

CÉLULAS RECOMBINANTES PRODUCTORAS DE ÁCIDO HIALURÓNICO

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con el campo de la
5 bioproducción de ácido hialurónico.

Antecedentes de la Invención

El ácido hialurónico, también conocido como hialuronano o HA, por sus siglas en inglés, es un polisacárido natural de alto peso molecular compuesto de ácido D-glucurónico y N-
10 acetil-D-glucosamina, unidos mediante enlaces glucosídicos de β -(1→4) y β -(1→3) alternados y que tienen la fórmula química $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$. El ácido hialurónico puede tener una longitud de 25,000 repeticiones de disacáridos. Los polímeros de ácido hialurónico pueden variar en tamaño de 5,000 a 20,000.000 Da
15 *in vivo*.

El HA tiene muchas aplicaciones en los campos médico y cosmético, incluyendo el andamiaje para ingeniería de tejidos, rellenos dermatológicos y viscosuplementación para el tratamiento de osteoartritis. En particular, una reducción en
20 la masa o el peso molecular del HA mediante degradación o desaceleración de la síntesis afecta las propiedades físicas y químicas, tal como el volumen, la viscosidad y la elasticidad del tejido. Por lo tanto, existe una necesidad constante de producción de HA.

25 Las principales fuentes conocidas de HA en la actualidad

son los cordones umbilicales humanos, las crestas de gallo y la fermentación de ciertos microorganismos.

Los métodos de fermentación para preparar HA a partir de microorganismos son particularmente interesantes ya que
5 facilitan la producción de una gran cantidad de HA mediante una posible ampliación a escala, a un costo reducido. Al contrario de aislar HA de fuentes animales que aportan ácido hialurónico de pesos moleculares muy elevados, la fermentación microbiana permite controlar, hasta cierto punto, el tamaño
10 del peso molecular de partida. Esto evita la necesidad de etapas adicionales de fraccionamiento por medios mecánicos, físicos o químicos.

Con este objetivo, se ha demostrado que cultivos bacterianos, tal como los estreptococos hemolíticos de los
15 grupos A y C representan buenas fuentes de HA (US5316926, US4801539, JP2009011315). Sin embargo, estas bacterias, y en particular *Streptococcus zooepidemicus*, que se usa principalmente en la técnica, no se reconocen generalmente como seguras. Las células hospederas de *Bacillus* recombinantes
20 también han demostrado la capacidad de producir HA en el intervalo de 20 a 800 KDa (US2008038780). También se ha demostrado en US2006168690 que la transformación de células vegetales para incluir un ADN que codifica el ácido hialurónico sintasa permitió con éxito la producción de HA. Por último, la
25 producción de pequeñas moléculas de HA también se ha demostrado

en levaduras, tal como en una *Pichia pastoris* recombinante en CN104263666.

A diferencia de otros microorganismos que se usan habitualmente para la producción de moléculas biológicas, las levaduras son generalmente reconocidas como seguras. Pueden crecer rápidamente y cultivarse a mayor densidad, en comparación con las bacterias, y no requieren un ambiente aséptico. Además, las células de levadura se pueden separar más fácilmente del medio de cultivo que las bacterias, lo que simplifica enormemente el proceso de extracción y purificación del producto. Por último, las levaduras presentan la ventaja de ser más resistentes a los cambios de pH en el medio de cultivo y, como tales, representan sistemas de fermentación más fuertes.

Sin embargo, entre las levaduras, distinguir características entre especies también puede presentar ciertos desafíos. Esto se debe principalmente a la diferencia en el metabolismo entre las especies. Por ejemplo, las integraciones del genoma en *P. pastoris* son estables, pero a menudo se encuentra una gran variabilidad de clones de una transformación, que muestran diversas características de productividad o cambios en su fisiología. Esto requiere un proceso de selección que requiere mucho tiempo para encontrar el clon con las características óptimas para la aplicación deseada. Esta variabilidad clonal es un inconveniente

importante para el desarrollo posterior de *P. pastoris* como plataforma para producir sustancias químicas de valor agregado. Otro inconveniente de usar *P. pastoris* es que es un organismo metanotrófico.

