoides en plantas transgénicas coinfectadas con construcciones para glicosilación, funcionalización mediada por P450 (hidroxilación) y desintoxicación de peróxido de hidrógeno mediante catalasa. Tal como se muestra adicionalmente en la Fig. 11, la funcionalización y glicosilación, principalmente del sustrato CBGA se observó en las plantas de tabaco transgénicas que sobreexpresan la sintasa de CBDA, la glucosiltransferasa de UDP y el transportador de ABC pero aumentó cuando la sobreexpresión de esta construcción se acopló con el citocromo P450, el factor de transcripción MYB y la catalasa. Tal como se menciona anteriormente, la sobreexpresión de un citocromo P450 aumentó la glicosilación de los cannabinoides. Como tal, el presente inventor demostró la formación y glicosilación de CBDA *in vivo* en hojas de tabaco transformadas de forma

temporal alimentadas con el CBGA precursor.

Los inventores de la presente también compararon las actividades de actividades de la glucosiltransferasa endógena y transgénica en el tabaco. Específicamente, tal como se muestra en la Fig. 12, el inventor de la presente realizó ensayos *in vitro* de glucosiltransferasa de UDP y sintasa de CBDA. Ensayos cortos de 3 horas a 30 °C no revelaron ninguna diferencia en glicosilación de CBGA entre las plantas de *N. benthamiana* de tipo salvaje y transgénicas, lo cual sugiere la glicosilación endógena. En ensayos extendidos (14 horas), hubo una gran diferencia en la detección de CBGA glicosilada en plantas transgénicas en comparación con la de tipo salvaje que demuestra actividad de glicosilación aumentada en plantas transgénicas.

En determinadas modalidades, las glucosiltransferasas del tabaco, u otras plantas se pueden usar tal como se describe en la presente. En una modalidad, una o más glucosiltransferasas heterólogas u homólogas se pueden expresar o sobreexpresar en una planta, tal como tabaco o *Cannabis*. Las secuencias de proteínas y genes para las glucosiltransferasas de ejemplo se identifican más adelante en la Tabla 9.

Ejemplo 8: Generación de síntesis de cannabinoides dirigidos a tricoma y construcciones de glicosilación de ácido cannabidiólico (CBDA).

Tal como se muestra en las Fig. 14-15, los inventores de la presente demostraron un sistema de síntesis dirigidos a tricoma y síntesis y glicosilación de compuestos cannabinoides, tales como CBDA. Al dirigirse la sintasa de CBDA, un transportador de UDP-glucosa/UDP-galactosa (PM-UTR1) dirigido al plasma, y una UDP-glucosiltransferasa 76G1 de *Stevia* (tsUGT) a los tricomas, estos genes pueden producir y acumular, en este caso la CBDA y sus derivados glicosilados (glicósido primario, secundario), así como derivados de CBDA novedosos, en los tricomas.

La SEQ ID NO: 17 se identifica como la secuencia de gen de polinucleótido para una sintasa de CBDA que tiene una secuencia que se dirige a tricoma. La SEQ ID NO: 18 se identifica como la secuencia de proteína correspondiente para una sintasa de CBDA que tiene un dominio que se dirige a tricoma.

La SEQ ID NO: 19 se identifica como la secuencia de gen de polinucleótido para una secuencia de codificación de UDP-glucosiltransferasa (76G1) dirigida a tricoma, en este caso que es optimizada para la expresión de *Arabidopsis thaliana*, aunque otras versiones optimizadas de codones caen dentro del alcance de la presente invención. La SEQ ID NO: 20 se identifica como la secuencia de proteína correspondiente para una UDP-glucosiltransferasa (76G1) que tiene un dominio que se dirige a tricoma.

La SEQ ID NO: 21 se identifica como la secuencia de gen de polinucleótido para un transportador de UDP-glucosa/galactosa (UTR1) que tiene una secuencia que se dirige al plasma-membrana.

Ejemplo 9: Síntesis dirigida a tricoma y glicosilación de ácido cannabidiólico (CBDA).

Tal como se muestra en las Fig. 16-17, la expresión génica de sintasa de CBDA, tsUGT y PM-UTR1 en hojas infiltradas de *N. benthamiana* se confirmó 2DPI [por sus siglas en inglés] (Días Después de la Infiltración de construcciones de plásmido Ti de *Agrobacterium*) mediante RT-PCR (Fig.19 y 20). Tal como se esperaba, el sustrato de CBGA se detectó en todas las hojas infiltradas y el control de tipo salvaje (sin infiltración de *Agrobacterium*). Los glucósidos primarios y secundarios de CBGA también fueron detectados en todas las hojas infiltradas y control de tipo salvaje, que demuestra además una actividad de glucosiltransferasa endógena que actúa sobre CBGA. Además, el glucósido primario acetilado de CBGA se detectó en todas las muestras, que incluyen el control de tipo salvaje que proporciona pruebas de acetilación endógena. CBDA se detectó a niveles marginales en muestras infiltradas con construcciones de suspensión celular y tricoma, pero no en plantas de tipo salvaje.

Ejemplo 10: Síntesis dirigida a citosólicos y glicosilación de ácido cannabidiólico (CBDA).

Los inventores de la presente han demostrado un sistema de síntesis de cannabinoides dirigidos a citosólicos y glicosilación. Al dirigir o localizar la sintasa de CBDA (CBDAs) y UDP-glucosiltransferasa 76G1 (UGT) en el citosol, los inventores de la presente demostraron que las plantas que expresan estos genes heterólogos producen y acumulan, en esta modalidad, CBDA y sus derivados glicosilados (glucósido primario y secundario), así como otros derivados de CBDA, en el citosol. Tal como se muestra en la Fig. 18, se generó un vector de expresión génica para el sistema de producción de cannabinoides citosólicos. Esta construcción incluía un promotor 35S de mosaico de la coliflor; AtADH 5'-UTR, elemento potenciador; cytCBDAs, sintasa de ácido cannabidiólico con la secuencia objetivo de tricoma eliminada; terminador HSP; cytUGT76G1, UDP glucosiltransferasa de *Stevia rebaudiana*.

La SEQ ID NO: 22 se identifica como la secuencia de gen de polinucleótido para una sintasa de ácido cannabidiólico a la que se le ha quitado la secuencia objetivo de tricoma. La SEQ ID NO: 23 se identifica como la secuencia de proteínas correspondiente de cytCBDAs.

La SEQ ID NO: 24 se identifica como la secuencia de gen de polinucleótido para una secuencia de codificación de UDP-glucosiltransferasa dirigida a citosólico (UGT76G1) (optimizada para la expresión de *Arabidopsis thaliana*) (cytUGT76G1 o cytUTG). La SEQ ID NO: 25 se identifica como la secuencia de proteínas correspondiente de cytUGT76G1 o cytUTG.

Como un modelo de planta de ejemplo, las plantas *N. benthamiana* fueron cultivadas desde semillas y después de 4 semanas de crecimiento vegetativo, las hojas fueron infiltradas conjuntamente con *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 que llevaba las siguientes construcciones: CBDAs citosólico + UGT citosólico en pRI201-AN o construcción de suspensión de células, Myb/catalasa en pRI201-AN, y supresor de silenciamiento p19 en pDGB3alpha2. La densidad de

Agrobacterium se normalizó a 2 a absorbancia de 600 nm usando un espectrofotómetro y cultivos infiltrados conjuntamente en la misma relación (1:1:1). Después de 2 y 4 días después de la infiltración de *Agrobacterium* (DPI), CBGA 1 mL (2.7 mM) disuelto en Tween 20 al 0.1 % (Sigma-Aldrich) o Triton X-100 al 0.1 % (Sigma-Aldrich) se infiltró en cada hoja. En una segunda modalidad, mediante el uso de la construcción citosólica, se agregó UDP-glucosa 4 mM al medio de CBGA antes de la alimentación. Se usaron tres replicaciones biológicas. Los cebadores de RT-PCR se detallan en la Tabla 5 más adelante.

Tal como se muestra en las Fig. 19-20, la expresión génica de *cytCBDAs* y *cytUGT* se confirmó mediante RT-PCR después de 1 y 2 DPI. No se observó ninguna expresión de transportador de ABC (ABCt) después de 1 DPI en la construcción de suspensión de células infiltradas en hojas. Esto no impacta este experimento dado que el rol de ABCt era facilitar el transporte de cannabinoides fuera de las células en cultivos celulares. Tal como se muestra en la Fig. 21, CBGA y sus derivados glicosilados y acilados fueron detectados en concentraciones más altas que en las hojas infiltradas de la construcción de tricoma, excepto para los glucósidos secundarios. Además, el CBDA se detectó en concentraciones más altas (hasta 34 ppm) en hojas infiltradas con la construcción de suspensión celular, en comparación con los experimentos de la construcción de tricoma (hasta 2.6 ppm). Tal como se muestra en la Fig. 22, cuando UDP-glucosa 4 mM (sustrato para UGT) se proporcionó junto con CBGA (sustrato para CBDAs), los inventores de la presente detectaron niveles bajos de CBDA glicosilados e hidroxilados en hojas infiltradas con tanto la construcción de suspensión de células como la citosólica, pero no en el control de tipo salvaje. Este resultado demuestra lo novedoso en la síntesis de la planta, la glicosilación e hidroxilación de CBDA en la planta suplente *N. benthamiana*, tal como quedó demostrado por los cromatogramas de iones extraídos mostrados en la Fig. 23.

Ejemplo 11: Hidroxilación y glicosilación de cannabinoides en *Cannabis Sativa*.

Los inventores de la presente demuestran la glicosilación e hidroxilación de cannabinoides en *Cannabis Sativa*. Para confirmar adicionalmente los hallazgos mediante el uso de *N. benthamiana* como un modelo de planta, se realizó infiltración de *Agrobacterium* de las mismas construcciones de plásmidos descritos en la sección anterior en varias cepas de *Cannabis sativa* (ver las identificaciones de muestras en la Fig. 24). Tal como se muestra en las Fig. 24-26, expresión de las construcciones genéticas seleccionadas en *C. sativa*, como en *N. benthamiana*, demuestran la síntesis y acumulación de cannabinoides hidroxilados y/o glicosilados, en este caso CBDA. Una comparación de los resultados usando diferentes construcciones genéticas de *Agrobacterium* se presenta en la Tabla 8 más adelante.

Tal como lo han demostrado los inventores de la presente, en una modalidad, donde la construcción citosólica se con-transformó con el vector de expresión Myb/catalasa (MYBCAT),

proporcionó la detección más alta de CBDA y glucósido de CBDA, lo cual demuestra el rol de estos genes para mitigar los efectos de toxicidad debido a la acumulación de peróxido de hidrógeno (catalasa) y el aumento general en la síntesis de cannabinoides (factor de transcripción de Myb).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ejemplo 12: Uso de un tabaco como un sistema de planta de ejemplo para la glicosilación y funcionalización *in vivo* de los cannabinoides

Los inventores de la presente demostraron la glicosilación y funcionalización *in vivo* de los cannabinoides en un sistema de planta modelo. Específicamente, los inventores de la presente usaron *N. benthamiana* (tabaco) como un sistema modelo para demostrar la glicosilación y funcionalización *in vivo* de los cannabinoides. En esta modalidad, la transformación temporal a través de infiltración de *Agrobacterium* se realizó en *N. benthamiana*. Los inventores de la presente demostraron la expresión de genes heterólogos que fueron expresados en *N. benthamiana* transformada usando una cantidad de vectores de expresión de genes heterólogos (descritos más adelante). En esta modalidad de ejemplo, luego de la confirmación de expresión de los genes heterólogos que funcionalizarían y glicosilarían las moléculas de cannabinoides, los inventores de la presente introdujeron a las plantas compuestos cannabinoides seleccionados. En esta modalidad, los inventores de la presente introdujeron a las plantas *N. benthamiana* transgénicas ácido cannabigerólico (CBGA) y/o ácido cannabidiólico (CBDA). Los inventores de la presente también demostraron la glicosilación y funcionalización *in vivo* de los cannabinoides en un cultivo de suspensión de células. Específicamente, los inventores usaron células amarillo brillante de tabaco de ejemplo (BY2) como un sistema de suspensión de células para estudios de producción cannabinoide, funcionalización y/o glicosilación.

Ejemplo 13: Transformación temporal del modelo de planta de ejemplo *Nicotiana benthamiana*.

Los inventores de la presente usaron transformación mediada por plásmido de Ti de *Agrobacterium tumefaciens* con el vector de expresión de la planta pRI201-AN (Takara Bio USA), un vector binario para expresión de alto nivel de un gen externo en plantas dicotiledóneas que portan el promotor 35S constitutivo y un alcohol deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana* (AtAdh) como un potenciador traduccional (Matsui et ál. 2012). *N. benthamiana* se transformó de forma temporal de acuerdo con el método descrito por Sparkes et ál. 2006. Los cultivos durante la noche de la cepa de *Agrobacterium* GV3101 fueron transferidos a un matraz de 250mL con 50 mL de medio LB complementado con 50 mg/L de Kanamicina, 50 mg/L de Gentamicina y 10 mg/L de Rifampicina y cultivados durante 4-8 horas hasta que la densidad óptica a 600 nm (OD600) alcanzó aproximadamente entre 0.75 y 1. Las células fueron sedimentadas en una centrífuga a temperatura ambiente y se volvieron a suspender en 45 mL de medio de infiltración que contenía D-glucosa 5g/L,

MES 10mM, MgCl₂ 10mM y acetosiringona 100 µM. Se usó 1 ml de la solución para infiltrar las hojas usando una jeringa de 1mL. La expresión de los transgenes se confirmó 2-4 días después de la infiltración mediante RT-PCR. Para el análisis de RT-PCR, 100 mg de tejido de hoja se congeló en nitrógeno líquido y se molió en un TissueLyser (QIAGEN Inc, EUA). El ARN se extrajo siguiendo el kit de extracción de ARN de la planta EZNA (Omega Bio-tek Inc, EUA). Hasta un microgramo de ARN total se usó para sintetizar el ADNc usando el kit de síntesis de ADNc superscript III (Thermo Fisher Scientific, EUA). El ADNc se usó para monitorear la expresión del o de los transgenes mediante RT-PCR.

Ejemplo 14: Introducción de sustratos cannabinoides seleccionados a la cepa *N. benthamiana* transgénica.

Sustratos de enzimas seleccionadas se introdujeron a la cepa *N. benthamiana* modificada genéticamente o transgénica dos días después de la infiltración de *Agrobacterium* y luego de la confirmación de la expresión transgénica mediante RT-PCR. En este ejemplo, aproximadamente 277 µM de ácido cannabigerólico (CBGA) y/o ácido cannabidiólico (CBDA) se disolvió en 1mL de amortiguador que contiene MES 10mM, MgCl₂ 10 mM y Triton X100 al 0.1 % o Tween20 al 0.1% y se aplicó a las hojas transformadas ya sea mediante infiltración o mediante toques suaves con un aplicador de algodón. Las plantas fueron cosechadas después de 1-4 días, pesadas para obtener su peso fresco y congeladas a -80 °C antes de llevar a cabo el análisis de LC-MS para obtener la presencia de cannabinoides modificados.

Ejemplo 15: Ensayos *in vitro* para sintasa de CBDA y actividad de glucosiltransferasa.

La sintasa de CBDA es generalmente activa en el intervalo de pH 4-6 (Taura et ál. 1996) mientras las glucosiltransferasas son típicamente activas en el intervalo de pH 5.0 a 7.0 (Rini y Esko, 2017). Basándose en esta diferencia en el pH óptimo para la actividad de las enzimas, los inventores de la presente generaron un solo amortiguador de extracción para un ensayo combinado de sintasa de CBDA y glucosiltransferasa de UDP a pH 6 y 30°C en ensayos *in vitro* (Priest et ál., 2006). Los inventores de la presente molieron el tejido de hoja transformada en nitrógeno líquido. Se agregó un amortiguador de trituración que consistía en MES 50 mM, pH 6, EDTA 1mM, β-mercaptoetanol 5 mM y Triton X-100 al 0.1 % se agregó a una relación de 5:1 de amortiguador respecto a peso fresco de planta usando una maja y mortero. El extracto se filtró en hielo a través de 2 capas de estopilla para quitar desechos y centrifugados a 21000 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se usó en ensayos posteriores. La concentración de proteína del sobrenadante se cuantificó mediante el ensayo Bradford, usando albúmina de suero bovino como el estándar. Para comenzar la reacción, se usó 100-200 µg de proteína total cruda. El ensayo se llevó a cabo con y sin UDP-glucosa para monitorear si la glicosilación del sustrato cannabinoide estaba evitando las reacciones corriente abajo o el transporte de CBGA. Las plantas de tipo salvaje se usaron como controles para separar

la actividad glucosiltransferasa de UDP sobreexpresada de la endógena. La reacción se inició al agregar 100 µg de proteína, y 8 mM de glucosa de difosfato de uridina (UDPG) como el donante de azúcar-nucleótido a una mezcla de reacción que consiste en aproximadamente CBGA 277 µM, Triton X-100 al 0.1 % (p/v) , MgCl₂ 3 mM y MES 50 mM (pH 6.0). La reacción se incubó a 30 °C durante 3 horas o por la noche durante 14 horas. La reacción se terminó al congelarla en nitrógeno líquido y las muestras se almacenaron a -80°C antes del análisis de LC-MS.

Ejemplo 16: Glicosilación y síntesis dirigida a tricoma.

Como modelo de planta de ejemplo, las plantas *N. benthamiana* fueron cultivadas a partir de semillas y, después de 4 semanas de crecimiento vegetativo, las hojas se coinfiltraron con *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 que porta las siguientes construcciones: CBDAs de tricoma + UGT de tricoma en pRI201-AN (construcción de tricoma), PM-UTR1 en pRI201-AN, y supresor de silenciamiento p19 en pDGB3alpha2. En un segundo experimento, las hojas se infiltraron también con el *Agrobacterium* que expresa un plásmido de Ti con los genes de Myb/catalasa. La densidad de *Agrobacterium* se normalizó a 1 o 2 a absorbancia de 600 nm usando un espectrofotómetro y cultivos infiltrados conjuntamente en la misma relación (1:1:1). Después de 1 y 4 días después de la infiltración de *Agrobacterium* (DPI), CBGA 1 mL (277 µM) disuelto en Tween20 al 0.1 % (Sigma-Aldrich) o DMSO al 3 % (Sigma-Aldrich) se infiltró en cada hoja. Se usaron tres replicas biológicas. El experimento se repitió dos veces. Después de los resultados preliminares, las densidades de *Agrobacterium* de 2 en OD₆₀₀ fueron seleccionadas para todos los experimentos de infiltración siguientes. Además, Tween20 al 0.1 % fue elegido sobre DMSO al 3 % debido a un sustrato de CBGA que solubiliza mejor.

En esta modalidad, las muestras de hojas se recolectaron a 2DPI y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. La extracción de ARN fue realizada usando el mini-kit de planta de ARN tal como se describe por el fabricante (Qiagen). Se sintetizó el ADNc usando ARN respecto a premezcla Ecodry de ADNc tal como se describe por el fabricante (Takara). La plantilla de ADNc se normalizó a 50 ng de ARN total correspondiente por reacción. Temperatura de hibridación en Celsius: 60. Tiempo de extensión: 15s. 35 ciclos. Kit de polimerasa de ADN Q5 tal como lo describe el fabricante (New England Biolabs). Los cebadores de RT-PCR se detallan en la Tabla 5 más adelante.

Ejemplo 17: Transformación temporal de *Cannabis sativa*.

Los inventores de la presente realizaron la transformación temporal mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de *Cannabis sativa*. Los grupos experimentales consistieron en hojas jóvenes de variedad de CBD elevada (~10 % en flores secas) y hojas de tricoma de variedad de THC elevada (~20 % flores secas).

Para transformar las hojas de variedades de CBD elevadas, los inventores de la presente

germinaron 100 semillas tres veces; esto se realizó para asegurar que una cantidad suficiente de plantas estuviera disponible para todos los 9 eventos de transformación independientes. Para transformar hojas de tricoma, los inventores de la presente usaron pequeñas hojas que contienen tricoma de varias variedades conocidas por ser variedades de THC elevado. La instalación del experimento consistió en 2 cepas diferentes de *Agrobacterium tumefaciens*. Para la transformación temporal de cepa de *Agrobacterium* EHA 105, los inventores de la presente cultivaron células en 10 ml de medio LB complementado con 100mg/L de Rifampicina y 50 mg/L de Kanamicina y para la cepa de *Agrobacterium* se cultivaron células GV3101::6000 con 50 mg/L de Kanamicina, 25 mg/L de Gentamicina y 50 mg/L de Rifampicina. Una colonia de *Agrobacterium* individual se usó para inoculación y crecimiento durante la noche. Luego, 1 ml de este cultivo se inoculó en 500 ml de medio LB antemencionado complementado con 20 μ M de acetosiringona. Se cultivó *Agrobacteria* hasta OD₆₀₀ de aproximadamente entre 1 y 1.5. Las células se sedimentaron en una centrífuga a temperatura ambiente y se volvieron a suspender en medio de infiltración que contiene MES 10 mM, MgCl₂ 10mM y acetosiringona 200 μ M hasta un OD₆₀₀ de 0.5.

El cultivo bacteriano luego se usó para tres tipos diferentes de transformaciones de *Cannabis Sativa*. En todos los casos, la transformación se realizó en forma de transformación conjunta, mezclando todas las cepas relevantes (plásmidos) en proporción equivalente de números de células. Primero, para la presente los inventores infiltraron plantas de *Cannabis sativa* jóvenes (dos semanas de edad) completamente extendidas usando jeringa de 1 ml. Antes de la transformación, las plantas se mantuvieron bajo cubierta de plástico, para asegurar la suavidad máxima de las hojas. La infiltración se realizó del lado abaxial, lo cual asegura que toda la superficie de la hoja se infiltre a 12/h/12h día/noche a 22° C.

Segundo, los inventores de la presente infiltraron al vacío las hojas de *Cannabis sativa* jóvenes separadas (dos semanas de edad) completamente extendidas. Antes de la transformación, las plantas se mantuvieron bajo cubierta de plástico, para asegurar la suavidad máxima de las hojas. Las hojas luego se colocaron en Murashiga de media fuerza y agar de Skoog (1962) ($\frac{1}{2}$ MS) complementado con nitrato de amonio 61.8 mM y se incubó durante 5 días a 12/h/12h día/noche a 22° C.

Tercero, las hojas de tricoma se separaron, se colocaron en tubos Falcon de 50 ml y se infiltraron al vacío con solución bacteriana antemencionada 2 x durante 10 min cada uno. Las hojas luego se colocaron en agar $\frac{1}{2}$ MS complementado con nitrato de amonio 61.8 mM y se incubaron durante 5 días.

Todos los experimentos fueron realizados en triplicado, con la cuarta replicación realizada para la recolección de ADN/ARN y tinción de X-gluc para medir la actividad de beta-glucuronidasa (GUS) después de la infiltración conjunta con el gen GUS que contiene *Agrobacterium*. En todos los

casos, las hojas se cultivaron después de 5 días de transformación, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Ejemplo 18: Extracción de cannabinoides solubles en agua de *N. benthamiana*.

El material fresco de la planta transformada se cosechó de experimentos de invernadero en tubos de centrífuga de polipropileno de 15 o 50 mL y se congelan de forma instantánea en N₂ líquido. El material de la planta congelada se inactivó enzimáticamente al sumergir el material de la planta en metanol hirviendo durante 2 min. El material inactivado con metanol se homogeneizó usando un homogenizador P-10-35 (Kinematica, Bohemia NY). El homogenado se extrajo mediante activación breve en un volumen final de 10 mL o 30 mL de metanol al 70 % (v/v) correspondiente al tamaño del tubo. Los extractos resultantes se aclararon mediante centrifugación a 2,500 rpm a 4 °C durante 15 minutos en una centrífuga de piso Beckman J-6B (Beckman Coulter, Indianápolis IN). El sobrenadante se transfirió en un tubo de polipropileno y se evaporó bajo una corriente de N₂ a 45 °C hasta que se secó. Los extractos se reconstituyeron en metanol que contiene 20 µg/mL de 7-Hidroxioumarina estándar interno (Sigma-Aldrich, H24003). Los extractos reconstituidos se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se aclararon en una microcentrífuga a 10,000 g durante 15 min. 500 µL del sobrenadante se transfirió a un vial automuestreador de 2 mL y se mantuvo a 4°C hasta el análisis. Preparación de la muestra de ensayos *in vitro*: las muestras se filtraron por jeringa a través de una membrana de PVDF de 0.45 µm hacia un vial automuestreador de 2 mL.

Ejemplo 19: Extracción de cannabinoides solubles en agua de *Cannabis sativa*.

El material fresco de la planta se cosechó de plantas cultivadas en cámara en tubos de centrífuga de polipropileno de 1.5 mL y se congelan de forma instantánea en N₂ líquido. El material de planta congelada se homogeneizó mediante el uso de mortero y maja y se inactivó enzimáticamente al sumergir el material de la planta al hervir etanol al 100 % durante 2 min. La solución homogeneizada se diluyó hasta etanol al 70 %. Los extractos resultantes se aclararon mediante centrifugación a 2,500 rpm a 4 °C durante 15 minutos en una centrífuga de Eppendorf (Centrífuga 5415 R). El sobrenadante se transfirió en un tubo de polipropileno y se concentró tres veces usando centrífuga al vacío (Speedvac SC110, Savant). 2 µl de 20 µg/mL del estándar interno de Umbelliferona (Sigma-Aldrich, H24003) se agregó a 98 µl de extracto concentrado y se llevó para análisis.

Ejemplo 20: Espectrometría de masas de cromatografía líquida usada para confirmar la funcionalización y glicosilación de cannabinoides.

El inventor de la presente usó espectrometría de masas de cromatografía líquida para confirmar la funcionalización y glicosilación de los cannabinoides en los sistemas de plantas de ejemplo descritos en la presente. Específicamente, la espectrometría de masas se realizó en un

espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuadrupolo (QTOF) (QTOF Micro, Waters, Manchester, GB) equipado con una fuente de iones de electropulverización lockspray™ acoplado a un sistema de UPLC de Waters Acquity (Waters, Manchester, GB). Los espectros de masas se recolectaron en el modo de ionización de electropulverización negativa (ESI-). El gas de nebulización se estableció a 400 L/h a una temperatura de 350°C, el gas de cono se estableció a 15 L/H y la temperatura de la fuente se estableció a 110°C. Un voltaje capilar y voltaje de cono se establecieron a 2500 y 35 V, respectivamente. El voltaje de detector de MCP se estableció a 2500 V. La velocidad de adquisición de micro MS Q-TOF se estableció a 1.0 s con una demora de 0.1 s de InterScan. El intervalo de escaneo fue de 100 a 1500 m/z. Los datos fueron recolectados en modo continuo. Una solución de LockMass de raffinosa 50 ppm (503.1612 m/z) en 50:50 agua:metanol fue administrada a 20 µL /min a través de una bomba auxiliar y se adquirió cada 10 s durante la adquisición de MS. Se realizaron separaciones en una columna de Waters HSS T3 C18 (2.1 x 100 mm, tamaño de partícula 1.8 µm) usando un sistema Waters ACQUITY UPLC, equipado con un gestor de solvente binario de ACQUITY, gestor de columna de ACQUITY y gestor de muestra de ACQUITY (bucle de muestra de 10 µL, modo de inyección de bucle parcial, volumen de inyección 5 µL, 4°C). Los eluyentes A y B eran agua y acetonitrilo, respectivamente, ambos que contienen ácido fórmico al 0.1 %. La elución se realizó de forma isocrática durante 0.5 min en el eluyente B al 10 % y luego en el eluyente B al 100 % del gradiente lineal en 14.5 min, y de forma isocrática durante 3 min en el eluyente B al 100 %. La columna se reequilibró durante 6 min. La velocidad de flujo se estableció en 250 µL/min y la temperatura de la columna se mantuvo en 30°C.

Ejemplo 21: Demuestra materiales y métodos para el procesamiento de datos.

La identificación de análogos cannabinoides individuales fue realizada por los inventores de la presente, por sus cambios de masa precisos mediante Metabolynx (Waters Corp., Milford, EUA). Los parámetros del método para el procesamiento de datos fueron establecidos de la siguiente manera: intervalo de tiempo de retención 0.1-18 min, intervalo de masa 100-1500 Da, tolerancia de tiempo de retención 0.2 min, tolerancia de masa 0.05 Da, umbral de intensidad pico 14. La medida de masa precisa de los datos continuos fueron realizados usando la masa de bloqueo de raffinosa. Los datos cromatográficos brutos se procesaron adicionalmente para evaluar la integración de área pico de arena en cromatograma de iones extraídos usando Masslynx 4.1 (Waters Corp., Milford, USA). Los cannabinoides seleccionados, CBGA y CBDA se identificaron y cuantificaron usando materiales de referencia certificados (Cerilliant, Round Rock, TX). Todas las estructuras químicas y propiedades fisicoquímicas y constitucionales se generaron usando ChemDoodle versión 8.1.0 (IChemLabs™, Chesterfield, VA).

TABLAS

Tabla 1. Productos biotransformados de CBGA

Producto	RRT respecto		m/z encontrado	Error (mDa)	Error (ppm)	Fórmula molecular [M-H]-
	al original	m/z esperado				
R-OH 1 x Glucósido	0.58	537.2700	537.2703	-0.30	0.6	C28H41O10
2 x Glucósido	0.59	683.3279	683.3258	2.10	-3.1	C34H51O14
1 x O Glucósido de acetilo	0.73	563.2856	563.2844	1.20	-2.1	C30H43O10
1 x Glucósido #1	0.74	521.2751	521.2734	1.70	-3.3	C28H41O9
R-OH #1	0.80	375.2171	375.2224	-5.30	14.1	C22H31O5
1 x Glucósido #2	0.81	521.2751	521.2727	2.40	-4.6	C28H41O9
R-OH #2	0.81	375.2171	375.2237	-6.60	17.6	C22H31O5
R-OH #3	0.94	375.2171	375.2192	-2.10	5.6	C22H31O5
CBGA	1.00	359.2222	359.2245	-2.30	6.4	C22H31O4

RRT Tiempo de retención relativa respecto a la molécula original

R-OH funcionalizado por la adición del átomo O

Tabla 2. Productos biotransformados de CBDA

Producto	RRT respecto		m/z encontrado	Error (mDa)	Error (ppm)	Fórmula molecular [M-H]-
	al original	m/z esperado				
2 x Glucósido	0.56	681.3122	681.3097	2.50	-3.7	C34H49O14
R-OH 1 x Glucósido	0.61	535.2543	535.2599	-5.60	10.5	C28H39O10
1 x Glucósido	0.71	519.2601	519.2594	0.70	1.3	C28H39O9
1 x O Glucósido de acetilo	0.71	561.2700	561.2700	0.00	0	C30H41O10
R-OH #1	0.84	373.2015	373.2074	-5.90	15.8	C22H29O5
R-OH #2	0.87	373.2015	373.2034	-1.90	5.1	C22H29O5
R-OH #3	0.96	373.2015	373.2040	-2.50	-8	C22H29O5
CBDA	1.00	357.2066	357.2122	-5.60	15.7	C22H29O4

RRT Tiempo de retención relativa respecto a la molécula original

R-OH funcionalizado por la adición del átomo O

Tabla 3. Cebadores directos e inversos para RT-PCR de oxidorreductasa P450 y CYP3A4

Secuencia	CYP3A4	Oxidorreductasa P450
a		

Cebadores para RT-PCR	TGCCTAATAAAGCTCCTCCTACT	GGAAGAGCTTTGGTTCCTATGT
	directo GCTCCTGAAACAGTTCCATCTC inverso	directo GCTCCCAATTCAGCAACAATATC inverso

Tabla 4. Cebadores directos e inversos para sintasa de CBDA, UGT76G1 y ABCG2

Secuencia	sintasa de CBDA	UGT76G1	ABCG2
Cebadores para RT-PCR	Cebador directo: ACATCACAATCACA CAAACTAACAAAA G	Cebador directo: GATTGGAAGAACAAGC TTCAGGATTTC Cebador inverso: CCATCCTGAATGAGTC CAAAAAGCTC	Cebador directo: CCTTCAGGATTGTCAG GAGATG Cebador inverso: GCAGGTCCATGAAAC ATCAATC
	Cebador inverso: GGCCATAGTTTCTC ATCAATGG		

Tabla 5. Sintasa de CBDA dirigida a tricoma (CBDAs), UGT dirigido a tricoma y UTR1 dirigido a PM.

Secuencia	CBDAs dirigidos a tricoma	UGT dirigidos a tricoma	UTR1 dirigido a membrana de plasma
Cebadores para RT-PCR	Cebador directo: AAAGATCAAAAGCA AGTTCTTCACTGT	Cebador directo: AGTGCTCAACATTCTC CTTTTGGTT	Cebador directo: TTGTTCTTAAACCTC GCCTTTGAC
	Cebador inverso: CCATGCAGTTTGGC TATGAACATCT	Cebador inverso: TCTGAAGCCAACATCA ACAATTCCA	Cebador inverso: TCATTATGGAGCACTC CACTCTCTG

5

Tabla 6. Sintasa de CBDA dirigida a citosólico (cytCBDAs), UGT dirigido a citosólico (cytUGT)

Secuencia	Sintasa dirigida a citosólico	UGT dirigido a citosólico
Cebadores para RT-PCR	Cebador directo: AAAGATCAAAAGCAAGTTCTTCACT GT	Cebador directo: AGAACTGGAAGAATCCGAACCTGG AA
	Cebador inverso: ATAAACTTCTCCAAGGGTAGCTCC G	Cebador inverso: AAATCATCGGGACACCTTCACAAA C

Tabla 7. Resumen de resultados de experimentos de glicosilación y funcionalización en hojas de *N. benthamiana*.

Construcciones de agrobacterium	Alimentado por sustrato	CBGA (cantidad relativa)	Glucósido de CBGA (cantidad relativa)	Glucósido de CBGA + acetilado (cantidad relativa)	CBDA (cantidad relativa)	Glucósido de CBDA (cantidad relativa)	Hidroxi lo de CBDA (cantidad relativa)
Sintasa de CBDA de tricoma + glucosiltransferasa de tricoma + PM-UTR1) + Myb/catalasa* +supresor de silenciamiento de P19 *	CBGA	+	+	+	+	ND	ND
sintasa de CBDA citosólica, glucosiltransferasa y transportador de ABC de membrana plasmática) + Myb/catalasa+ supresor de silenciamiento de P19	CBGA	+	+++	+++	+++	ND	ND
201-SUS (sintasa de CBDA citosólica, glucosiltransferasa y transportador de	CBGA	+	+++	++++	+	+	+

ABC de membrana plasmática)							
CYP3A4+oxidorreductasa (citocromo P450 con oxidorreductasa P450)	CBDA	ND	+	ND	+++	+++++	+++++
Sintasa de CBDA citosólico + glucosiltransferasa citosólica + Myb/catalasa* + supresor de silenciamiento de P19 *	CBGA	++++	+++++	+++++	ND	++	++
P450 /catalasa de MYB/sintasa de CBDA citosólica, glucosiltransferasa y transportador de ABC de membrana plasmática	CBGA	+	++++	+	ND	++	++
Sin agrobacterium (control negativo)	CBGA	+	+	+	ND	ND	ND

*infiltración conjunta con y sin construcción se evaluó en diferentes duplicados

Tabla 8. Resumen de resultados de experimentos de glicosilación y funcionalización en hojas de *Cannabis sativa*.

Construcciones de agrobacterium	CBDA (cantidad relativa)	glucósido de CBDA (cantidad relativa)	Hidroxilo de CBDA (cantidad relativa)
Sintasa de CBDA de	++	traza	traza

tricoma + glucosiltransferasa de tricoma + membrana plasmática- transportador de azúcar dirigido) + Myb/catalasa			
Sintasa de CBDA citosólico, glucosiltransferasa citosólica + Myb/catalasa	+++	++++	+++++
201-SUS (sintasa de CBDA citosólica, glucosiltransferasa y transportador de ABC de membrana plasmática)	++	++	++

Tabla 9. Identificación de secuencias: de glucosiltransferasa de ejemplo

	SEQ ID NO.	Nombre	Organismo	Tipo
	SEQ ID NO. 26	NtGT5a	<i>Nicotiana tabacum</i>	Aminoácido
	SEQ ID NO. 27	NtGT5a	<i>Nicotiana tabacum</i>	ADN
	SEQ ID NO. 28	NtGT5b	<i>Nicotiana tabacum</i>	aminoácido
5	SEQ ID NO. 29	NtGT5b	<i>Nicotiana tabacum</i>	ADN
	SEQ ID NO. 30	NtGT4	<i>Nicotiana tabacum</i>	aminoácido
	SEQ ID NO. 31	NtGT4	<i>Nicotiana tabacum</i>	ADN
	SEQ ID NO. 32	NtGT1b	<i>Nicotiana tabacum</i>	aminoácido
	SEQ ID NO. 33	NtGT1b	<i>Nicotiana tabacum</i>	ADN
10	SEQ ID NO. 34	NtGT1a	<i>Nicotiana tabacum</i>	aminoácido
	SEQ ID NO. 35	NtGT1a	<i>Nicotiana tabacum</i>	ADN
	SEQ ID NO. 36	NtGT3	<i>Nicotiana tabacum</i>	aminoácido
	SEQ ID NO. 37	NtGT3	<i>Nicotiana tabacum</i>	ADN
	SEQ ID NO. 38	NtGT2	<i>Nicotiana tabacum</i>	aminoácido
15	SEQ ID NO. 39	NtGT2	<i>Nicotiana tabacum</i>	ADN

Tabla 10. Modelos de compartimentalización celular de producción de Cannabinoides. Columnas y

filas de diferentes sombreados corresponden a diferentes construcciones de expresión de ejemplo usadas.