5 Por el contrario, *Saccharomyces cerevisiae* es particularmente útil como herramienta para la producción de moléculas de interés, ya que tiene un largo historial seguro cuando se trata de ser usado por humanos (tal como en vino, cerveza o pan) y como tal es un modelo bien establecido cuya
10 información genética es bien conocida en la técnica. *S. cerevisiae* además presenta la ventaja de ser generalmente reconocida como segura para humanos y animales. Además, la acidificación del medio que se produce al cultivar esta levadura reduce la posibilidad de contaminación de los
15 biofermentadores, y por lo tanto elimina la necesidad de agregar antibióticos al medio. Finalmente, se han desarrollado muchas herramientas genéticas que permiten modificaciones estables de su genoma (integración dentro del cromosoma).

 En consecuencia, todavía existe una necesidad en la
20 técnica de métodos de producción de ácido hialurónico adicionales que permitan su síntesis y secreción altamente eficientes. En particular, todavía existe la necesidad de proporcionar métodos de producción que sean rentables y suministren ácido hialurónico que sea seguro para la aplicación
25 humana.

En un caso particular, todavía existe una necesidad en la técnica de métodos de ácido hialurónico que permitan obtener grandes cantidades de ácido hialurónico de un tamaño particular y controlado.

5 **Breve Descripción de la Invención**

Por consiguiente, la presente invención se relaciona con los siguientes puntos:

Punto 1: una célula de levadura recombinante que produce ácido hialurónico (HA) en la que la célula recombinante
10 comprende:

 (a) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa;

 (b) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-Glucosa deshidrogenasa
15 (UDP-GlcDH o HASB);

 (c) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa, en donde el polipéptido que tiene actividad hialuronidasa comprende una señal de secreción de modo que la célula de levadura
20 recombinante produce ácido hialurónico, en particular de un peso molecular deseado (HAMW), y

 (d) (i) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa (GLN1); y/o

25 (ii) uno o más ácidos nucleicos endógenos alterados que

codifican una glutamato sintasa (GLT1);

en donde la célula de levadura recombinante pertenece al género *Saccharomyces*, o al género *Candida*, o al género *Kluyveromyces*, o al género *Ogataea*, o al género *Yarrowia*, o al género *Debaryomyces*, o al género *Ashbya*.

Como se ilustra en los ejemplos, las levaduras recombinantes de la invención permiten la producción de ácido hialurónico en una célula de levadura que naturalmente no es capaz de producir ácido hialurónico. Se demuestra además en los ejemplos que se puede controlar el tamaño del ácido hialurónico producido por la levadura recombinante.

Estas propiedades ventajosas se pueden aumentar aún más recombinando la levadura con modificaciones adicionales que se describen a continuación.

Punto 2: Una célula hospedera recombinante que produce ácido hialurónico (HA) en la que la célula hospedera recombinante comprende:

(a) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa;

(b) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-Glucosa deshidrogenasa (UDP-GlcDH o HASB);

(c) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa, en donde el polipéptido que tiene actividad hialuronidasa comprende una

señal de secreción y una señal de anclaje, de modo que el ácido hialurónico, en particular de un peso molecular deseado (HAMW) se produce por la célula hospedera; y

(d) (i) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que
5 codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa (GLN1); y/o

(ii) uno o más ácidos nucleicos endógenos alterados que codifican una glutamato sintasa (GLT1).

Punto 3: La célula recombinante de acuerdo con el punto 1
10 ó 2, en donde el peso molecular del HA está en el intervalo de menos de 50 kDa, de preferencia en el intervalo de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 50 kDa.

Punto 4: La célula recombinante de acuerdo con el punto 1
ó 2, en donde el peso molecular del HA está en el intervalo de
15 más de 50 kDa, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 250 kDa.

Punto 5: La célula recombinante según el Punto 1 ó 2, en la que el peso molecular del HA está en el intervalo de más de 100 kDa, preferentemente en el intervalo de aproximadamente
20 100 kDa a aproximadamente 1500 kDa.

Punto 6: La célula recombinante de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 5, en donde el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa se obtiene o deriva de *Saccharomyces cerevisiae*.

25 Punto 7: La célula recombinante de acuerdo con cualquiera

de los puntos 1 a 6, en donde el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa se obtiene o deriva de por lo menos uno de *Cupiennius salei*, *Loxosceles intermedia*, *Hirudo nipponia*, *Bothrops atrox* o *Tityus serrulatus*.