Producción de cannabinoides / sistema de acumulación	Sintasa de CBDA	Transferencia de glicosilo de UDP	Transportador de ABC de Cannabinoides	Glucosa de UDP transportador	Factor de transcripción de Myb para cannabinoides	Catalasa para degradar el H₂O₂ a partir de sintasa de CBDA
Acumulación citoplasmática	Menos secuencia objetivo de tricoma	Requerido pero sin cambio objetivo	No se requiere gen	No se requiere gen	Expreso	Expreso
Tricoma (pH bajo) síntesis	Sin cambio	agregar secuencia objetivo de tricoma	No se requiere gen	Objetivo a membrana plasmática	Expreso	Expreso
Cultivos de suspensión de células	Menos secuencia objetivo de tricoma	Requerido pero sin cambio objetivo	Objetivo a membrana plasmática (PM, por sus siglas en inglés)	No se requiere gen	Expreso	Expreso

REFERENCIAS

- 5 Las siguientes referencias se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia:
- [1] I von Ossowski, M R Mulvey, P A Leco, A Borys y P C Loewen, *J. Bacteriol.* 1991, 173(2):514.
- [2] Behera, A., Behera, A., Mishra, S. C., Swain, S. K., & Author, C. (2003). *Cannabinoid glycosides: In vitro production of a new class of cannabinoids with improved physicochemical*
- 10

properties. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med* (Vol. 14).

[3] Holland, M. L., Lau, D. T. T., Allen, J. D., & Arnold, J. C. (2009). The multidrug transporter ABCG2 (BCRP) is inhibited by plant-derived cannabinoids. *British Journal of Pharmacology*, 152(5), 815–824. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707467>

[4] Ivanchenco. M., Vejlupkova. Z., Quatrano. R.S., Fowler. J. E. (2000) Maize ROP7 GTPase contains a unique, CaaX box-independent plasma membrane targeting signal. *The Plant Journal*, (24)1, 79-90.

[5] James M. Rini y Jeffrey D. Esko. Glycosyltransferases and Glycan-Processing Enzymes. En: Essentials of Glycobiology [Internet]. 3^a edición. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/?report=reader>

[6] Marks, M. D., Tian, L., Wenger, J. P., Omburo, S. N., Soto-Fuentes, W., He, J., ... Dixon, R. A. (2009). Identification of candidate genes affecting Δ^9 -tetrahydrocannabinol biosynthesis in *Cannabis sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 60(13), 3715–3726. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp210>

[7] Nagaya, S., Kawamura, K., Shinmyo, A., & Kato, K. (2010). The HSP terminator of *Arabidopsis thaliana* increases gene expression in plant cells. *Plant and Cell Physiology*, 51(2), 328–332. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp188>

[8] Norambuena, L., Marchant, L., Berninsone, P., Hirschberg, C. B., Silva, H., & Orellana, A. (2002). Transport of UDP-galactose in plants. Identification and functional characterization of AtUTr1, an *Arabidopsis thaliana* UDP-galactose/UDP-glucose transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 32923–32929. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204081200>

[9] Onofri, C., De Meijer, E. P. M., & Mandolino, G. (2015). Sequence heterogeneity of cannabidiolic- and tetrahydrocannabinolic acid-synthase in *Cannabis sativa* L. and its relationship with chemical phenotype. *Phytochemistry*, 116(1), 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.006>

[9] Priest, D. M., Ambrose, S. J., Vaistij, F. E., Elias, L., Higgins, G. S., Ross, A. R. S., ... Bowles, D. J. (2006). Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 46(3), 492–502. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02701.x>

[10] Siritunga, D., y Sayre, R. T. (2003). Generation of cyanogen-free transgenic cassava. *Planta* 217, 367–373. doi: 10.1007/s00425-003-1005-8

[11] Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A., & Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols*, 1(4), 2019–2025. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.286>

[13] Taura, F., Morimoto, S., & Shoyama, Y. (1996). Purification and characterization of

cannabidiolic-acid synthase from *Cannabis sativa* L. Biochemical analysis of a novel enzyme that catalyzes the oxidocyclization of. *Journal of Biological Chemistry*, 271(29), 17411–17416. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.29.17411>

[14] Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama Y, Yoshikai K, Shoyama Y, Morimoto S.(2007)
5 Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *Febs letters*, 581(16), 2929–34. DOI:[10.1016/j.febslet.2007.05.043](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.043)

[15] Yoo, S. D., Cho, Y. H., & Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, 2(7), 1565–1572. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199>

10 [16] Matsui, T., Matsuura, H., Sawada, K., Takita, E., Kinjo, S., Takenami, S., ... Kato, K. (2012). High level expression of transgenes by use of 5'-untranslated region of the Arabidopsis thaliana arabinogalactan-protein 21 gene in dicotyledons. *Plant Biotechnology*, 29(3), 319–322. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.12.0322a>

[17] Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. doi: 10.1111/ j.1399-3054.1962.tb08052.x

[18] Zipp, et ál., Cannabinoid glycosides: In vitro production of a new class of cannabinoids with improved physicochemical properties. bioRxiv preprint doi: <http://dx.doi.org/10.1101/104349>

[19] Mohamed, E. A., T. Iwaki, I. Munir, M. Tamoi, S. Shigeoka, y A. Wadano. 2003. Overexpression of bacterial catalase in tomato leaf chloroplasts enhances photo-oxidative stress
20 tolerance. *Plant Cell Environ.* 26:2037–2046.

[20] Akhtar, M.T., 2013, Doctoral Thesis, Leiden University. Cannabinoids and zebrafish. 2013-05-22. <http://hdl.handle.net/1887/20899>

[21] Sayed Farag. Cannabinoids production in *Cannabis sativa* L.: An in vitro approach. Tesis
· enero de 2014. DOI: 10.17877/DE290R-16298

25 [21] K, Watanabe, et ál., Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of tetrahydrocannabinols and cannabinol by human hepatic microsomes. *Life Sciences*. Volumen 80, Edición 15, 20 de marzo de 2007, páginas 1415-1419

[22] Flores-Sanchez IJ. et ál., Elicitation studies in cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. *J Biotechnol.* 20 de agosto de 2009; 143(2):157-68. doi: 10.1016/j.jbiotec.

30 [23] Stephen M. Stout & Nina M. Cimino (2013) Exogenous cannabinoids as substrates, inhibitors, and inducers of human drug metabolizing enzymes: a systematic review, *Drug Metabolism Reviews*, 46:1, 86-95, DOI: 10.3109/03602532.2013.849268

[24] Andre CM, Hausman J-F, Guerriero G. *Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:19. doi:10.3389/fpls.2016.00019.

35 [25] Mahlberg Pl. et ál,., Accumulation of Cannabinoids in Glandular Trichomes of *Cannabis*

(Cannabaceae). Journal of Industrial Hemp 9(1):15-36 · junio de 2004 con 273 lecturas
DOI: 10.1300/J237v09n01_04.

[25] Katalin S., et ál., Mini Rev Med Chem. 2017;17(13):1223-1291. doi:
10.2174/1389557516666161004162133.

5 [26] Sirikantaramas S., et ál., Tetrahydrocannabinolic Acid Synthase, the Enzyme Controlling
Marijuana Psychoactivity, is Secreted into the Storage Cavity of the Glandular Trichomes. Plant and
Cell Physiology, Volumen 46, Edición 9, 1 de setiembre de 2005, páginas 1578–1582,
https://doi.org/10.1093/pcp/pci166.

10 [26] Schilmiller AL, Last RL, Pichersky E (2008) Harnessing plant trichome biochemistry for
the production of useful compounds. Plant Journal 54: 702-711.

[27] Matias-Hernandez, L. et ál. AaMYB1 and its orthologue AtMYB61 affect terpene
metabolism and trichome development in *Artemisia annua* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant*
J. 2017; 90: 520–534

LISTADO DE SECUENCIAS

Tal como se menciona anteriormente, la presente solicitud contiene un listado de secuencias completo que se presentó por vía electrónica en formato ASCII y se incorpora en su totalidad mediante esta referencia. Las siguientes secuencias se proporcionan adicionalmente en la presente y se incorporan a la presente en la memoria descriptiva en su totalidad:

SEQ ID NO. 1

ADN

Citocromo P450 (CYP3A4)

Humano

ATGGCTTTGATTCCTGATTTGGCTATGGAACTAGATTGTTGTTGGCTGTTTCATT
GGTTTTGTTGTATTTGTATGGAACTCATTACATGGATTGTTTAAAAAATTGGGAAT
TCCTGGACCTACTCCTTTGCCTTTTTTGGGAAATATTTTGTTCATATCATAAAGGATT
TTGCATGTTTGATATGGAATGCCATAAAAAATATGGAAAAGTTTGGGGATTTTATGA
TGGACAACAACCTGTTTTGGCTATTACTGATCCTGATATGATTAAACTGTTTTGGT
TAAAGAATGCTATTCAGTTTTTACTAATAGAAGACCTTTTGGACCTGTTGGATTTAT
GAAATCAGCTATTTCAATTGCTGAAGATGAAGAATGGAAAAGATTGAGATCATTGT
TGTCACCTACTTTTACTTCAGGAAAATTGAAAGAAATGGTTCCTATTATTGCTCAAT
ATGGAGATGTTTTGGTTAGAAATTTGAGAAGAGAAGCTGAAACTGGAAAACCTGTT
ACTTTGAAAGATGTTTTTGGAGCTTATTCAATGGATGTTATTACTTCAACTTCATTT
GGAGTTAATATTGATTCATTGAATAATCCTCAAGATCCTTTTGTGAAAATACTAAA
AAATTGTTGAGATTTGATTTTTTGGATCCTTTTTTTTTGTCAATTACTGTTTTTCCTTT
TTTGATTCCTATTTTGAAGTTTTGAATATTTGCGTTTTTCCTAGAGAAGTTACTAAT
TTTTTGAGAAAATCAGTTAAAAGAATGAAAGAATCAAGATTGGAAGATACTCAAAAA
CATAGAGTTGATTTTTTGAATTGATGATTGATTCACAAAATTCAAAGAAACTGAA
TCACATAAAGCTTTGTCAGATTTGGAATTGGTTGCTCAATCAATTATTTTTATTTTG
CTGGATGCGAACTACTTCATCAGTTTTGTCATTTATTATGTATGAATTGGCTACTC
ATCCTGATGTTCAACAAAAATTGCAAGAAGAAATTGATGCTGTTTTGCCTAATAAAG
CTCCTCCTACTTATGATACTGTTTTGCAAATGGAATATTTGGATATGGTTGTTAATG
AACTTTGAGATTGTTTCCTATTGCTATGAGATTGGAAAGAGTTTGCAAAAAAGAT
GTTGAAATTAATGGAATGTTTATTCCTAAAGGAGTTGTTGTTATGATTCCTTCATAT
GCTTTGCATAGAGATCCTAAATATTGGACTGAACCTGAAAAATTTTGCCTGAAAG
ATTTTCAAAAAAATAAAGATAATATTGATCCTTATATTTATACTCCTTTTGGATCA
GGACCTAGAAATTGCATTGGAATGAGATTTGCTTTGATGAATATGAAATTGGCTTT
GATTAGAGTTTTGCAAAATTTTTCATTTAAACCTTGCAAAGAACTCAAATTCCTTT
GAAATTGTCATTGGGAGGATTGTTGCAACCTGAAAAACCTGTTGTTTTGAAAGTTG
AATCAAGAGATGGAACCTGTTTCAGGAGCT

SEQ ID NO. 2**Aminoácido****Citocromo P450 (CYP3A4)****Humano**

MALIPDLAMETRLLLAVALSLVLLYLYGTHSHGLFKKLGIPGPTPLPFLGNILSYHKGFCMF
 DMECHKKYGKVVWGFYDGGQPVLAITDPMIKTVLVKECYSVFTNRRPFGPVGFMKS
 AISIAEDEEWKRLRSLLSPTFTSGKLKEMVPIIAQYGDVLRNLRREAETGKPVTLKDV
 FGAYSMDVITSTSFGVNIDSLNNPQDPFVENTKKLLRFDLDPFFLSITVFPFLIPILEVL
 NICVFPREVTNFLRKS VKRMKESRLEDTQKHRVDFLQLMIDSQNSKETESHKALSDLE
 LVAQSIIFIFAGCETTSSVLSFIMYELATHPDVQQKLQEEIDAVLPNKAPPTYDTVLQME
 YLDMVVNETLRLFP IAMRLERVCKKDVEINGMFIPKGVVVMIPSYALHRDPKYWTEPE
 KFLPERFSKKNKDNIDPYIYTPFGSGPRNCIGMRFALMNMKLALIRVLQNF SFKPKKET
 QIPLKLSLGGLLQPEKPVVLKVESRDGT VSGA

SEQ ID NO. 3**ADN****Gen de oxidorreductasa P450 (oxred)****Humano**

ATGATTAATATGGGAGATTCACATGTTGATACTTCATCAACTGTTTCAGAAGCTGTT
 GCTGAAGAAGTTTCATTGTTTTCAATGACTGATATGATTTTGTTTTTCATTGATTGTT
 GGATTGTTGACTTATTGGTTTTTTGTTTAGAAAAAAAAAAGAAGAAGTTCCTGAATTT
 ACTAAAATTCAAACCTTTGACTTCATCAGTTAGAGAATCATCATTGTTGAAAAAATG
 AAAAAAAGTGAAGAAATATTATTGTTTTTTATGGATCACAACTGGAAGTCTGAA
 GAATTTGCTAATAGATTGTCAAAGATGCTCATAGATATGGAATGAGAGGAATGTC
 AGCTGATCCTGAAGAATATGATTTGGCTGATTGTGCATCATTGCCTGAAATTGATA
 ATGCTTTGGTTGTTTTTTGCATGGCTACTTATGGAGAAGGAGATCCTACTGATAAT
 GCTCAAGATTTTTATGATTGGTTGCAAGAACTGATGTTGATTTGTGAGGAGTTAA
 ATTTGCTGTTTTTTGGATTGGGAAATAAACTTATGAACATTTTAATGCTATGGGAAA
 ATATGTTGATAAAAGATTGGAACAATTGGGAGCTCAAAGAATTTTTGAATTGGGAT
 TGGGAGATGATGATGGAATTTGGAAGAAGATTTTATTACTTGGAGAGAACAATTT
 TGGTTGGCTGTTTGCGAACATTTTGGAGTTGAAGCTACTGGAGAAGAATCATCAAT
 TAGACAATATGAATTGGTTGTTCACTGATATTGATGCTGCTAAAGTTTATATGGG
 AGAAATGGGAAGATTGAAATCATATGAAAATCAAAAACCTCCTTTTGATGCTAAAAA
 TCCTTTTTTTGGCTGCTGTTACTACTAATAGAAAATTGAATCAAGGAAGTGAAGACA
 TTTGATGCATTTGGAATTGGATATTTTCAGATTCAAAAATTAGATATGAATCAGGAGA

TCATGTTGCTGTTTATCCTGCTAATGATTCAGCTTTGGTTAATCAATTGGGAAAAAT
 TTTGGGAGCTGATTTGGATGTTGTTATGTCATTGAATAATTTGGATGAAGAATCAAA
 TAAAAACATCCTTTTCCTTGCCCTACTTCATATAGAAGCTGCTTTGACTTATTATTTG
 GATATTACTAATCCTCCTAGAACTAATGTTTTGTATGAATTGGCTCAATATGCTTCA
 GAACCTTCAGAACAAGAATTGTTGAGAAAAATGGCTTCATCATCAGGAGAAGGAAA
 AGAATTGTATTTGTCATGGGTTGTTGAAGCTAGAAGACATATTTTGGCTATTTTGCA
 AGATTGCCCTTCATTGAGACCTCCTATTGATCATTTGTGCGAATTGTTGCCTAGAT
 TGCAAGCTAGATATTATTCAATTGCTTCATCATCAAAAGTTCATCCTAATTCAGTTC
 ATATTTGCGCTGTTGTTGTTGAATATGAACTAAAGCTGGAAGAATTAATAAAGGA
 GTTGCTACTAATTGGTTGAGAGCTAAAGAACCTGTTGGAGAAAATGGAGGAAGAG
 CTTTGGTTCCTATGTTTGTAGAAAATCACAATTTAGATTGCCTTTTAAAGCTACTA
 CTCCTGTTATTATGGTTGGACCTGGAAGTGGAGTTGCTCCTTTTATTGGATTTATTC
 AAGAAAGAGCTTGGTTGAGACAACAAGGAAAAGAAGTTGGAGAACTTTGTTGTAT
 TATGGATGCAGAAGATCAGATGAAGATTATTTGTATAGAGAAGAATTGGCTCAATT
 TCATAGAGATGGAGCTTTGACTCAATTGAATGTTGCTTTTTCAAGAGAACAATCAC
 ATAAAGTTTATGTTCAACATTTGTTGAAACAAGATAGAGAACATTTGTGGAAATTGA
 TTGAAGGAGGAGCTCATATTTATGTTTGCGGAGATGCTAGAAATATGGCTAGAGAT
 GTTCAAATACTTTTTATGATATTGTTGCTGAATTGGGAGCTATGGAACATGCTCAA
 GCTGTTGATTATATTAATAAAATTGATGACTAAAGGAAGATATTCATTGGATGTTTGG
 TCA

SEQ ID NO. 4

Aminoácido

Oxidoreductasa P450

Humano

MINMGDSHVDTSSTVSEAVAEVSLFSMTDMILFSLIVGLLTYWFLFRKKKEEVPEFTK
 IQTLTSSVRESSFVEKMKKTGRNIIVFYGSQTGTAEFANRLSKDAHRYGMRGMSAD
 PEEYDLADLSSLPEIDNALVVFCEMATYGEDPTDNAQDFYDWLQETDVDLSGVKFAV
 FGLGNKTYEHFNAMGKYVDKRLEQLGAQRIFELGLGDDGDNLEEDFITWREQFWLAV
 CEHFGVEATGEESSIRQYELVVHTDIDAAKVYMGEMGRLKSYENQKPPFDAKNPFLA
 AVTTNRKLNQGTERHLMHLELDISDSKIRYESGDHVAVYPANDSALVNQLGKILGADL
 DVVMSLNNLDEESNKKHPFPCPTSYRTALTYLDITNPPRTNVLYELAQYASEPSEQE
 LLRKMASSSGEGKELYLSWVVEARRHILAILQDCPSLRPPIDHLCCELLPRLQARYYSIA
 SSSKVHPNSVHICAVVVEYETKAGRINKGVATNWLRAKEPVGENGGRALVPMFVRKS
 QFRLPFKATTPVIMVPGTGVAPFIGFIQERAWLRQQGKEVGETLLYYGCRRSDEDYL
 YREELAQFHRDGALTQLNVAFSREQSHKVYVQHLLKQDREHLWKIEGGAHIYVCGD
 ARNMARDVQNTFYDIVAELGAMEHAQAVDYIKKLMTKGRYSLDVWS

SEQ ID NO.5**ADN****Sintasa de ácido cannabidiólico (CBDA)*****Cannabis sativa***

ATGAATCCTCGAGAAACTTCCTTAAATGCTTCTCGCAATATATTCCCAATAATGCA
 ACAAATCTAAAACTCGTATACACTCAAAACAACCCATTGTATATGTCTGTCCTAAAT
 TCGACAATACACAATCTTAGATTACCTCTGACACAACCCCAAAACCACTTGTTAT
 CGTCACTCCTTCACATGTCTCTCATATCCAAGGCACTATTCTATGCTCCAAGAAAG
 TTGGCTTGCAGATTCGAACTCGAAGTGGTGGTCATGATTCTGAGGGCATGTCCTA
 CATATCTCAAGTCCCATTTGTTATAGTAGACTTGAGAAACATGCGTTCAATCAAAT
 AGATGTTTCATAGCCAAACTGCATGGGTTGAAGCCGGAGCTACCCTTGGAGAAGTT
 TATTATTGGGTTAATGAGAAAAATGAGAATCTTAGTTTGGCGGCTGGGTATTGCCC
 TACTGTTTGCAGGTGGACACTTTGGTGGAGGAGGCTATGGACCATTGATGAGA
 AACTATGGCCTCGCGGCTGATAATATCATTGATGCACACTTAGTCAACGTTTCATGG
 AAAAGTGCTAGATCGAAAATCTATGGGGGAAGATCTCTTTTGGGCTTTACGTGGT
 GGTGGAGCAGAAAGCTTCGGAATCATTGTAGCATGGAAAATTAGACTGGTTGCTG
 TCCCAAAGTCTACTATGTTTAGTGTTAAAAAGATCATGGAGATACATGAGCTTGTC
 AAGTTAGTTAACAAATGGCAAATATTGCTTACAAGTATGACAAAGATTTATTACTC
 ATGACTCACTTCATAACTAGGAACATTACAGATAATCAAGGGAAGAATAAGACAGC
 AATACACACTTACTTCTCTTCAGTTTTCTTGGTGGAGTGGATAGTCTAGTCGACT
 TGATGAACAAGAGTTTTCTGAGTTGGGTATTAACAAAACGGATTGCAGACAATTG
 AGCTGGATTGATACTATCATCTTCTATAGTGGTGTGTAAATTACGACACTGATAAT
 TTAAACAAGGAAATTTTGCTTGATAGATCCGCTGGGCAGAACGGTGCTTTCAAGAT
 TAAGTTAGACTACGTTAAGAAACCAATTCCAGAATCTGTATTTGTCCAAATTTTGA
 AAAATTATATGAAGAAGATATAGGAGCTGGGATGTATGCGTTGTACCCTTACGGTG
 GTATAATGGATGAGATTTTCAAGATCAGCAATTCCATTCCCTCATCGAGCTGGAATC
 TTGTATGAGTTATGGTACATATGTAGTTGGGAGAAGCAAGAAGATAACGAAAAGCA
 TCTAAACTGGATTAGAAATATTTATAACTTCATGACTCCTTATGTGTCCAAAAATTC
 AAGATTGGCATATCTCAATTATAGAGACCTTGATATAGGAATAAATGATCCCAAGA
 ATCCAAATAATTACACACAAGCACGTATTTGGGGTGAGAAGTATTTTGGTAAAAAT
 TTTGACAGGCTAGTAAAAGTGAAAACCCTGGTTGATCCCAATAACTTTTTTAGAAA
 CGAACAAAGCATCCCACCTCAACCACGGCATCGTCATTAA

SEQ ID NO. 6**Aminoácido****Sintasa de ácido cannabidiólico (CBDA)**

Cannabis sativa

MNPRENFLKCF SQYIPNNATNLKLVYTQNNPLYMSVLNSTIHNLRFTSDTTPKPLVIVT
 PSHVSHIQGTILCSKKVGLQIRTRSGGHDSEGMYSISQVPFVIVDLRNMRSIKIDVHSQ
 TAWVEAGATLGEVYYWVNEKNENLSLAAGYCPTVCAGGHFGGGGYGPLMRNYGLA
 ADNIIDAHLVNVHGKVLDRKSMGEDLFWALRGGAESFGIIVAWKIRLVAVPKSTMFS
 VKKIMEIHELVLVKNKWQNIAYKYDKDLLLMTHTFTRNITDNQGNKTAIHTYFSSVFLG
 GVDSLVDLMNKSFP ELGIKKTD CRQLSWIDTIIFYSGVVNYDTDNFNKEILLDRSAGQN
 GAFKIKLDYVKKPIPESVFVQILEKLYEEDIGAGMYALYPYGGIMDEISESAIPFPHRAGI
 LYELWYICSWEKQEDNEKHNLNWIRNIYNFMTPYVSKNSRLAYLNYRDLDIGINDPKNP
 NNYTQARIWGEKYFGKNFDRLVKVKTLVDPNNFFRNEQSIPPQPRHRH

SEQ ID NO. 7**ADN****Glucosiltransferasa de UDP 76G1*****Stevia rebaudiana***

ATGGAAAATAAACTGAACTACTGTTAGAAGAAGAAGAAGAATTATTTTGTTTCCT
 GTTCCTTTTCAAGGACATATTAATCCTATTTTGCAATTGGCTAATGTTTTGTATTCAA
 AAGGATTTTCAATTACTATTTTTCATACTAATTTTAATAAACCTAAACTTCAAATTAT
 CCTCATTTTACTTTTAGATTTATTTTGGATAATGATCCTCAAGATGAAAGAATTTCAA
 ATTTGCCTACTCATGGACCTTTGGCTGGAATGAGAATTCCTATTATTAATGAACAT
 GGAGCTGATGAATTGAGAAGAGAATTGGAATTGTTGATGTTGGCTTCAGAAGAAG
 ATGAAGAAGTTTCATGCTTGATTACTGATGCTTTGTGGTATTTTGCTCAATCAGTTG
 CTGATTCATTGAATTTGAGAAGATTGGTTTTGATGACTTCATCATTGTTTAATTTTCA
 TGCTCATGTTTCATTGCCTCAATTTGATGAATTGGGATATTTGGATCCTGATGATAA
 AACTAGATTGGAAGAACAAGCTTCAGGATTTTCTATGTTGAAAGTTAAAGATATTAA
 ATCAGCTTATTCAAATTGGCAAATTTTGAAAGAAATTTTGGGAAAAATGATTAAACA
 AACTAGAGCTTCATCAGGAGTTATTTGGAATTCATTTAAAGAATTGGAAGAATCAG
 AATTGGAAACTGTTATTAGAGAAATTCCTGCTCCTTCATTTTTGATTCCTTTGCCTA
 AACATTTGACTGCTTCATCATCATCATTGTTGGATCATGATAGAACTGTTTTTCAAT
 GGTTGGATCAACAACCTCCTTCATCAGTTTTGTATGTTTCATTTGGATCAACTTCAG
 AAGTTGATGAAAAAGATTTTTTGGAATTGCTAGAGGATTGGTTGATTCAAAACAAT
 CATTTTTGTGGGTTGTTAGACCTGGATTTGTTAAAGGATCAACTTGGGTTGAACCT
 TTGCCTGATGGATTTTTTGGGAGAAAGAGGAAGAATTGTTAAATGGGTTTCTCAACA
 AGAAGTTTTGGCTCATGGAGCTATTGGAGCTTTTTGGACTCATTCAGGATGGAATT
 CAACTTTGGAATCAGTTTGCGAAGGAGTTCCTATGATTTTTTTCAGATTTTGGATTG
 GATCAACCTTTGAATGCTAGATATATGTCAGATGTTTTGAAAGTTGGAGTTTATTTG
 GAAAATGGATGGGAAAGAGGAGAAATTGCTAATGCTATTAGAAGAGTTATGGTTG

ATGAAGAAGGAGAATATATTAGACAAAATGCTAGAGTTTTGAAACAAAAAGCTGAT
GTTTCATTGATGAAAGGAGGATCATCATATGAATCATTGGAATCATTGGTTTCATAT
ATTCATCATTG

SEQ ID NO. 8

Aminoácido

Glucosiltransferasa de UPD 76G1

Stevia rebaudiana

MENKTETTVRRRRRIILFPVPFQGHINPILQLANVLYSKGFSITIFHTNFNKPKTSNYPHF
TFRFILNDNPQDERISNLP THGPLAGMRIPIINEHGADELRRLELLMLASEEDEEVSCL
ITDALWYFAQSVADSLNLRRLVLMTSSLFNFHAHVSLPQFDELGYLDPDDKTRLEEQA
SGFPM LKVKDIKSAYS SNWQILKEILGKMIKQTRASSGVIWNSFKELEESELETVIREIPA
PSFLIPLPKHLTASSSSLLDHDRTVFQWLDQQPPSSVLYVSFGSTSEVDEKDFLEIARG
LVDSKQSFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFLGERGRIVKWVPQQEVLAHGAIGAFW
THSGWNSTLESVCEGVPMIFSDFGLDQPLNARYMSDVLKGVVYLENGWERGEIANAI
RRVMVDEEGEYIRQNARVLKQKADVSLMKGGSSYESLESLSVSYISSL

SEQ ID NO. 9

ADN

Transportador de ABC ABCG2

Humano

ATGTCATCATCAAATGTTGAAGTTTTTATTCCTGTTTCACAAGGAAATACTAATGGA
TTTCCTGCTACTGCTTCAAATGATTTGAAAGCTTTTACTGAAGGAGCTGTTTTGTCA
TTTCATAATATTTGCTATAGAGTTAAATTGAAATCAGGATTTTTGCCTTGCAGAAAA
CCTGTTGAAAAAGAAATTTGTCAAATATTAATGGAATTATGAAACCTGGATTGAAT
GCTATTTTGGGACCTACTGGAGGAGGAAAATCATCATTGTTGGATGTTTTGGCTGC
TAGAAAAGATCCTTCAGGATTGTCAGGAGATGTTTTGATTAATGGAGCTCCTAGAC
CTGCTAATTTTAAATGCAATTCAGGATATGTTGTTCAAGATGATGTTGTTATGGGAA
CTTTGACTGTTAGAGAAAATTTGCAATTTTCAGCTGCTTTGAGATTGGCTACTACTA
TGACTAATCATGAAAAAATGAAAGAATTAATAGAGTTATTCAAGAATTGGGATTGG
ATAAAGTTGCTGATTCAAAGTTGGAACCTCAATTTATTAGAGGAGTTTCAGGAGGA
GAAAGAAAAAGAACTTCAATTGGAATGGAATTGATTACTGATCCTTCAATTTTGT
TTGGATGAACCTACTACTGGATTGGATTCATCAACTGCTAATGCTGTTTTGTTGTT
GTTGAAAAGAATGTCAAACAAGGAAGAAGCTATTATTTTTTCAATTCATCAACCTAG
ATATTCAATTTTAAATTGTTTGATTGATTGACTTTGTTGGCTTCAGGAAGATTGAT
GTTTCATGGACCTGCTCAAGAAGCTTTGGGATATTTTGAATCAGCTGGATATCATT
GCGAAGCTTATAATAATCCTGCTGATTTTTTTTTTGGATATTATTAATGGAGATTCAA

Aminoácido

Humano

MSSSNVEVFIPVSQGNTNGFPATASNDLKAFTEGAVLSFHNICYRVKLKSGFLPCRKP
VEKEILSNINGIMKPGLNAILGPTGGGKSSLLDVLAARKDPSGLSGDVLINGAPRPANF
KCNSGYVVQDDVVMGTLTVRENLQFSAALRLATTMTNHEKNERINRVIQELGLDKVA
DSKVGQTQFIRGVSGGERKRTSIGMELITDPSILFLDEPTTGLDSSTANAVLLLLKRMSK
QGRTIIFSIHQPRYSIFKLFDLSTLLASGRLMFHGPAQEALGYFESAGYHCEAYNNPAD
FFLDIINGDSTAVALNREEDFKATEIIEPSKQDKPLIEKLAEIYVNSSFYKETKAELHQLS
GGEKKKKITVFKEISYTTSFCHQLRWVSKRSFKNLLGNPQASIAQIIVTVVLGLVIGAIYF
GLKNDSTGIQNRAGVLFFLTTNQCFSVSAVELFVVEKKLFIHEYISGYRVSSYFLGK
LLSDLLPMRMLPSIIFTCIVYFMLGLKAKADAFFVMMFTLMMVAYSASSMALAIAAGQS
VVSATLLMTICFVFMIMFSGLLVNLTTIASWLSWLQYFSIPRYGFTALQHNEFLGQNF
CPGLNATGNNPCNYATCTGEEYLVKQGIDLSPWGLWKNHVALACMIVIFLTIAYLKLFF
LKKYS

SEQ ID NO. 11**ADN****Tipo MYB12*****Cannabis***

ATGAAGAAGAACAATCAACTAGTAATAATAAGAACAACAACAGTAATAATATCATC
 AAAAACGACATCGTATCATCATCATCAACAACAACATCATCAACAACACTACA
 GCAACATCATCATTTTCATAATGAGAAAGTTACTGTCAGTACTGATCATATTATTAAT
 CTTGATGATAAGCAGAAACGACAATTATGTCGTTGTCGTTTAGAAAAAGAAGAAGA
 AGAAGAAGGAAGTGGTGGTTGTGGTGAGACAGTAGTAATGATGCTAGGGTCAGTA
 TCTCCTGCTGCTGCTACTGCTGCTGCAGCTGGGGGCTCATCAAGTTGTGATGAAG
 ACATGTTGGGTGGTCATGATCAACTGTTGTTGTTGTTGTTGTTCTGAGAAAAAACG
 ACAGAAATTTTCATCAGTGGTGAACTTTAATAATAATAATAATAATAAGGAAAAT
 GGTGACGAAGTTTCAGGACCGTACGATTATCATCATCATAAAGAAGAGGAAGAAG
 AAGAAGAAGAAGATGAAGCATCTGCATCAGTAGCAGCTGTTGATGAAGGGATGTT
 GTTGTGCTTTGATGACATAATAGATAGCCACTTGCTAAATCCAAATGAGGTTTTGA
 CTTTAAGAGAAGATAGCCATAATGAAGGTGGGGCAGCTGATCAGATTGACAAGAC
 TACTTGTAATAATACTACTATTACTACTAATGATGATTATAACAATAACTTGATGATG
 TTGAGCTGCAATAATAACGGAGATTATGTTATTAGTGATGATCATGATGATCAGTA
 CTGGATAGACGACGTCGTTGGAGTTGACTTTTGGAGTTGGGAGAGTTGCGACTACT
 ACTGTTATTACCCAAGAACAAGAACAAGAACAAGATCAAGTTCAAGAACAGAAGAA
 TATGTGGGATAATGAGAAAGAGAAACTGTTGTCTTTGCTATGGGATAATAGTGATA
 ACAGCAGCAGTTGGGAGTTACAAGATAAAAGCAATAATAATAATAATAATGTT
 CCTAACAAATGTCAAGAGATTACCTCTGATAAAGAAAATGCTATGGTTGCATGGCT
 TCTCTCCTGA

SEQ ID NO. 12**Aminoácido****MYB12*****Cannabis***

MKKNKSTSNNKNNNSNNIIKNDIVSSSSSTTTTSSTTTATSSFHNEKVTVSTDHIINLDD
 KQKRQLCRCLRLEKEEEEEEGSGGCGETVVMMLGSVSPAATAAAAGGSSSCDEDML
 GGHDQLLLLCCSEKKTTEISSVVNFNNNNNNNNKENGDEVSGPYDYHHHKEEEEEEEEE
 DEASASVAADVDEGMLLCFDDIIDSHLLNPNEVLTLREDSHNEGGAADQIDKTTCNNTTI
 TTNDYNNNLMMLSCNNNGDYVISDDHDDQYWIDDVVGVDVFWSWESSTTTVITQE
 EQEQDQVQEQQNMWDNEKEKLLSLLWDNSDNSSSWELQDKSNNNNNNNNVNPNCQ
 EITSDKENAMVAWLLS

SEQ ID NO. 13**ADN****Catalasa*****Arabidopsis thaliana***

ATGGATCCTTATAAATATAGACCTGCTTCATCATATAATTACCTTTTTTTACTACTA
ATTCAGGAGCTCCTGTTTGGAATAATAATTCATCAATGACTGTTGGACCTAGAGGA
TTGATTTTGTGGAAGATTATCATTGTTGAAAAATTGGCTAATTTTGATAGAGAA
AGAATTCCTGAAAGAGTTGTTTCATGCTAGAGGAGCTTCAGCTAAAGGATTTTTTTGA
AGTTACTCATGATATTTCAAATTTGACTTGCGCTGATTTTTTGAGAGCTCCTGGAGT
TCAAACCTCCTGTTATTGTTAGATTTTCAACTGTTATTCATGCTAGAGGATCACCTGA
AACTTTGAGAGATCCTAGAGGATTTGCTGTAAATTTTATACTAGAGAAGGAAATTT
TGATTTGGTTGGAAATAATTTTCCTGTTTTTTTTATTAGAGATGGAATGAAATTCCT
GATATTGTTTCATGCTTTGAAACCTAATCCTAAATCACATATTCAAGAAAATTGGAGA
ATTTTGGAATTTTTTTTTCACATCATCCTGAATCATTGAATATGTTTACTTTTTTGTTG
ATGATATTGGAATTCCTCAAGATTATAGACATATGGATGGATCAGGAGTTAATACTT
ATATGTTGATTAATAAAGCTGGAAAAGCTCATTATGTTAAATTTTATTGGAAACCTA
CTTGCGGAGTTAAATCATTGTTGGAAGAAGATGCTATTAGATTGGGAGGAACTAAT
CATTACATGCTACTCAAGATTTGTATGATTCAATTGCTGCTGGAAATTATCCTGAA
TGGAATTGTTTATTCAAATTATTGATCCTGCTGATGAAGATAAATTTGATTTTGAT
CCTTTGGATGTTACTAAAACCTTGGCCTGAAGATATTTTGCCTTTGCAACCTGTTGG
AAGAATGGTTTTGAATAAAAATATTGATAATTTTTTTTGCTGAAAATGAACAATTGGC
TTTTTGCCCTGCTATTATTGTTTCTGGAATTCATTATTCAGATGATAAATTGTTGCA
AACTAGAGTTTTTTCATATGCTGATACTCAAAGACATAGATTGGGACCTAATTATTT
GCAATTGCCTGTTAATGCTCCTAAATGCGCTCATCATAATAATCATCATGAAGGAT
TTATGAATTTTATGCATAGAGATGAAGAAGTTAATTATTTTCTTCAAGATATGATC
AAGTTAGACATGCTGAAAAATATCCTACTCCTCCTGCTGTTTGCTCAGGAAAAAGA
GAAAGATGCATTATTGAAAAAGAAAATAATTTTAAAGAACCTGGAGAAAGATATAG
AACTTTTACTCCTGAAAGACAAGAAAGATTTATTCAAAGATGGATTGATGCTTTGTC
AGATCCTAGAATTACTCATGAAATTAGATCAATTTGGATTTTCATATTGGTCACAAGC
TGATAAATCATTGGGACAAAAATTGGCTTCAAGATTGAATGTTAGACCTTCAATT