Punto 8: La célula recombinante de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 7, en donde el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa se obtiene o deriva de por lo menos uno de *Streptococcus zooepidemicus*, *Chlorella virus PBCV1*, *virus Chlorella CviKl*, *virus Chlorella IL-5-2s1*, *virus Chlorella CZ-2*, *virus Chlorella CVG-1*, *Xenopus laevis* o *Pasteurella multocida*, y en particular se obtiene o deriva de por lo menos uno de *Streptococcus zooepidemicus*, *virus Chlorella PBCV1*, *virus Chlorella CviKl*, *virus Chlorella IL-5-2s1*, *virus Chlorella CZ-2*, *virus Chlorella CVG-1* o *Xenopus laevis*.

Punto 9: La célula recombinante de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 8, en donde el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad UDP-Glucosa deshidrogenasa se obtiene o deriva de por lo menos uno de *Arabidopsis thaliana*, *virus Chlorella PBCV1* o *Streptococcus zooepidemicus*, y en particular de *Arabidopsis thaliana* o del *virus Chlorella PBCV1*.

Punto 10: La célula recombinante de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde la célula recombinante comprende un ácido nucleico recombinante que codifica uno o más de:

(i) un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA1); y/o

(ii) un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa (QRI1).

5 Punto 11: La célula recombinante de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 10, en donde la célula recombinante comprende por lo menos un ácido nucleico recombinante que codifica uno o más de:

10 (i) un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 (PGM1); y/o

(ii) un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (UGP1); y/o

(iii) un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa (GNA1); y/o

15 (iv) un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa (PCM1).

Punto 12: La célula de levadura recombinante de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 y 3 a 11, en donde la célula de levadura recombinante se selecciona del grupo que consiste de

20 *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces castelli*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces polysporus*,

25 *Kluyveromyces thermotolerans*, *Ogataea polymorpha*, *Yarrowia*

lypolytica, *Debaryomyces hansenii* y *Ashbya gossypii*, y es preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*.

Punto 13: La célula hospedera recombinante de acuerdo con cualquiera de los puntos 2 a 11, en donde la célula hospedera
5 recombinante pertenece al orden *Saccharomycetales*, en particular a la familia *Saccharomycetaceae*, y en particular se selecciona del grupo que consiste de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces castelli*,
10 *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces polysporus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Ogataea polymorpha*, *Yarrowia lypolytica*, *Debaryomyces hansenii* y *Ashbya gossypii*, y es preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*.

15 Punto 14: Un método para producir ácido hialurónico (HA) de un peso molecular deseado (HAMW) que comprende:

(a) cultivar una célula recombinante como se define en cualquiera de los puntos 1 a 13 en un medio de cultivo durante un tiempo suficiente para producir ácido hialurónico (HA) del
20 peso molecular deseado; y

(b) opcionalmente aislar o recuperar el ácido hialurónico (HA) de la célula recombinante y/o del medio de cultivo.

Punto 15: El método de acuerdo con el Punto 14, en donde el HA tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa a
25 aproximadamente 50 kDa, y preferentemente de aproximadamente

20 kDa a aproximadamente 30 kDa.

Punto 16: El método de acuerdo con el punto 15, en donde el HA tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa a aproximadamente 50 kDa.

5 Punto 17: El método de acuerdo con el punto 14, en donde el peso molecular del HA es de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 150 kDa.

Punto 18: El método de acuerdo con el punto 14, en donde el peso molecular del HA es de aproximadamente 150 kDa a
10 aproximadamente 1500 kDa.

Punto 19: El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 14 a 18, en donde la célula recombinante comprende por lo menos un ácido nucleico recombinante que codifica uno o más de:

15 (i) un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA1); y/o

 (ii) un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa (QRI1).

Punto 20: El método de acuerdo con cualquiera de los
20 puntos 14 a 19, en donde la célula recombinante comprende por lo menos un ácido nucleico recombinante que codifica uno o más de:

 (i) un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 (PGM1);

25 (ii) un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-

fosfato uridililtransferasa (UGP1);

(iii) un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa (GNA1); y/o

(iv) un polipéptido que tiene actividad
5 fosfoacetilglucosamina mutasa (PCM1).