SEQ ID NO. 14**Aminoácido****Catalasa*****Arabidopsis thaliana***

MDPYKYRPASSYNPFFTTNSGAPVWNNNSSMTVGPRGLILLEDYHLVEKLANFDRE
RIPERVVHARGASAKGFFEVTHTDISNLTCADFLRAPGVQTPVIVRFSTVIHARGSPETL

RDPRGFAVKFYTREGNFDLVGNNFPVFFIRDGMKFPDIVHALKPNPKSHIQENWRILD
 FFSHHPESLNMF TFLFDDIGIPQDYRHMDGSGVNTYMLINKAGKAHYVKFHWKPTCG
 VKSLLEEDAIRLGGTNHSATQDLYDSIAAGNYPEWKLFQIIDPADEDKFDFDPLDVT
 KTWPEDILPLQPVGRMVLNKNIDNFFAENEQLAFCPAIIVPGIHYSDDKLLQTRVFSYA
 DTQRHRLGPNYLQLPVNAPKCAHHNNHHEGFMNFMHRDEEVNYFPSRYDQVRHAE
 KYPTPPAVCSGKRERCIIEKENNFKEPGERYRTFTPERQERFIQRWIDALSDPRITHEI
 RSIWISYWSQADKSLGQKLASRLNVRPSI

SEQ ID NO.15

ADN

Catalasa HPII (KatE)

Escherichia coli

ATGTCGCAACATAACGAAAAGAACCCACATCAGCACCAGTCACCACTACACGATT
 CCAGCGAAGCGAAACCGGGGATGGACTCACTGGCACCTGAGGACGGCTCTCATC
 GTCCAGCGGCTGAACCAACACCGCCAGGTGCACAACCTACCGCCCCAGGGAGCC
 TGAAGCCCCTGATACGCGTAACGAAAACTTAATTCTCTGGAAGACGTACGCAA
 AGGCAGTGAAAATTATGCGCTGACCACTAATCAGGGCGTGCGCATCGCCGACGA
 TCAAACTCACTGCGTGCCGGTAGCCGTGGTCCAACGCTGCTGGAAGATTTTATT
 CTGCGCGAGAAAATCACCCACTTTGACCATGAGCGCATTCCGGAACGTATTGTTC
 ATGCACGCGGATCAGCCGCTCACGGTTATTTCCAGCCATATAAAAGCTTAAGCGA
 TATTACCAAAGCGGATTTCTCTCAGATCCGAACAAAATCACCCCAGTATTTGTAC
 GTTTCTCTACCGTTCAGGGTGGTGCTGGCTCTGCTGATACCGTGCGTGATATCCG
 TGGCTTTGCCACCAAGTTCTATACCGAAGAGGGTATTTTTGACCTCGTTGGCAATA
 ACACGCCAATCTTCTTTATCCAGGATGCGCATAAATTCCCCGATTTTGTTTCATGCG
 GTAAAACCAGAACCGCACTGGGCAATTCCACAAGGGCAAAGTGCCACGATACTT
 TCTGGGATTATGTTTCTCTGCAACCTGAACTCTGCACAACGTGATGTGGGCGAT
 GTCGGATCGCGGCATCCCCCGCAGTTACCGCACCATGGAAGGCTTCGGTATTCA
 CACCTTCCGCCTGATTAATGCCGAAGGGAAGGCAACGTTTGTACGTTTCCACTGG
 AAACCACTGGCAGGTAAAGCCTCACTCGTTTGGGATGAAGCACAAAACTCACCG
 GACGTGACCCGGACTTCCACCGCCGCGAGTTGTGGGAAGCCATTGAAGCAGGCG
 ATTTTCCGGAATACGAACTGGGCTTCCAGTTGATTCCTGAAGAAGATGAATTCAAG
 TTCGACTTCGATCTTCTCGATCCAACCAAATATCCCGGAAGAACTGGTGCCCGT
 TCAGCGTGTCGGCAAATGGTGCTCAATCGCAACCCGGATAACTTCTTTGCTGAA
 AACGAACAGGCGGCTTTCCATCCTGGGCATATCGTGCCGGGACTGGACTTCACC
 AACGATCCGCTGTTGCAGGGACGTTTGTCTCCTATACCGATACACAAATCAGTC
 GTCTTGGTGGGCGCAATTTCCATGAGATTCCGATTAACCGTCCGACCTGCCCTTA

CCATAATTTCCAGCGTGACGGCATGCATCGCATGGGGATCGACACTAACCCGGC
 GAATTACGAACCGAACTCGATTACGATAACTGGCCGCGCGAAACACCGCCGGG
 GCCGAAACGCGGCGGTTTTGAATCATACCAGGAGCGCGTGGAAGGCAATAAAGT
 TCGCGAGCGCAGCCCATCGTTTGGCGAATATTATTCCCATCCGCGTCTGTTCTGG
 CTAAGTCAGACGCCATTTGAGCAGCGCCATATTGTCGATGGTTTCAGTTTTGAGTT
 AAGCAAAGTCGTTTCGTCCGTATATTCGTGAGCGCGTTGTTGACCAGCTGGCGCAT
 ATTGATCTCACTCTGGCCCAGGCGGTGGCGAAAAATCTCGGTATCGAACTGACTG
 ACGACCAGCTGAATATCACCCACCTCCGGACGTCAACGGTCTGAAAAAGGATCC
 ATCCTTAAGTTTGTACGCCATTCTGACGGTGATGTGAAAGGTCGCGTGGTAGCG
 ATTTTACTTAATGATGAAGTGAGATCGGCAGACCTTCTGGCCATTCTCAAGGCGCT
 GAAGGCCAAAGGCGTTCATGCCAACTGCTCTACTCCCGAATGGGTGAAGTGACT
 GCGGATGACGGTACGGTGTTCCTATAGCCGCTACCTTTGCCGGTGCACCTTCG
 CTGACGGTTCGATGCGGTTCATTGTCCCTTGCGGCAATATCGCGGATATCGCTGACA
 ACGGCGATGCCAACTACTACCTGATGGAAGCCTACAAACACCTTAAACCGATTGC
 GCTGGCGGGTGACGCGCGCAAGTTTAAAGCAACAATCAAGATCGCTGACCAGGG
 TGAAGAAGGGATTGTGGAAGCTGACAGCGCTGACGGTAGTTTTATGGATGAACTG
 CTAACGCTGATGGCAGCACACCGCGTGTGGTCACGCATTCCTAAGATTGACAAAA
 TTCCTGCCTGA

SEQ ID NO. 16

Aminoácido

Catalasa HP11 (KatE)

Escherichia coli

MSQHNEKNPHQHQSPLHDSSEAKPGMDSLAPEDGSHRPAAEPTPPGAQPTAPGSL
 KAPDTRNEKLNSLEDVRKGSSENYALTTNQGVR1ADDQNSLRAGSRGPTLLEDFILREK
 ITHFDHERIPERIVHARGSAAHGYFQPYKSLSDITKADFLSDPNKITPVFVRFSTVQGG
 AGSADTVRDIRGFATKFYTEEGIFDLVGNNTPIFFIQDAHKFPDFVHAVKPEPHWAIPQ
 GQSAHDTFWDYVSLQPETLHNVMWAMSDRGIPRSYRTMEGFGIHTFRLINAEGKATF
 VRFHWKPLAGKASLWDEAQKLTGRDPDFHRRELWEAIEAGDFPEYELGFQLIPEED
 EFKFDFDLLDPTKLIPEELVPVQRVGKMVLNRNPDNFFAENEQAAPHGHIVPGLDFT
 NDPLLQGRLFSYTDQISRLGGPNFHEIPINRPTCPYHNFQRDGMHRMGIDTNPANYE
 PNSINDNWPRETTPGPKRGGFESYQERVEGNKVRERSPSFGEYYSHPR1FWLSQTP
 FEQRHIVDGFSELSKVVRPYIRERVVDQLAHIDLTLAQAVAKNLGIELTDDQLNITPPP
 DVNGLKKDPSLSLYAIPDGDVKGRVVA1LLNDEVRSADLLAILKALKAKGVHAKLLYSR
 MGEVTADDGTVLP1AATFAGAPSLTVDAVIVPCGN1ADIADNGDANYYLMEAYKHLKPI
 ALAGDARKFKATIKIADQGE1GIVEADSADGSFMD1ELLTLMAAHRVWSRIPKIDKIPA

SEQ ID NO. 17**ADN****Sintasa de CBDA dirigida a tricoma*****Cannabis***

ATGAAGTGCTCAACATTCTCCTTTTGGTTTGTTTGCAAGATAATATTTTTCTTTTTCT
 CATTCAATATCCAACTTCCATTGCTAATCCTCGAGAAAACCTTCCTTAAATGCTTCT
 CGCAATATATTCCCAATAATGCAACAAATCTAAAACCTCGTATACACTCAAAACAACC
 CATTGTATATGTCTGTCCTAAATTCGACAATACACAATCTTAGATTACCTCTGACA
 CAACCCCAAAACCACTTGTTATCGTCACTCCTTCACATGTCTCTCATATCCAAGGC
 ACTATTCTATGCTCCAAGAAAGTTGGCTTGCAGATTGGAACCTCGAAGTGGTGGTCA
 TGATTCTGAGGGCATGTCCTACATATCTCAAGTCCCATTGTTATAGTAGACTTGA
 GAAACATGCGTTCAATCAAAATAGATGTTTCATAGCCAACTGCATGGGTTGAAGCC
 GGAGCTACCCTTGAGAAAGTTTATTATTGGGTTAATGAGAAAAATGAGAATCTTAG
 TTTGGCGGCTGGGTATTGCCCTACTGTTTGCGCAGGTGGACACTTTGGTGGAGGA
 GGCTATGGACCATTGATGAGAACTATGGCCTCGCGGCTGATAATATCATTGATG
 CACACTTAGTCAACGTTTCATGGAAAAGTGCTAGATCGAAAATCTATGGGGGAAGA
 TCTCTTTTGGGCTTTACGTGGTGGTGGAGCAGAAAGCTTCGGAATCATTGTAGCA
 TGGAAAATTAGACTGGTTGCTGTCCCAAAGTCTACTATGTTTAGTGTTAAAAAGAT
 CATGGAGATACATGAGCTTGTCAAGTTAGTTAACAAATGGCAAAATATTGCTTACA
 AGTATGACAAAGATTTTATTACTCATGACTCACTTCATAACTAGGAACATTACAGATA
 ATCAAGGGAAGAATAAGACAGCAATACACACTTACTTCTCTTCAGTTTTCTTGGT
 GGAGTGGATAGTCTAGTCGACTTGATGAACAAGAGTTTTCTGAGTTGGGTATTAA
 AAAACGGATTGCAGACAATTGAGCTGGATTGATACTATCATCTTCTATAGTGGTG
 TTGTAAATTACGACACTGATAATTTTAACAAGGAAATTTTGCTTGATAGATCCGCTG
 GGCAGAACGGTGCTTTCAAGATTAAGTTAGACTACGTTAAGAAACCAATTCAGAA
 TCTGTATTTGTCCAAATTTTGGAAAAATTATATGAAGAAGATATAGGAGCTGGGAT
 GTATGCGTTGTACCCTTACGGTGGTATAATGGATGAGATTTTCTGAAATCAGCAATTC
 CATTCCCTCATCGAGCTGGAATCTTGTATGAGTTATGGTACATATGTAGTTGGGAG
 AAGCAAGAAGATAACGAAAAGCATCTAACTGGATTAGAAATATTTATAACTTCATG
 ACTCCTTATGTGTCCAAAAATCCAAGATTGGCATATCTCAATTATAGAGACCTTGAT
 ATAGGAATAAATGATCCCAAGAATCCAATAATTACACACAAGCACGTATTTGGGG
 TGAGAAGTATTTTGGTAAAAATTTTGACAGGCTAGTAAAAGTGAAAACCTGGTTG
 ATCCCAATAACTTTTTTAGAAACGAACAAAGCATCCACCTCTACCACGGCATCGT
 CATTAA

SEQ ID NO. 18**Aminoácido**

Sintasa de CBDA dirigida a tricoma***Cannabis***

MKCSTFSFWFVCKIIFFFSFNIQTSIANPRENFLKCFSQYIPNNATNLKLVYTQNNPLY
 MSVLNSTIHNLRFSDTTPKPLVIVTPSHVSHIQGTILCSKKVGLQIRTRSGGHDSEGM
 SYISQVPFVIVDLRNMRSIKIDVHSQTAWVEAGATLGEVYYWVNEKNENLSLAAGYCP
 TVCAGGHFGGGGYGPLMRNYGLAADNIIDAHLVNVHGKVLDRKSMGEDLFWALRGG
 GAESFGIIVAWKIRLVAVPKSTMFSVKKIMEIHELKLVNKKWQNIAYKYDKDLLLMTHFI
 TRNITDNQGNKNTAIHTYFSSVFLGGVDSLVDLMNKSFPGLIKKTDCRQLSWIDTIIFY
 SGVVNYDTDNFNKEILLDRSAGQNGAFKIKLDYVKKPIPESVQILEKLYEEDIGAGM
 YALYPYGGIMDEISESAIPFPHRAGILYELWYICSWEKQEDNEKHLNWIRNIYNFMTPT
 VSKNPRLAYLNYRDLDIGINDPKNPNNYTQARIWGEKYFGKNFDRLVKVKTLVDPNNF
 FRNEQSIPPLPRHRH

SEQ ID NO. 19**ADN****Glucosiltransferasa de UDP dirigida a tricoma 76G1*****Stevia rebaudiana***

ATGAAGTGCTCAACATTCTCCTTTGGTTTGTTTGCAAGATAATATTTTTCTTTTTCT
 CATTCAATATCCAACTTCCATTGCTAATCCTCGAGAAAATAAACTGAACTACTG
 TTAGAAGAAGAAGAAGAATTATTTGTTTCCTGTTCTTTCAAGGACATATTAATC
 CTATTTTGCAATTGGCTAATGTTTTGTATTCAAAGGATTTTCAATTACTATTTTTCA
 TACTAATTTTAATAAACCTAAACTTCAAATTATCCTCATTTTACTTTTAGATTTATTT
 TGGATAATGATCCTCAAGATGAAAGAATTTCAAATTTGCCTACTCATGGACCTTTG
 GCTGGAATGAGAATTCCTATTATTAATGAACATGGAGCTGATGAATTGAGAAGAGA
 ATTGGAATTGTTGATGTTGGCTTCAGAAGAAGATGAAGAAGTTTCATGCTTGATTA
 CTGATGCTTTGTGGTATTTTGCTCAATCAGTTGCTGATTCATTGAATTTGAGAAGAT
 TGGTTTTGATGACTTCATCATTGTTTAATTTTCATGCTCATGTTTCATTGCCTCAATT
 TGATGAATTGGGATATTTGGATCCTGATGATAAACTAGATTGGAAGAACAAGCTT
 CAGGATTTCTATGTTGAAAGTTAAAGATATTAATCAGCTTATTCAAATTGGCAAA
 TTTTGAAAGAAATTTTGGGAAAAATGATTAAACAACTAGAGCTTCATCAGGAGTTA
 TTTGGAATTCATTTAAAGAATTGGAAGAATCAGAATTGGAACTGTTATTAGAGAAA
 TTCCTGCTCCTTCATTTTTGATTCCTTTGCCTAAACATTTGACTGCTTCATCATCAT
 CATTGTTGGATCATGATAGAACTGTTTTTCAATGGTTGGATCAACAACCTCCTTCAT
 CAGTTTTGTATGTTTCATTTGGATCAACTTCAGAAGTTGATGAAAAAGATTTTTTG
 AAATTGCTAGAGGATTGGTTGATTCAAACAATCATTTTTGTGGGTTGTTAGACCT
 GGATTTGTAAAGGATCAACTTGGGTTGAACCTTTGCCTGATGGATTTTTGGGAGA
 AAGAGGAAGAATTGTAAATGGGTTCTCAACAAGAAGTTTTGGCTCATGGAGCTA

TTGGAGCTTTTTGGACTCATTGAGGATGGAATTCAACTTTGGAATCAGTTTGCGAA
 GGAGTTCCTATGATTTTTTCAGATTTTGGATTGGATCAACCTTTGAATGCTAGATAT
 ATGTCAGATGTTTTGAAAGTTGGAGTTTATTTGGAAAATGGATGGGAAAGAGGAGA
 AATTGCTAATGCTATTAGAAGAGTTATGGTTGATGAAGAAGGAGAATATATTAGAC
 AAAATGCTAGAGTTTTGAAACAAAAAGCTGATGTTTCATTGATGAAAGGAGGATCA
 TCATATGAATCATTGGAATCATTGGTTTCATATATTTTCATCATTGTAA

SEQ ID NO.20

Aminoácido

Glucosiltransferasa de UDP dirigida a tricoma 76G1

Stevia rebaudiana

MKCSTFSFWFVCKIIFFFSFNIQTSIANPRENKTETTIVRRRRRIILFPVPFQGHINPILQ
 LANVLYSKGFSITIFHTNFNKPKTSNYPHFTFRFILDNDPQDERISNLPTHGPLAGMRIPI
 INEHGADELRRLELLMLASEEDEEVSLITDALWYFAQSVADSLNLRRLVLMTSSLFN
 FHAHVSLPQFDELGYLDPDDKTRLEEQASGFPMKLVKDIKSAYSNWQILKEILGKMIK
 QTRASSGVIWNSFKELEESELETVIREIPAPSFLIPLPKHLTASSSSLLDHDRTVFQWLD
 QQPPSSVLYVSFGSTSEVDEKDFLEIARGLVDSKQSFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPD
 GFLGERGRIVKWVPQQEVLAHGAIGAFWTHSGWNSTLESVCEGVPMIFSDFGLDQPL
 NARYMSDVLKVGVYLENGWERGEIANAIRVMVDEEGEYIRQNARVLKQKADVSLMK
 GGSSYESLESLSVSISSL