Punto 21: El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 14 a 20, en donde la célula recombinante es un miembro del género *Saccharomyces*, y en particular es *Saccharomyces cerevisiae*.

10 Punto 22: El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 14 a 21, en donde el tiempo suficiente para producir ácido hialurónico (HA) del peso molecular deseado es un período de aproximadamente 35 horas a aproximadamente 50 horas, preferentemente de aproximadamente 40 horas a aproximadamente
15 50 horas, de preferencia aproximadamente 48 horas.

Punto 23: El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 14 a 22, en donde el peso molecular del ácido hialurónico se controla regulando el pH del medio de cultivo.

Punto 24: El método de acuerdo con cualquiera de los
20 puntos 14 a 23, en donde el método se lleva a cabo a escala industrial, de preferencia en donde el medio de cultivo es por lo menos aproximadamente 100L, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1000L a aproximadamente 3000L, incluso más preferentemente aproximadamente 10,000L, incluso
25 más preferentemente aproximadamente 100,000L, o incluso

aproximadamente 250,000L.

Punto 25: Ácido hialurónico (HA) obtenible a partir de una célula recombinante de cualquiera de los puntos 1 a 10 o del método de acuerdo con cualquiera de los puntos 14 a 24.

5 Punto 26: Un medio de cultivo que comprende el HA de acuerdo con el punto 25.

Punto 27: Una composición que comprende el ácido hialurónico (HA) de acuerdo con el punto 24.

Punto 28: Un producto industrial o un producto de consumo
10 o un consumible que comprende (i) el HA de acuerdo con el punto 25, (ii) el medio de cultivo del Punto 26 o (iii) la composición del Punto 27.

Punto 29: El producto industrial o el producto de consumo o el consumible del punto 27, en donde el producto industrial
15 o el producto de consumo o el consumible es un producto cosmético, un producto de sabor, un producto de fragancia, un producto alimenticio, un alimento, una bebida, un texturante, una composición farmacéutica, un suplemento dietético, un nutraceutico, un producto de limpieza y/o un producto dental
20 y/o una composición de higiene bucal.

Punto 30: Uso de una célula recombinante como se define en cualquiera de los puntos 1 a 13 para la producción de ácido hialurónico (HA) que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 50 kDa o de
25 aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 1000 kDa.

Punto 31: Un método para producir ácido hialurónico que comprende las etapas de:

(a) cultivar una levadura recombinante como se define en cualquiera de los puntos 1 y 3 a 12 en un medio de cultivo; y

5 (b) recuperar el ácido hialurónico de tal medio de cultivo,

en donde el ácido hialurónico recuperado en la etapa (b) tiene un peso molecular controlado mediante la selección de:

- la naturaleza y el origen del ácido nucleico que
10 codifica la hialuronidasa de la levadura recombinante,

- la naturaleza y el origen del promotor que controla la expresión del ácido nucleico que codifica la(s) hialuronidasa(s) de la levadura recombinante,

- la presencia de un anclaje y/o de una señal de secreción
15 asociada a la(s) hialuronidasa(s) codificada(s) de la levadura recombinante,

- el pH del medio de cultivo durante la etapa de cultivo de la levadura recombinante, y/o

- la duración del cultivo de la levadura recombinante.

20 Algunas modalidades de la presente invención pueden proporcionar una o más de las siguientes ventajas:

- un proceso para producir ácido hialurónico de peso molecular controlado;

- un proceso para producir ácido hialurónico de peso
25 molecular controlado en una célula de levadura *Saccharomyces*;

y

- un proceso para producir ácido hialurónico de peso molecular controlado variando parámetros genéticos (por ejemplo, secuencias reguladoras) y/o parámetros de proceso (pH o tiempo de fermentación).

Los detalles, ejemplos y preferencias proporcionados en relación con uno o más aspectos particulares de la presente invención se describirán con más detalle en la presente y se aplicarán por igual a todos los aspectos de la presente invención. Cualquier combinación de las modalidades, ejemplos y preferencias descritas en el presente documento en todas sus posibles variaciones está abarcada por la presente invención a menos que se indique lo contrario en la presente o que el contexto lo contradiga claramente.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra una ruta esquemática para la producción de ácido hialurónico.