SEQ ID NO. 21

ADN

PM-UTR1

Arabidopsis thaliana

ATGGAGGTCCATGGCTCCGATTCCGTCGAATTCTGTTGTTGGCGTTGTGTATCT
 CCGGGATCTGGTCCGCCTACATCTACCAAGGCGTTCTTCAAGAGACTCTGTCCAC
 GAAGAGATTTGGTCCAGATGAGAAGAGGTTTCGAGCATCTTGCATTCTTGAACCTTA
 GCTCAAAGTGTAGTCTGCTTGATCTGGTCTTATATAATGATCAAGCTCTGGTCAAA
 TGCTGGTAACGGTGGAGCACCATGGTGGACGTATTGGAGTGCAGGCATTACTAAT
 ACAATTGGTCCTGCCATGGGAATTGAAGCCTTGAAGTATATCAGTTATCCAGCTCA
 GGTTTTGGCAAAATCGTCAAAAATGATTCCAGTTATGCTAATGGGAACCTTTAGTTTA
 CGGAATAAGATACACTTTCCCTGAATACATGTGCACCTTTCTTGTGCTGGAGGAG
 TATCCATCTTTGCTCTTCTTAAGACAAGCTCTAAGACAATTAGCAAGCTAGCACAT
 CCAAATGCTCCCCTCGGTTACGCACTTTGTTCTTAAACCTCGCCTTTGACGGATT
 CACAAATGCCACACAAGACTCCATTGCCTCAAGGTACCCAAAAACCGAAGCGTGG
 GACATAATGCTGGGAATGAACTTATGGGGCACAATATACAACATTATCTACATGTT

TGGCTTGCCACAAGGGATGGATTCTGAAGCAATTCAGTTCTGTAAGCTACACCCGG
 AAGCGGCATGGGACATTCTAAAGTATTGTATATGCGGTGCCGTGGGACAAAACCTT
 CATCTTCATGACAATAAGTAACTTCGGGTCACTAGCTAACACGACCATAACCACGA
 CCAGGAAGTTTGTAGCATTGTTGTATCATCAGTAATGAGCGGAAATCCATTGTGCG
 TTGAAGCAATGGGGATGTGTTTCGATGGTCTTTGGTGGTTTGGCATATCAAATTTA
 TCTTAAATGGAAGAAATTGCAGAGAGTGGAGTGCTCCATAATGAACTTAATGTGTG
 GGTCTACCTGCGCCGCTTGA

SEQ ID NO. 22

ADN

Sintasa de CBDA citosólica (cytCBDAs)

Cannabis sativa

ATGAATCCTCGAGAAAACCTTCCTTAAATGCTTCTCGCAATATATTCCCAATAATGCA
 ACAAATCTAAAACCTCGTATACACTCAAACAACCCATTGTATATGTCTGTCCTAAAT
 TCGACAATACACAATCTTAGATTACCTCTGACACAACCCCAAAACCACTTGTTAT
 CGTCACTCCTTCACATGTCTCTCATATCCAAGGCACTATTCTATGCTCCAAGAAAG
 TTGGCTTGCAGATTCGAACTCGAAGTGGTGGTCATGATTCTGAGGGCATGTCCTA
 CATATCTCAAGTCCCATTGTTATAGTAGACTTGAGAAACATGCGTTCAATCAAAT
 AGATGTTTCATAGCCAACTGCATGGGTGAAGCCGGAGCTACCCTTGGAGAAGTT
 TATTATTGGGTTAATGAGAAAAATGAGAATCTTAGTTTGGCGGCTGGGTATTGCCC
 TACTGTTTGCAGGTGGACACTTTGGTGGAGGAGGCTATGGACCATTGATGAGA
 AACTATGGCCTCGCGGCTGATAATATCATTGATGCACACTTAGTCAACGTTTCATGG
 AAAAGTGCTAGATCGAAAATCTATGGGGGAAGATCTCTTTTGGGCTTTACGTGGT
 GGTGGAGCAGAAAGCTTCGGAATCATTGTAGCATGGAAAATTAGACTGGTTGCTG
 TCCCAAAGTCTACTATGTTTAGTGTTAAAAAGATCATGGAGATACATGAGCTTGTC
 AAGTTAGTTAAACAATGGCAAAATATTGCTTACAAGTATGACAAAGATTTATTACTC
 ATGACTCACTTCATAACTAGGAACATTACAGATAATCAAGGGAAGAATAAGACAGC
 AATACACACTTACTTCTCTTCAGTTTTCTTGGTGGAGTGGATAGTCTAGTCGACT
 TGATGAACAAGAGTTTTCTGAGTTGGGTATTAACAAAAACGGATTGCAGACAATTG
 AGCTGGATTGATACTATCATCTTCTATAGTGGTGTTGTAAATTACGACACTGATAAT
 TTTAACAAGGAAATTTGCTTGATAGATCCGCTGGGCAGAACGGTGCTTTCAAGAT
 TAAGTTAGACTACGTTAAGAAACCAATTCCAGAATCTGTATTTGTCCAAATTTTGA
 AAAATTATATGAAGAAGATATAGGAGCTGGGATGTATGCGTTGTACCCTTACGGTG
 GTATAATGGATGAGATTTTCAAGATCAGCAATTCCATTCCCTCATCGAGCTGGAATC
 TTGTATGAGTTATGGTACATATGTAGTTGGGAGAAGCAAGAAGATAACGAAAAGCA
 TCTAAACTGGATTAGAAATATTTATAACTTCATGACTCCTTATGTGTCCAAAAATCC

AAGATTGGCATATCTCAATTATAGAGACCTTGATATAGGAATAAATGATCCCAAGA
 ATCCAAATAATTACACACAAGCACGTATTTGGGGTGAGAAGTATTTTGGTAAAAAT
 TTTGACAGGCTAGTAAAAGTGAAAACCCTGGTTGATCCCAATAACTTTTTTAGAAA
 CGAACAAAGCATCCACCTCTACCACGGCATCGTCATTAA

SEQ ID NO. 23

Aminoácido

Sintasa de CBDA citosólica (cytCBDAs)

Cannabis sativa

MNPRENFLKCF SQYIPNNATNLKLVYTQNNPLYMSVLNSTIHNLRFTSDTTPKPLVIVT
 PSHVSHIQGTILCSKKVGLQIRTRSGGHDSEGMSYISQVPFVIVDLRNMRSIKIDVHSQ
 TAWVEAGATLGEVYYWVNEKNENLSLAAGYCPTVCAGGHFGGGGYGPLMRNYGLA
 ADNIIDAHLVNVHGKVLDRKSMGEDLFWALRGGGAESFGIIVAWKIRLVAVPKSTMFS
 VKKIMEIHELVLKLVNKWQNIAYKYDKDLLMTHFITRNITDNQGKNKTAIHTYFSSVFLG
 GVDSLVDLMNKSFP ELGIKKTDCRQLSWIDTIIFYSGVVNYD TDN FNKEILLDRSAGQN
 GAFKIKLDYVKKPIPESVFVQILEKLYEEDIGAGMYALYPYGGIMDEISESAIPFPHRAGI
 LYELWYICSWEKQEDNEKHLNWIRNIYNFMTPYVSKNPRLAYLNYRDL DIGINDPKNP
 NNYTQARIWGEKYFGKNFDRLVKVKTLVDPNNFFRNEQSIPPLPRHRH

SEQ ID NO. 24

ADN

Glucosiltransferasa de UDP dirigida a citosólico 76G1 (cytUTG)

Stevia rebaudiana

ATGGAAAATAAAACCGAAACCACCGTCCGCCGTCGTCGCCGTATCATTCTGTTCC
 CGGTCCC GTTCCAGGGCCACATCAACCCGATTCTGCAACTGGCGAACGTGCTGT
 ATTCGAAAGTTTT CAGCATCACCATCTTCCATACGAACTTCAACAAGCCGAAGACC
 AGCAATTACCCGCACTTTACGTTCCGTTTTATTCTGGATAACGACCCGCAGGATGA
 ACGCATCTCTAATCTGCCGACCCACGGCCCGCTGGCGGGTATGCGTATTCCGATT
 ATCAACGAACACGGCGCAGATGAACTGCGTCGCGAACTGGAAGTCTGATGCTG
 GCCAGCGAAGAAGATGAAGAAGTTTCTTGCTGATCACCACGCACTGTGGTATT
 TTGCCAGTCTGTTGCAGATAGTCTGAACCTGCGTCGCTGGTCTGATGACCAG
 CAGCCTGTTCAATTTTCATGCCCACGTTAGTCTGCCGCAGTTCGATGAACTGGGTT
 ATCTGGACCCGGATGACAAAACCCGCCTGGAAGAACAGGCGAGCGGCTTTCCGA
 TGCTGAAAGTCAAGGATATTAAGTCAGCGTACTCGAACTGGCAGATTCTGAAAGA
 AATCCTGGGTAAAATGATTAAGCAAACCAAAGCAAGTTCCGGCGTCATCTGGAATA
 GTTTCAAAGAACTGGAAGAATCCGAAGTGGAAACGGTGATTCTGAAATCCCGGC

TCCGAGTTTTCTGATTCCGCTGCCGAAGCATCTGACCGCGAGCAGCAGCAGCCT
 GCTGGATCACGACCGCACGGTGTTCAGTGGCTGGATCAGCAACCGCCGAGTTC
 CGTGCTGTATGTTAGCTTCGGTAGTACCTCGGAAGTGGATGAAAAGGACTTTCTG
 GAAATCGCTCGTGGCCTGGTTGATAGCAAACAATCTTTCCTGTGGGTGGTTCGCC
 CGGGTTTTGTGAAGGGCTCTACGTGGGTGAACCGCTGCCGGACGGCTTCCTGG
 GTGAACGTGGCCGCATTGTCAAATGGGTGCCGCAGCAAGAAGTGTGGCGCATG
 GCGCGATTGGCGCGTTTTGGACCCACTCCGGTTGGAACCTAACGCTGGAATCGG
 TTTGTGAAGGTGTCCCGATGATTTTCTCAGATTTTGGCCTGGACCAGCCGCTGAAT
 GCACGTTATATGTCCGATGTTCTGAAAGTCGGTGTGTACCTGGAAAACGGTTGGG
 AACGCGGCGAAATTGCGAATGCCATCCGTCGCGTTATGGTCGATGAAGAAGGCG
 AATACATTCGTCAGAATGCTCGCGTCCTGAAACAAAAGGCGGACGTGAGCCTGAT
 GAAAGGCGGTTTCATCGTATGAAAGTCTGGAATCCCTGGTTTCATACATCAGCTCTC
 GTAA

SEQ ID NO.25

Aminoácido

Glucosiltransferasa de UDP dirigida a citosólico 76G1 (cytUTG)

Stevia rebaudiana

MENKTETTVRRRRRIILFPVPFQGHINPILQLANVLYSKGFSITIFHTNFNKPKTSNYPHF
 TFRFILNDNPQDERISNLP THGPLAGMRIP IINEHGADEL RRELELLMLASEEDEEV SCL
 ITDALWYFAQSVADSLNLRRLV LMTSSLFN FHAHVSLPQFDELGYLDPDDKTRLEEQA
 SGFPM LKV KDIKSAYS NWQILKEILGKMIKQTKASSGVIWNSFKELEESELETVIREIPA
 PSFLIPLPKHLTASSSSLLDHDRTVFQWLDQQPPSSVLYVSFGSTSEVDEKDFLEIARG
 LVDSKQSFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFLGERGRIVKWVPQQEVL AHGAIGAFW
 THSGWNSTLESVCEGVPMIFSDFGLDQPLNARYMSDVLKVG VYLENGWERGEIANAI
 RRV MVDEEGEYIRQNARVLKQKADVSLMKGGSSYESLESLSVSYISSL

SEQ ID NO. 26

Aminoácido

Glucosiltransferasa (NtGT5a)

Nicotiana tabacum

MGSIGAELTKPHAVCIPYPAQGHINPMLKLAKILHHKGFHITFVNTEFNHRRLLKSRGP
 DSLKGLSSFRFETIPDGLPPCEADATQDIPSLCESTTNTCLAPFRDLLAKLNDTNTSNV
 PPVSCIVSDGVMSFTLAAAQELGVPEVLFWTT SACGFLGYMHYCKVIEKGYAPLKDAS
 DLTNGYLETTLD FIPGMKDVRRLDLPSFLRTTNPDEFMIKFVLQETERARKASAILNTF
 ETLEAEVLESRLNLLPPVYPIGPLHFLVKHVD DENLKGRLSSLWKEEPECIQWLDTKEP
 NSVVYVNFSGSITVMTPNQLIEFAWGLANSQQTFLWIIRPDIVSGDASILPPEFVEETKN

RGMLASWCSQEEVLSHPAIVGFLTHSGWNSTLESISSGVPMICWPFFAEQQTNCWF
SVTKWDVGMEDSDVKRDEVESLVRELMVGGKGKKMKKKAMEWKELAEASAKEHS
GSSYVNIEKLVNDILLSSKH

SEQ ID NO. 27

ADN

Glucosiltransferasa (NtGT5a)

Nicotiana tabacum

ATGGGTTCCATTGGTGCTGAATTAACAAAGCCACATGCAGTTTGCATACCATATCC
CGCCCAAGGCCATATTAACCCCATGTTAAAGCTAGCCAAAATCCTTCATCACAAAG
GCTTTCACATCACTTTTGTCAATACTGAATTTAACCACCGACGTCTCCTTAAATCTC
GTGGCCCTGATTCTCTCAAGGGTCTTTCTTCTTTCCGTTTTGAGACCATTCTGAT
GGACTTCCGCCATGTGAGGCAGATGCCACACAAGATATACCTTCTTTGTGTGAAT
CTACAACCAATACTTGCTTGGCTCCTTTTAGGGATCTTCTTGCGAACTCAATGAT
ACTAACACATCTAACGTGCCACCCGTTTCGTGCATCGTCTCGGATGGTGTGATGA
GCTTCACCTTAGCCGCTGCACAAGAATTGGGAGTCCCTGAAGTTCTGTTTTGGAC
CACTAGTGCTTGTGGTTTCTTAGGTTACATGCATTACTGCAAGGTTATTGAAAAAG
GATATGCTCCACTTAAAGATGCGAGTGACTTGACAAATGGATACCTAGAGACAACA
TTGGATTTTATACCAGGCATGAAAGACGTACGTTTAAGGGATCTTCCAAGTTTCTT
GAGAACTACAAATCCAGATGAATTCATGATCAAATTTGTCCTCCAAGAAACAGAGA
GAGCAAGAAAGGCTTCTGCAATTATCCTCAACACATTTGAAACACTAGAGGCTGAA
GTTCTTGAATCGCTCCGAAATCTTCTTCTCCTCCAGTCTACCCCATAGGGCCCTTGCA
TTTTCTAGTGAAACATGTTGATGATGAGAATTTGAAGGGACTTAGATCCAGCCTTT
GGAAAGAGGAACCAGAGTGTATACAATGGCTTGATACCAAAGAACCAAATTCTGTT
GTTTATGTTAACTTTGGAAGCATTACTGTTATGACTCCTAATCAGCTTATTGAGTTT
GCTTGGGGACTTGCAAACAGCCAGCAAACATTCTTATGGATCATAAGACCTGATAT
TGTTTCAGGTGATGCATCGATTCTTCCACCCGAATTCGTGGAAGAAACGAAGAAC
AGAGGTATGCTTGCTAGTTGGTGTTCACAAGAAGAAGTACTTAGTCACCCTGCAAT
AGTAGGATTCTTGACTCACAGTGAGATGGAATTCGACACTCGAAAGTATAAGCAGT
GGGGTGCCTATGATTTGCTGGCCATTTTTCGCTGAACAGCAAACAAATTGTTGGTT
TTCCGTCACTAAATGGGATGTTGGAATGGAGATTGACAGTGATGTGAAGAGAGAT
GAAGTGGAAGCCTTGTAAGGGAATTGATGGTTGGGGGAAAAGGCCAAAAAGATGA
AGAAAAAGGCAATGGAATGGAAGGAATTGGCTGAAGCATCTGCTAAAGAACATTC
AGGGTCATCTTATGTGAACATTGAAAAGTTGGTCAATGATATTCTTCTTTCATCCAA
ACATTAA

SEQ ID NO. 28

Aminoácido**Glucosiltransferasa (NtGT5b)*****Nicotiana tabacum***

MGSIGAEFTKPHAVCIPYPAQGHINPMLKLAKILHHKGFHITFVNTEFNHRLLKSRGP
 DSLKGLSSFRFETIPDGLPPCDADATQDIPSLCESTTNTCLGPFRDLLAKLNDTNTSNV
 PPVSCIISDGVMSFTLAAAQELGVPEVLFWTTSACGFLGYMHYYKVIEKGYAPLKDAS
 DLTNGYLETTLDIFPCMKDVRLRLDPSFLRTTNPDEFMIKFVLQETERARKASAILNTY
 ETLEAEVLESRLNLLPPVYPIGPLHFLVKHVDDENLKGLRSSLWKEEPECIQWLDTKEP
 NSVVYVNFSGSITVMTPNQLIEFAWGLANSQQSFLWIIRPDIVSGDASILPPEFVEETKK
 RGMLASWCSQEEVLSHPAIGGFLTHSGWNSTLESISSGVPMICWPFFAEQQTNCWF
 SVTKWDVGMEIDCDVKRDEVESLVRELMVGGKKGKKMKKKAMEWKELAEASAKEHS
 GSSYVNIEKVVDILLSSKH

SEQ ID NO. 29**ADN****Glucosiltransferasa (NtGT5b)*****Nicotiana tabacum***

ATGGGTTCCATTGGTGCTGAATTTACAAAGCCACATGCAGTTTGCATACCATATCC
 CGCCCAAGGCCATATTAACCCCATGTAAAGCTAGCCAAAATCCTTCATCACAAAG
 GCTTTCACATCACTTTTGTCAATACTGAATTTAACCACAGACGTCTGCTTAAATCTC
 GTGGCCCTGATTCTCTCAAGGGTCTTTCTTCTTTCCGTTTTGAGACAATTCCTGAT
 GGACTTCCGCCATGTGATGCAGATGCCACACAAGATATACCTTCTTTGTGTGAATC
 TACAACCAATACTTGCTTGGGTCCTTTTAGGGATCTTCTTGCGAAACTCAATGATA
 CTAACACATCTAACGTGCCACCCGTTTCGTGCATCATCTCAGATGGTGTGATGAG
 CTTACCTTAGCCGCTGCACAAGAATTGGGAGTCCCTGAAGTTCTGTTTTGGACC
 ACTAGTGCTTGTGGTTTCTTAGGTTACATGCATTATTACAAGGTTATTGAAAAAGGA
 TACGCTCCACTTAAAGATGCGAGTGACTTGACAAATGGATACCTAGAGACAACATT
 GGATTTTATACCATGCATGAAAGACGTACGTTTAAGGGATCTTCCAAGTTTCTTGA
 GAACTACAAATCCAGATGAATTCATGATCAAATTTGTCCTCCAAGAAACAGAGAGA
 GCAAGAAAGGCTTCTGCAATTATCCTCAACACATATGAAACACTAGAGGCTGAAGT
 TCTTGAATCGCTCCGAAATCTTCTTCTCCTCCAGTCTACCCCATTTGGGCCCTTGCAAT
 TTCTAGTGAAACATGTTGATGATGAGAATTTGAAGGGACTTAGATCCAGCCTTTGG
 AAAGAGGAACCAGAGTGTATACAATGGCTTGATACCAAAGAACCAAATTCTGTTGT
 TTATGTAACTTTGGAAGCATTACTGTTATGACTCCTAATCAACTTATTGAATTTGC
 TTGGGGACTTGCAAACAGCCAACAATCATTCTTATGGATCATAAGACCTGATATTG
 TTTCAGGTGATGCATCGATTCTTCCCCCGAATTCGTGGAAGAAACGAAGAAGAG
 AGGTATGCTTGCTAGTTGGTGTTCAACAAGAAGAAGTACTTAGTCACCCTGCAATAG

GAGGATTCTTGACTCACAGTGGATGGAATTCGACACTCGAAAGTATAAGCAGTGG
 GGTGCCTATGATTTGCTGGCCATTTTTCGCTGAACAGCAAACAAATTGTTGGTTTT
 CCGTCACTAAATGGGATGTTGGAATGGAGATTGACTGTGATGTGAAGAGGGATGA
 AGTGGAAAGCCTTGTAAGGGAATTGATGGTTGGGGGAAAAGGCCAAAAGATGAAG
 AAAAAGGCAATGGAATGGAAGGAATTGGCTGAAGCATCTGCTAAAGAACATTGAG
 GGTCATCTTATGTGAACATTGAGAAGGTGGTCAATGATATTCTTCTTTTCGTCCAAA
 CATTAA

SEQ ID NO.30

Aminoácido

Glucosiltransferasa de UDP 73C3 (NtGT4)

Nicotiana tabacum

MATQVHKLHFILFPLMAPGHMIPMIDIALLANRGVITTIITTPVNANRFSSTITRAIKSGL
 RIQILTLKFPSVEVGLPEGCENIDMLPSLDLASKFFAAISMLKQQVENLLEGINPSPSCVI
 SDMGFPWTTQIAQNFNIPRIVFHGTCCFSLCSYKILSSNILENITSSEYFVVPDLPDR
 VELTKAQVSGSTKNTTSVSSSVLKEVTEQIRLAEESYGVIVNSFEELEQVYEKEYRKA
 RGKKVWCVPVSLCNKEIEDLVTRGNKTAIDNQDCLKWLDNFETESVYASLGSLSR
 LTLQMVELGLGLEESNRPFVWVLGGGDKLNDLEKWILENGFEQRIKERVLRGWA
 PQVLILSHPAIGGVLTGCGWNSTLEGISAGLPMVTWPLFAEQFCNEKLVVQVLKIGVSL
 GVKVPVKWGDEENVGLVKKDDVKKALDKLMDEGEEGQVRRTKAKELGELAKKAFFG
 EGGSSYVNLTSLIEDIIEQQNHKEK

SEQ ID NO. 31

ADN

Glucosiltransferasa de UDP 73C3 (NtGT4)

Nicotiana tabacum

ATGGCAACTCAAGTGCACAACTTCATTTCACTATTCCCTTTAATGGCTCCAGG
 CCACATGATTCCTATGATAGACATAGCTAACTTCTAGCAAATCGCGGTGTCATTA
 CCACTATCATCACCCTCCAGTAAACGCCAATCGTTTCAGTTCAACAATTACTCGT
 GCCATAAAATCCGGTCTAAGAATCCAAATTCTTACACTCAAATTTCCAAGTGTAGA
 AGTAGGATTACCAGAAGGTTGCGAAAATATTGACATGCTTCCTTCTCTTGACTTGG
 CTTCAAAGTTTTTTGCTGCAATTAGTATGCTGAAACAACAAGTTGAAAATCTCTTAG
 AAGGAATAAATCCAAGTCCAAGTTGTGTTATTTTCAGATATGGGATTTCTTGGACT
 ACTCAAATTGCACAAAATTTTAATATCCCAAGAATTGTTTTTCATGGTACTTGTTGTT
 TCTCACTTTTATGTTCTATAAAATACTTTCTCTCCAACATTCTTGAAAATATAACCTC

AGATTCAGAGTATTTTGTGTTCTGATTTACCCGATAGAGTTGAACTAACGAAAG
 CTCAGGTTTCAGGATCGACGAAAAATACTACTTCTGTTAGTTCTTCTGTATTGAAA
 GAAGTTACTGAGCAAATCAGATTAGCCGAGGAATCATCATATGGTGTAATTGTAA
 TAGTTTTGAGGAGTTGGAGCAAGTGTATGAGAAAGAATATAGGAAAGCTAGAGGG
 AAAAAAGTTTGGTGTGTTGGTCCTGTTTCTTTGTGTAATAAGGAAATTGAAGATTG
 GTTACAAGGGGTAATAAACTGCAATTGATAATCAAGATTGCTTGAAATGGTTAGA
 TAATTTTGAAACAGAATCTGTGGTTTATGCAAGTCTTGGAAGTTTATCTCGTTTGAC
 ATTATTGCAAATGGTGGAAGTTGGTCTTGGTTTAGAAGAGTCAAATAGGCCTTTTG
 TATGGGTATTAGGAGGAGGTGATAAATTAATGATTTAGAGAAATGGATTCTTGAG
 AATGGATTTGAGCAAAGAATTAAGAAAGAGGAGTTTTGATTAGAGGATGGGCTC
 CTCAAGTGCTTATACTTTACACCCTGCAATTGGTGGAGTATTGACTCATTGCGGA
 TGGAATTCTACATTGGAAGGTATTTACAGCAGGATTACCAATGGTAACATGGCCACT
 ATTTGCTGAGCAATTTTGAATGAGAAGTTAGTAGTCCAAGTGCTAAAAATTGGAG
 TGAGCCTAGGTGTGAAGGTGCCTGTCAAATGGGGAGATGAGGAAAATGTTGGAG
 TTTTGGTAAAAAAGGATGATGTTAAGAAAGCATTAGACAACTAATGGATGAAGGA
 GAAGAAGGACAAGTAAGAAGAACAAAAGCAAAAGAGTTAGGAGAATTGGCTAAAA
 AGGCATTTGGAGAAGGTGGTTCTTCTTATGTTAACTTAACATCTCTGATTGAAGAC
 ATCATTGAGCAACAAAATCACAAGGAAAAATAG

SEQ ID NO. 32

Aminoácido

Glucosiltransferasa (NtGT1b)

Nicotiana tabacum

MKTAELVFIPAPGMGHLVPTVEVAKQLVDRHEQLSITVLIMTIPLNIPSYTKSLSSDY
 SSRITLLPLSQPETSVMSSFNAINFFEYISSYKGRVKDAVSETSFSSSNSVKLAGFVID
 MFCTAMIDVANEFGPSYVFYTSSAAMLGLQLHFQSLSIECSPKVHNYVEPESEVLIST
 YMNPPVPVKCLPGIILVNDESSTMFVNHARRFRETKGIMVNTFTELESHALKALSDDEKI
 PPIYPVGPILNLENGNEDHNQEYDAIMKWLDKPNSSVFLCFGSKGSFEEDQVKEIA
 NALESSGYHFLWSLRRPPPKDKLQFPSEFENPEEVLPEGFFQRTKGRGKVIGWAPQL
 AILSHPSVGGFVSHCGWNSTLESVRSGVPIATWPLYAEQQSNAFQLVKDLGMAVEIK
 MDYREDFNTRNPPLVKAEEIEDGIRKLMDSENKIRAKVTEMKDKSRAALLEGSSSYVA
 LGHFVETVMKN

SEQ ID NO. 33

ADN

Glucosiltransferasa (NtGT1b)

Nicotiana tabacum

ATGAAGACAGCAGAGTTAGTATTCATTCCTGCTCCTGGGATGGGTCACCTTGTAC
 CAACTGTGGAGGTGGCAAAGCAACTAGTCGACAGACACGAGCAGCTTTTCGATCAC
 AGTTCTAATCATGACAATTCCTTTGGAAACAAATATTCCATCATATACTAAATCACT
 GTCCTCAGACTACAGTTCTCGTATAACGCTGCTTCCACTCTCTCAACCTGAGACCT
 CTGTTACTATGAGCAGTTTTAATGCCATCAATTTTTTTGAGTACATCTCCAGCTACA
 AGGGTCGTGTCAAAGATGCTGTTAGTGAAACCTCCTTTAGTTCGTCAAATTCTGTG
 AAAGTTGCAGGATTTGTAATAGACATGTTCTGCACTGCGATGATTGATGTAGCGAA
 CGAGTTTGAATCCCAAGTTATGTGTTCTACACTTCTAGTGACAGCTATGCTTGGAC
 TACAACTGCATTTTCAAAGTCTTAGCATTGAATGCAGTCCGAAAGTTCATAACTAC
 GTTGAACCTGAATCAGAAGTTCTGATCTCAACTTACATGAATCCGGTTCCAGTCAA
 ATGTTTGCCCGGAATTATACTAGTAAATGATGAAAGTAGCACCATGTTTGTCAATC
 ATGCACGAAGATTCAGGGAGACGAAAGGAATTATGGTGAACACGTTCACTGAGCT
 TGAATCACACGCTTTGAAAGCCCTTTCCGATGATGAAAAAATCCCACCAATCTACC
 CAGTTGGACCTATACTTAACCTTGAAAATGGGAATGAAGATCACAATCAAGAATAT
 GATGCGATTATGAAGTGGCTTGACGAGAAGCCTAATTCATCAGTGGTGTCTTATG
 CTTTGGAAGCAAGGGGTCTTTGGAAGAAGATCAGGTGAAGGAAATAGCAAATGCT
 CTAGAGAGCAGTGGCTACCACTTCTTGTGGTCGCTAAGGCGACCGCCACCAAAA
 GACAAGCTACAATTCCCAAGCGAATTCGAGAATCCAGAGGAAGTCTTACCAGAGG
 GATTCTTTCAAAGGACTAAAGGAAGAGGAAAGGTGATAGGATGGGCACCCCAGTT
 GGCTATTTTGTCTCATCCTTCAGTAGGAGGATTCGTGTGCGCATTGTGGGTGGAATT
 CAACTCTGGAGAGCGTTTGAAGTGGAGTGCCGATAGCAACATGGCCATTGTATGC
 AGAGCAACAGAGCAATGCATTTCAACTGGTGAAGGATTTGGGTATGGCAGTAGAG
 ATTAAGATGGATTACAGGGAAGATTTTAATACGAGAAATCCACCACTGGTTAAAGC
 TGAGGAGATAGAAGATGGAATTAGGAAGCTGATGGATTCAGAGAATAAAATCAGG
 GCTAAGGTGACGGAGATGAAGGACAAAAGTAGAGCAGCACTGCTGGAGGGCGGA
 TCATCATATGTAGCTCTTGGGCATTTTGTGAGACTGTCATGAAAACTAG

SEQ ID NO. 34

Aminoácido

Glucosiltransferasa (NtGT1a)

Nicotiana tabacum

MKTTELVFIPAPGMGHLVPTVEVAKQLVDRDEQLSITVLIMTLPLETNIPSYTKSLSSDY
 SSRITLLQLSQPETSVMSSFNAINFFEYISSYKDRVKDAVNETFSSSSSVKLKGFVID
 MFCTAMIDVANEFGIPSYVFYTSNAAMLGLQLHFQSLSIEYSPKVHNYLDPESVAIST
 YINPIPVKCLPGIILDNDKSGTMFVNHARRFRETKGIMVNTFAELESHALKALSDDEKIP
 PIYPVGPIILNLGDGNEDHNQEYDMIMKWLDQPHSSVVFLCFGSKGSFEEDQVKEIA
 NALERSGNRFLWSLRRPPKDTLQFPSEFENPEEVLPVGFFQRTKGRGKVIGWAPQL

AILSHPAVGGFVSHCGWNSTLESVRSGVPIATWPLYAEQQSNAFQLVKDLGMAVEIK
MDYREDFNKTNPPLVKAEEIEDGIRKLMDSENKIRAKVMEMKDKSRAALLEGSSYVA
LGHFVETVMKN

SEQ ID NO.35

ADN

Glucosiltransferasa (NtGT1a)

Nicotiana tabacum

ATGAAGACAACAGAGTTAGTATTCATTCCTGCTCCTGGCATGGGTACCTTGTACC
CACTGTGGAGGTGGCAAAGCAACTAGTCGACAGAGACGAACAGCTTTCAATCACA
GTTCTCATCATGACGCTTCCTTTGGAACAAATATTCCATCATATACTAAATCACTG
TCCTCAGACTACAGTTCTCGTATAACGCTGCTTCAACTTTCTCAACCTGAGACCTC
TGTTAGTATGAGCAGTTTTAATGCCATCAATTTTTTTGAGTACATCTCCAGCTACAA
GGATCGTGTCAAAGATGCTGTTAATGAAACCTTTAGTTTCGTCAAGTTCTGTGAAAC
TCAAAGGATTTGTAATAGACATGTTCTGCACTGCGATGATTGATGTGGCGAACGA
GTTTGGAAATCCCAAGTTATGTCTTCTACACTTCTAATGCAGCTATGCTTGGACTCC
AACTCCATTTTCAAAGTCTTAGTATTGAATACAGTCCGAAAGTTCATAATTACCTAG
ACCCTGAATCAGAAGTAGCGATCTCAACTTACATTAATCCGATTCCAGTCAAATGT
TTGCCCGGGATTATACTAGACAATGATAAAAGTGGCACCATGTTTCGTCAATCATGC
ACGAAGATTCAGG

GAGACGAAAGGAATTATGGTGAACACATTCGCTGAGCTTGAATCACACGCTTTGA
AAGCCCTTTCCGATGATGAGAAAATCCCACCAATCTACCCAGTTGGGCCTATACTT
AACCTTGGAGATGGGAATGAAGATCACAATCAAGAATATGATATGATTATGAAGTG
GCTCGACGAGCAGCCTCATTTCATCAGTGGTGTTCTATGCTTTGGAAGCAAGGGA
TCTTTCGAAGAAGATCAAGTGAAGGAAATAGCAAATGCTCTAGAGAGAAGTGGTA
ACCGGTTCTTGTGGTCGCTAAGACGACCGCCACCAAAGACACGCTACAATTCCC
AAGCGAATTCGAGAATCCAGAGGAAGTCTTGCCGGTGGGATTCTTTCAAAGGACT
AAAGGAAGAGGAAAGGTGATAGGATGGGCACCCCAGTTGGCTATTTTGTCTCATC
CTGCAGTAGGAGGATTTCGTGTCGCATTGTGGGTGGAATTCAACTTTGGAGAGTGT
TCGTAGTGGAGTACCGATAGCAACATGGCCATTGTATGCAGAGCAACAGAGCAAT
GCATTTCAACTGGTGAAGGATTTGGGGATGGCAGTGGAGATTAAGATGGATTACA
GGGAAGATTTTAATAAGACAAATCCACCACTGGTTAAAGCTGAGGAGATAGAAGAT
GGAATTAGGAAGCTGATGGATTCAGAGAATAAAATCAGGGCTAAGGTGATGGAGA
TGAAGGACAAAAGTAGAGCAGCGTTATTAGAAGGCGGATCATCATATGTAGCTCT
CGGGCATTGTTGAGACTGTCATGAAAACTAA

SEQ ID NO. 36

Aminoácido**Glucosiltransferasa (NtGT3)*****Nicotiana tabacum***

MKETKKIELVFIPSPGIGHLVSTVEMAKLLIAREEQLSITVLIQWPNDKKLDSYIQSVAN
 FSSRLKFIRLPQDDSIMQLLKSNIFFTTFIASHKPAVRDAVADILKSESNNLAGIVIDLFCT
 SMIDVANEFELPTYVFYTSGAATLGLHYHIQNLRDEFNKDITKYKDEPEEKLSIATYLN
 FPAKCLPSVALDKEGGSTMFLDLAKRFRETKGIMINTFLELESYALNSLSRDKNLPPIY
 PVGPVLNLNVEGDNLGSSDQNTMKWLDDQPASSVFLCFGSGGSFEKHQVKEIAY
 ALESSGCRFLWSLRRPPTEDARFPSNYENLEEILPEGFLERTKGIGKVIGWAPQLAILS
 HKSTGGFVSHCGWNSTLESTYFGVPIATWPMYAEQQANAFQLVKDLRMGVEIKMDY
 RKDMKVMGKEVIVKAEIEKAIREIMDSESEIRVKVKEMKEKSRAAQMEGGSSYTSIG
 GFIQIIMENSQ

SEQ ID NO. 37**ADN****Glucosiltransferasa (NtGT3)*****Nicotiana tabacum***

ATGAAAGAAACCAAGAAAATAGAGTTAGTCTTCATTCCTTCACCAGGAATTGGCCA
 TTTAGTATCCACAGTTGAAATGGCAAAGCTTCTTATAGCTAGAGAAGAGCAGCTAT
 CTATCACAGTCCTCATCATCCAATGGCCTAACGACAAGAAGCTCGATTCTTATATC
 CAATCAGTCGCCAATTTTCAGCTCGCGTTTGAAATTCATTCTGACTCCCTCAGGATGA
 TTCCATTATGCAGCTACTCAAAAGCAACATTTTCACCACGTTTATTGCCAGTCATAA
 GCCTGCAGTTAGAGATGCTGTTGCTGATATTCTCAAGTCAGAATCAAATAATACGC
 TAGCAGGTATTGTTATCGACTTGTTCTGCACCTCAATGATAGACGTGGCCAATGAG
 TTCGAGCTACCAACCTATGTTTTCTACACGTCTGGTGCAGCAACCCTTGGTCTTCA
 TTATCATATACAGAATCTCAGGGATGAATTTAACAAAGATATTACCAAGTACAAAGA
 CGAACCTGAAGAAAACTCTCTATAGCAACATATCTCAATCCATTTCCAGCAAAAT
 GTTTGCCGTCTGTAGCCTTAGACAAAGAAGGTGGTTCAACAATGTTTCTTGATCTC
 GCAAAAAGGTTTCGAGAAACCAAGGTATTATGATAAACACATTTCTAGAGCTCGA
 ATCCTATGCATTAACTCGCTCTCACGAGACAAGAATCTTCCACCTATATACCCTG
 TCGGACCAGTATTGAACCTTAACAATGTTGAAGGTGACAACTTAGGTTTCATCTGAC
 CAGAATACTATGAAATGGTTAGATGATCAGCCCGCTTCATCTGTAGTGTTCCCTTTG
 TTTTGGTAGTGGTGGAAGCTTTGAAAAACATCAAGTTAAGGAAATAGCCTATGCTC
 TGGAGAGCAGTGGGTGTGCGTTTTTGTGGTCGTTAAGGCGACCACCAACCGAAG
 ATGCAAGATTTCCAAGCAACTATGAAAATCTTGAAGAAATTTTGCCAGAAGGATTC
 TTGGAAAGAACAAAAGGGATTGGAAAAGTGATAGGATGGGCACCTCAGTTGGCGA
 TTTTGTACATAAATCGACGGGGGGGATTTGTGTGCGCACTGTGGATGGAATTCGAC