Las Figuras 2A y 2B muestran geles de agarosa usados para determinar el peso molecular del ácido hialurónico producido por cepas de acuerdo con la invención (por ejemplo, la cepa YA5235-1 (Figura 2A) y la cepa YA5359-10 (Figura 2B)). Los geles de agarosa se obtienen después de analizar una alícuota del sobrenadante de la cepa considerada y teñirla con "stains all" (Número CAS 7423-31-6). Los estándares de peso molecular de HA están presentes en cada gel como referencia.

Breve Descripción de las Secuencias

SEC. ID NO.: 1 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronano sintasa (HASA) procedente del *virus Chlorella PBCV-1*.

5 SEC. ID NO.: 2 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronano sintasa (HASA) procedente del *virus Chlorella PBCV-1*.

SEC. ID NO.: 3 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronano sintasa (HASA) procedente de
10 *Pasteurella multocida*.

SEC. ID NO.: 4 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronano sintasa (HASA) procedente de *Pasteurella multocida*.

SEC. ID NO.: 5 es una secuencia de ácido nucleico
15 recodificada de hialuronano sintasa (HASA) procedente de *Pasteurella multocida*.

SEC. ID NO.: 6 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronano sintasa (HASA) procedente de *Xenopus laevis*.

20 SEC. ID NO.: 7 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronano sintasa (HASA) procedente de *Streptococcus zooepidemicus*.

SEC. ID NO.: 8 es una secuencia de aminoácidos de hialuronano sintasa (HASA) procedente del *virus Chlorella PBCV-1*.
25

SEC. ID NO.: 9 es una secuencia de aminoácidos de hialuronano sintasa (HASA) procedente de *Pasteurella multocida*.

SEC. ID NO.: 10 es una secuencia de aminoácidos de hialuronano sintasa (HASA) procedente de *Xenopus laevis*.

SEC. ID NO.: 11 es una secuencia de aminoácidos de hialuronano sintasa (HASA) procedente de *Streptococcus zooepidemicus*.

SEC. ID NO.: 12 es una secuencia de ácido nucleico de UDP-glucosa deshidrogenasa (HASB) procedente de *Arabidopsis thaliana*.

SEC. ID NO.: 13 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de UDP-glucosa deshidrogenasa (HASB) procedente del virus *Chlorella PBCV-1*.

SEC. ID NO.: 14 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de UDP-glucosa deshidrogenasa (HASB) procedente del virus *Chlorella PBCV-1*.

SEC. ID NO.: 15 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de UDP-glucosa deshidrogenasa (HASB) procedente de *Streptococcus zooepidemicus*.

SEC. ID NO.: 16 es una secuencia de aminoácidos de UDP-Glucosa deshidrogenasa (HASB) procedente de *Arabidopsis thaliana*.

SEC. ID NO.: 17 es una secuencia de aminoácidos de UDP-Glucosa deshidrogenasa (HASB) procedente del virus *Chlorella*

PBCV1.

SEC. ID NO.: 18 es una secuencia de aminoácidos de UDP-Glucosa deshidrogenasa (HASB) procedente de *Streptococcus zooepidemicus*.

5 SEC. ID NO.: 19 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Bothrops atrox* con una señal de secreción N-terminal.

10 SEC. ID NO.: 20 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Bothrops atrox* con una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal.

SEC. ID NO.: 21 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Cupiennius salei* con una señal de secreción N-terminal.

15 SEC. ID NO.: 22 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Cupiennius salei* con una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal.

20 SEC. ID NO.: 23 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Hirudo nipponia* con una señal de secreción N-terminal.

25 SEC. ID NO.: 24 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Hirudo nipponia* con una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal.

SEC. ID NO.: 25 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Loxosceles intermedia* con una señal de secreción N-terminal.

5 SEC. ID NO.: 26 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Loxosceles intermedia* con una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal.

SEC. ID NO.: 27 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Tityus serrulatus* con una señal de secreción N-terminal.

SEC. ID NO.: 28 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Tityus serrulatus* con una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal.

15 SEC. ID NO.: 29 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Vespa magnifica* con una señal de secreción N-terminal.

SEC. ID NO.: 30 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Vespa magnifica* con una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal.

SEC. ID NO.: 31 es una secuencia de aminoácidos de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Bothrops atrox* con una señal de secreción N-terminal.

25 SEC. ID NO.: 32 es una secuencia de aminoácidos de

hialuronidasa (HYAL) procedente de *Bothrops atrox* con una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal.

SEC. ID NO.: 33 es una secuencia de aminoácidos de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Cupiennius salei* con una
5 señal de secreción N-terminal

SEC. ID NO.: 34 es una secuencia de aminoácidos de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Cupiennius salei* con una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal.

10 SEC. ID NO.: 35 es una secuencia de aminoácidos de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Hirudo nipponia* con una señal de secreción N-terminal.

SEC. ID NO.: 36 es una secuencia de aminoácidos de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Hirudo nipponia* con una
15 señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal.

SEC. ID NO.: 37 es una secuencia de aminoácidos de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Loxosceles intermedia* con una señal de secreción N-terminal.

20 SEC. ID NO.: 38 es una secuencia de aminoácidos de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Loxosceles intermedia* con una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal.

SEC. ID NO.: 39 es una secuencia de aminoácidos de
25 hialuronidasa (HYAL) procedente de *Tityus serrulatus* con una

señal de secreción N-terminal.

SEC. ID NO.: 40 es una secuencia de aminoácidos de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Tityus serrulatus* con una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal.

SEC. ID NO.: 41 es una secuencia de aminoácidos de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Vespa magnifica* con una señal de secreción N-terminal.

SEC. ID NO.: 42 es una secuencia de aminoácidos de hialuronidasa (HYAL) procedente de *Vespa magnifica* con una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal.

SEC. ID NO.: 43 es una secuencia de ácido nucleico de la secuencia de secreción adicionada en 5'

SEC. ID NO.: 44 es una secuencia de aminoácidos de la secuencia de secreción adicionada en N-ter

SEC. ID NO.: 45 es una secuencia de ácido nucleico de la secuencia de anclaje adicionada en 3'

SEC. ID NO.: 46 es una secuencia de aminoácidos de la secuencia de anclaje adicionada en C-ter

SEC. ID NO.: 47 es una secuencia de ácido nucleico de glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA1) procedente de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEC. ID NO.: 48 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa

(GFA1) procedente del *virus Chlorella 1* (PBCV-1)

SEC. ID NO.: 49 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA1) procedente del *virus Chlorella 1* (PBCV-1)

5 SEC. ID NO.: 50 es una secuencia de aminoácidos de glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA1) procedente de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEC. ID NO.: 51 es una secuencia de aminoácidos de glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA1)
10 procedente del *virus Chlorella 1* (PBCV-1)

SEC. ID NO.: 52 es una secuencia de ácido nucleico de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa (QRI1) procedente de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEC. ID NO.: 53 es una secuencia de aminoácidos de UDP-N-
15 acetilglucosamina pirofosforilasa (QRI1) procedente de *Saccharomyces cerevisiae*

SEC. ID NO.: 54 es una secuencia de ácido nucleico de fosfoglucomutasa-1 (PGM1) procedente de *Saccharomyces cerevisiae*.

20 SEC. ID NO.: 55 es una secuencia de aminoácidos Fosfoglucomutasa-1 (PGM1) procedente de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEC. ID NO.: 56 es una secuencia de ácido nucleico de UTP--glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (UGP1) procedente
25 de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEC. ID NO.: 57 es una secuencia de aminoácidos de UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (UGP1) procedente de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEC. ID NO.: 58 es una secuencia de ácido nucleico de
5 glucosamina 6-fosfato N-acetiltransferasa (GNA1) procedente de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEC. ID NO.: 59 es una secuencia de aminoácidos de glucosamina 6-fosfato N-acetiltransferasa (GNA1) procedente de *Saccharomyces cerevisiae*.

10 SEC. ID NO.: 60 es una secuencia de ácido nucleico de fosfoacetilglucosamina mutasa (PCM1) procedente de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEC. ID NO.: 61 es una secuencia de aminoácidos de fosfoacetilglucosamina mutasa (PCM1) procedente de
15 *Saccharomyces cerevisiae*.

SEC. ID NO.: 62 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pTDH3.