TTTGGAAAGTACATATTTTGGAGTGCCAATAGCAACCTGGCCAATGTACGCGGAG
CAACAAGCGAATGCATTTCAATTGGTTAAGGATTTGAGAATGGGAGTTGAGATTAA
GATGGATTATAGGAAGGATATGAAAGTGATGGGCAAAGAAGTTATAGTGAAAGCT
GAGGAGATTGAGAAAGCAATAAGAGAAATTATGGATTCCGAGAGTGAAATTCGGG
TGAAGGTGAAAGAGATGAAGGAGAAGAGCAGAGCAGCACAATGGAAGGTGGCT
CTTCTTACACTTCTATTGGAGGTTTCATCCAAATTATCATGGAGAATTCTCAATAA

SEQ ID NO. 38

Aminoácido

Glucosiltransferasa (NtGT2)

Nicotiana tabacum

MVQPHVLLVTFPAQGHINPCLQFAKRLIRMGIEVTFATSVFAHRRMAKTTTSTLSKGLN
FAAFSDGYDDGFKADEHDSQHVMSEIKSRGSKTLKDILKSSDEGRPVTSLVYSLLLP
WAAKVAREFHIPCALLWIQPATVLDIYYYYFNGYEDAIGSTNDPNWCIQLPRLPLLKS
QDLPSFLLSSSNEEKYSFALPTFKEQLDLDVEENPKVLVNTFDALPKELKAIEKYNLI
GIGPLIPSTFLDGKDPLDSSFGGDLFQKSNDYIEWLNSKANSSVYISFGSLLNLSKNQ
KEEIAKGLIEIKKPFLWVIRDQENGKGDEKEEKLSCMMELEKQGKIVPWCSQLEVLTH
PSIGCFVSHCGWNSTLESLSGSVSVAFPHWTDQGTNAKLIEDVWKTGVRLLKKNED
GVVESEEIKRCIEMVMDGGEKGEEMRRNAQKWKELAREAVKEGGSSEMNLKAFVQE
VGKGC

SEQ ID NO. 39

ADN

Glucosiltransferasa (NtGT2)

Nicotiana tabacum

ATGGTGCAACCCCATGTCCTCTTGGTGACTTTTCCAGCACAAGGCCATATTAATCC
ATGTCTCCAATTTGCCAAGAGGCTAATTAGAATGGGCATTGAGGTAACCTTTTGCCA
CGAGCGTTTTCGCCATCGTCGTATGGCAAAAACCTACGACTTCCACTCTATCCAA
GGGCTTAAATTTTGCGGCATTCTCTGATGGGTACGACGATGGTTTCAAGGCCGAT
GAGCATGATTCTCAACATTACATGTCGGAGATAAAAAGTCGCGGTTCTAAAACCT
AAAAGATATCATTTTGAAGAGCTCAGACGAGGGACGTCCTGTGACATCCCTCGTC
TATTCTCTTTTGCTTCCATGGGCTGCAAAGGTAGCGCGTGAATTTACATACCGTG
CGCGTTACTATGGATTCAACCAGCAACTGTGCTAGACATATATTATTACTTCAA
TGGCTATGAGGATGCCATAAAAGGTAGCACCAATGATCCAAATTGGTGTATTCAAT
TGCTTAGGCTTCCACTACTAAAAAGCCAAGATCTTCCTTCTTTTTTACTTTCTTCTA
GTAATGAAGAAAAATATAGCTTTGCTCTACCAACATTTAAAGAGCAACTTGACACAT
TAGATGTTGAAGAAAATCCTAAAGTACTTGTGAACACATTTGATGCATTAGAGCCA

AAGGAACTCAAAGCTATTGAAAAGTACAATTTAATTGGGATTGGACCATTGATTCC
 TTCAACATTTTTGGACGGAAAAGACCCTTTGGATTCTTCCTTTGGTGGTGATCTTTT
 TCAAAAGTCTAATGACTATATTGAATGGTTGAACTCAAAGGCTAACTCATCTGTGG
 TTTATATCTCATTTGGGAGTCTCTTGAATTTGTCAAAAAATCAAAGGAGGAGATTG
 CAAAAGGGTTGATAGAGATTAAAAAGCCATTCTTGTGGGTAATAAGAGATCAAGAA
 AATGGTAAGGGAGATGAAAAAGAAGAGAAATTAAGTTGTATGATGGAGTTGGAAA
 AGCAAGGGAAAATAGTACCATGGTGTTCACTTGAAGTCTTAACACATCCATCT
 ATAGGATGTTTCGTGTCACATTGTGGATGGAATTCGACTCTGGAAAGTTTATCGTC
 AGGCGTGTCAGTAGTGGCATTTCCTCATTGGACGGATCAAGGGACAAATGCTAAA
 CTAATTGAAGATGTTTGAAGACAGGTGTAAGGTTGAAAAAGAATGAAGATGGTGT
 GGTTGAGAGTGAAGAGATAAAAAGGTGCATAGAAATGGTAATGGATGGTGGAGAG
 AAAGGAGAAGAAATGAGAAGAAATGCTCAAAAATGGAAAGAATTGGCAAGGGAAG
 CTGTAAAAGAAGGCGGATCTTCGGAAATGAATCTAAAAGCTTTTGTCAAGAAGTT
 GGCAAAGGTTGCTGA

SEQ ID NO.40

Aminoácido

Dominio de direccionamiento de tricoma de sintasa de THCA

Cannabis

MNCSAFSFWFVCKIIFFFLSFHIQISIA

SEQ ID NO. 41

Aminoácido

Dominio de direccionamiento de tricoma de sintasa de CBDA

Cannabis

MKCSTFSFWFVCKIIFFFFSFNIQTSIA

SEQ ID NO. 42

Aminoácido

Sintasa de THCA

Cannabis

MNCSAFSFWFVCKIIFFFLSFHIQISIANPRENFLKCFKSHIPNNVANPKLVYTQHDQLY
 MSILNSTIQNLRFISDTTPKPLVIVTPSNNSHIQATILCSKKVGLQIRTRSGGHDAEGMS
 YISQVPFVVVDLRNMHSIKIDVHSQTAWVEAGATLGEVYYWINEKNENLSFPGGYCPT
 VGVGGHFGSGGYGALMRNYGLAADNIIDAHLVNVDGKVLDRKSMGEDLFWAIRGGG

GENFGIIAAWKIKLVDVPSKSTIFSVKKNMEIHGLVKLFNKWQNIAYKYDKDLVLMTHFI
 TKNITDNHGKNKTTVHGYFSSIFHGGVDSLVDLMNKSFPGLGIKKTDCKEFSWIDTTIF
 YSGVNFNTANFKKEILLDRSAGKKTAFSIKLDYVKKPIPETAMVKILEKLYEEDVGAG
 MYVLYPYGGIMEEISESAIPFPHRAGIMYELWYTASWEKQEDNEKHINWVRSVYNFTT
 PYVSQNPRLAYLNYRDLGLGKTNHASPNNYTQARIWGEKYFGKNFNRLVKVKTKVDP
 NNFFRNEQSIPPLPPHHH

SEQ ID NO. 43

Aminoácido

MYB8 - ortólogo para CAN738

Humulus lupulus

MGRAPCCEKVGKKGRWTSEDEILTKYIQSNGEGCWRSPLKNAGLLRCGKSCRLR
 WINYLRLDLKRGNISSEEDIIKLHSTLGNRWSLIASHLPGRTDNEIKNYWNSHLSRKI
 HTFRRCNNTTTHHHHLPNLVTVTKNLPIPKRKGGRTSRLAMKKNKSSTSNQNSSVIK
 NDVGSSSSTTTTSVHQRTTTTTPTMDDQKQRLSRCRLEEKEDQDGASTGTVVMML
 GQAAAVGSSCDEDMLGHDQLSFLCCSEEKTTENSMTNLKENGDEHVS GPYDYDHR
 YEKETSVDGMLLCFNDIIDSNLLNPNEVLTLSSESLNLGGALMDTTTSTTTNNNNYSL
 SYNNGDCVISDDHDQYWLDDVGVDFWSWESSTVTQEQQEQEQEQEQEQEQEQ
 EQEQEHHHQDQKKNWDNEKEKMLALLWSDNSNWELQDNNNYHKCQEITS DKE
 NAMVAWLLS

SEQ ID NO. 44

Aminoácido

atMYB12 - ortólogo para CAN739

Arabidopsis thaliana

MGRAPCCEKVGIKRGRWTAEDQILSNYIQSNGEGSWRSPLKNAGLKRCGKSCRLR
 WINYLRSCLKRGNITPEEEELVVKLHSTLGNRWSLIAGHLPGRTDNEIKNYWNSHLSR
 KLHNFIRKPSISQDVSAVIMTNASSAPPPPQAKRRLGRTSRSAMKPKIHRTKTRKTKKT
 SAPPEPNADVAGADKEALMVESGAEAEALGRPCDYYGDDCNKNLMSINGDNGVLTFF
 DDDIIDLLLDESDPGHLYTNTTCGGDGELHNIRDSEGARGFSDTNQGNLDCLLQSC
 PSVESFLNYDHQVNDASTDEFIDWDCVWQEGSDNNLWHEKENPDMSVSWLLDGDD
 EATIGNSNCENFGEPLDHDDDESALVAWLLS

SEQ ID NO.45

Aminoácido**MYB112 - ortólogo para CAN833*****Arabidopsis thaliana***

MNISRTEFANCKTLINHKEEVEEVEKKMEIEIRRGWPTVEEDMKLVSYISLHGEGRWN
 SLRSAGLNRTGKSCRLRWLNLYLRPDIRRGDISLQEQFIILELHSRWGNRWSKIAQHL
 PGRTDNEIKNYWRTRVQKHAKLLKCDVNSKQFKDTIKHLWMPRLIERIAATQSVQFTS
 NHYSPENSSVATATSSTSSSEAVRSSFYGGDQVEFGTLDHMTNGGYWFNGGDTFET
 LCSFDELNKWLIQ

SEQ ID NO. 46**Aminoácido****Sintasa de THCA dirigido a citosólico (ctTHCAs)*****Cannabis***

NPRENFLKCFSKHIPNNVANPKLVYTQHDQLYMSILNSTIQNLRFISDTTPKPLVIVTPS
 NNSHIQATILCSKKVGLQIRTRSGGHDAEGMSYISQVPFVVVDLRNMHSIKIDVHSQTA
 WVEAGATLGEVYYWINEKNENLSFPGGYCPTVGVGGHFGSGGGYGALMRNYGLAAD
 NIIDAHLVNVDGKVLDRKSMGEDLFWAIRGGGGENFGIIAAWKIKLVDVPSKSTIFSVK
 KNMEIHGLVKLFNKWQNIAYKYDKDLVLMTHFITKNITDNHGKNKTTVHGYFSSIFHGG
 VDSLVDLMNKSFPPELGIKKTDCKEFSWIDTTIFYSGVVNFNTANFKKEILLDRSAGKKT
 AFSIKLDYVKKPIPETAMVKILEKLYEEDVGAGMYVLYPYGGIMEEISESAIPFPHRAGI
 MYELWYTASWEKQEDNEKHINWVRSVYNFTTPYVSQNPRLAYLNYRDLDLGKTNHA
 SPNNYTQARIWGEKYFGKNFNRLVKVKTVDPNNFFRNEQSIPPLPPHHH

SEQ ID NO. 47**Aminoácido****Catalasa dirigida a tricoma con dominio de direccionamiento de tricoma de sintasa de THCA*****Arabidopsis thaliana***

MNCSAFSFWFVCKIIFFFLSFHIQISIAMDPYKYRPASSYNPFFTTNSGAPVWNNNSS
 MTVGPRGLILLEDYHLVEKLANFDRERIPERVHARGASAKGFFEVDHISNLTCADFL
 RAPGVQTPVIVRFSTVIHARGSPETLRDPRGFAVKFYTREGNFDLVGNNFPVFFIRDG
 MKFPDIVHALKPNPKSHIQENWRILDDFFSHHPESLNMFTFLFDDIGIPQDYRHMDGSG
 VNTYMLINKAGKAHYVKFHWKPTCGVKSLLLEEDAIRLGGTNHSHATQDLYDSIAAGNY
 PEWKLFIIQIDPADEDKFDPLDVTKTWPEDILPLQPVGRMVLNKNIDNFFAENEQLA

FCPAIIVPGIHYSDDKLLQTRVFSYADTQRHRLGPNYLQLPVNAPKCAHHNNHHEGFM
NFMHRDEEVNYFPSRYDQVRHAEKYPTPPAVCSGKRERCIIEKENNFKEPGERYRTF
TPERQERFIQRWIDALSDPRITHEIRSIWISYWSQADKSLGQKLASRLNVRPSI

SEQ ID NO. 48

Aminoácido

Catalasa dirigida a tricoma con dominio de direccionamiento de tricoma de sintasa de CBDA

Arabidopsis thaliana

MKCSTFSFWFVCKIIFFFSFNIQTSIAMDPYKYRPASSYNPFFTTNSGAPVWNNNS
SMTVGPRGLILLEDYHLVEKLANFDRERIPERVHARGASAKGFFEVTHTDISNLTCADF
LRAPGVQTPVIVRFSTVIHARGSPETLRDPRGFAVKFYTREGNFDLVGNFPVFFIRD
GMKFPDIVHALKPNPKSHIQENWRILDFFSHHPESLNMFTFLFDDIGIPQDYRHMDGS
GVNTYMLINKAGKAHYVKFHWKPTCGVKSLLIEDAIRLGGTNHSHATQDLYDSIAAGN
YPEWKLFIQIIDPADEDKFDFDPLDVTKTWPEDILPLQPVGRMVLNKNIDNFFAENEQL
AFCPAIIVPGIHYSDDKLLQTRVFSYADTQRHRLGPNYLQLPVNAPKCAHHNNHHEGF
MNFMRDEEVNYFPSRYDQVRHAEKYPTPPAVCSGKRERCIIEKENNFKEPGERYRT
FTPERQERFIQRWIDALSDPRITHEIRSIWISYWSQADKSLGQKLASRLNVRPSI

SEQ ID NO. 49

Aminoácido

Catalasa HP11 (KatE) con dominio de direccionamiento de tricoma de sintasa de THCA

Escherichia coli

MNCSAFSFWFVCKIIFFFLSFHIIQISIAMSQHNEKNPHQHQSPLHDSSEAKPGMDSLA
PEDGSHRPAAEPTPPGAQPTAPGSLKAPDTRNEKLNSLEDVRKGSENYALTTNQGV
RIADDQNSLRAGSRGPTLLEDFILREKITHFDHERIPERIVHARGSAAHGYFQPYKSLS
DITKADFLSDPNKITPVFVRFSTVQGGAGSADTVRDIRGFATKFYTEEGIFDLVGNNTPI
FFIQDAHKFPDFVHAVKPEPHWAIPQGQSAHDTFWDYVSLQPETLHNVMWAMSDRG
IPRSYRTMEGFGIHTFRLINAEGKATFVRFWKPLAGKASLVWDEAQKLTGRDPDFH
RRELWEAIEAGDFPEYELGFQLIPEEDEFKFDLDPTKLIPEELVPVQRVGKMVLNR
NPDNFFAENEQAAPHGHIVPGLDFTNDPLLQGRIFS YTD TQISRLGGPNFHEIPINRP
TCPYHNFQRDGMHRMGIDTNPANYEPNSINDNWPRETTPGPKRGGFESYQERVEG
NKVRERSPSFGYYSHPRFLWLSQTPFEQRHIVDGFSGFELSKVVRPYIRERVVDQLA
HIDTLAQAVAKNLGIELTDDQLNITPPPDVNGLKKDPSLSLYAIPDGDVKGRVVAILLN

DEVRSADLLAILKALKAKGVHAKLLYSRMGEVTADDGTVLPAAATFAGAPSLTVDAVIV
PCGNIADIADNGDANYYLMEAYKHLKPIALAGDARKFKATIKIADQGEEGIVEADSADG
SFMDPELLTMAAHRVWSRIPKIDKIPA

SEQ ID NO.50

Aminoácido

**Catalasa HP II (KatE) con dominio de direccionamiento de tricoma de sintasa de
CBDA**

Escherichia coli

MKCSTFSFWFVCKIIFFFFSFNIQ**TSI**AMSQHNEKNPHQHQSPLHDSSEAKPGMDSLA
PEDGSHRPAAEPTPPGAQPTAPGSLKAPDTRNEKLNSLEDVRKGSENYALTTNQGV
RIADDQNSLRAGSRGPTLLEDFILREKITHFDHERIPERIVHARGSAAHGYFQPYKSLS
DITKADFLSDPNKITPVFVRFSTVQGGAGSADTVRDIRGFATKFYTEEGIFDLVGNNTPI
FFIQDAHKFPDFVHAVKPEPHWAIPQGQSAHDTFWDYVSLQPETLHNVMWAMSDRG
IPRSYRTMEGFGIHTFRLINAEGKATFVRFWKPLAGKASLVWDEAQKLTGRDPDFH
RRELWEAIEAGDFPEYELGFQLIPEEDEFKFDLDDPTKLIPEELVPVQRVGKMVLNR
NPDNFFAENEQAAPHGHIVPGLDFTNDPLLQGRLFSYTDQISRLGGPNFHEIPINRP
TCPYHNFQRDGMHRMGIDTNPANYEPNSINDNWPRETTPGPKRGGFESYQERVEG
NKVRERSPSFGEYYSHPRLFWLSQTPFEQRHIVDGFSELSKVVRPYIRERVVDQLA
HIDTLAQAVAKNLGIELTDDQLNITPPPDVNGLKKDPSLSLYAIPDGDVKGRVVAILLN
DEVRSADLLAILKALKAKGVHAKLLYSRMGEVTADDGTVLPAAATFAGAPSLTVDAVIV
PCGNIADIADNGDANYYLMEAYKHLKPIALAGDARKFKATIKIADQGEEGIVEADSADG
SFMDPELLTMAAHRVWSRIPKIDKIPA