SEC. ID NO.: 63 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pTDH3.Sk

20 SEC. ID NO.: 64 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pTDH3-1.sba

SEC. ID NO.: 65 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pTDH3.Sar

SEC. ID NO.: 66 es la secuencia de ácido nucleico del
25 promotor pEN02

SEC. ID NO.: 67 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pTEF3

SEC. ID NO.: 68 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pTEF1

5 SEC. ID NO.: 69 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pTEF1.ago

SEC. ID NO.: 70 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pTEF1.Sba

10 SEC. ID NO.: 71 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pPDC1

SEC. ID NO.: 72 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pCCW12

SEC. ID NO.: 73 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pCCW12.Sm

15 SEC. ID NO.: 74 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pCCW12.Sk

SEC. ID NO.: 75 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pCCW12.Sba

20 SEC. ID NO.: 76 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pCCW12.Sar

SEC. ID NO.: 77 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pNUP57

SEC. ID NO.: 78 es la secuencia de ácido nucleico del promotor pCCW10.ago

25 SEC. ID NO.: 79 es la secuencia de ácido nucleico del

promotor pCWP2

SEC. ID NO.: 80 es la secuencia de ácido nucleico del
promotor pRPLA1

5 SEC. ID NO.: 81 es la secuencia de ácido nucleico del
promotor pCUP1

SEC. ID NO.: 82 es la secuencia de ácido nucleico del
promotor pMET6

SEC. ID NO.: 83 es la secuencia de ácido nucleico del
promotor pMET25

10 SEC. ID NO.: 84 es la secuencia de ácido nucleico del
promotor pSAM1

SEC. ID NO.: 85 es la secuencia de ácido nucleico del
terminador tTPI1

15 SEC. ID NO.: 86 es la secuencia de ácido nucleico del
terminador tMET25

SEC. ID NO.: 87 es la secuencia de ácido nucleico del
terminador tDIT1

SEC. ID NO.: 88 es la secuencia de ácido nucleico del
terminador tRPL3

20 SEC. ID NO.: 89 es la secuencia de ácido nucleico del
terminador tRPL3.sm

SEC. ID NO.: 90 es la secuencia de ácido nucleico del
terminador tRPL3.sba

25 SEC. ID NO.: 91 es la secuencia de ácido nucleico del
terminador tRPL41B

SEC. ID NO.: 92 es la secuencia de ácido nucleico del terminador tRPL15A

SEC. ID NO.: 93 es la secuencia de ácido nucleico del terminador tRPL15A.sba

5 SEC. ID NO.: 94 es la secuencia de ácido nucleico del terminador tIDP1

SEC. ID NO.: 95 es la secuencia de ácido nucleico del terminador tTEF1.sba

10 SEC. ID NO.: 96 es una secuencia de ácido nucleico de glutamina sintetasa (GLN1) procedente de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEC. ID NO.: 97 es una secuencia de aminoácidos de la glutamina sintetasa (GLN1) procedente de *Saccharomyces cerevisiae*.

15 SEC. ID NO.: 98 es una secuencia de ácido nucleico de la glutamato sintasa (GLT1) procedente de *Saccharomyces cerevisiae*.

20 SEC. ID NO.: 99 es una secuencia de aminoácidos de la glutamato sintasa (GLT1) procedente de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEC. ID NO.: 100 es la secuencia de ácido nucleico del terminador tTDH3.

25 SEC. ID NO.: 101 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronano sintasa (HASA) procedente del *virus Chlorella CviK1*.

SEC. ID NO.: 102 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronano sintasa (HASA) procedente del *virus Chlorella IL-5-2s1*.

5 SEC. ID NO.: 103 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronano sintasa (HASA) procedente del *virus Chlorella CZ-2*.

SEC. ID NO.: 104 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronano sintasa (HASA) procedente del *virus Chlorella CVG-1*.

10 SEC. ID NO.: 105 es una secuencia de aminoácidos de hialuronano sintasa (HASA) procedente del *virus Chlorella CviK1*.

15 SEC. ID NO.: 106 es una secuencia de aminoácidos de hialuronano sintasa (HASA) procedente del *virus Chlorella IL-5-2s1*.

SEC. ID NO.: 107 es una secuencia de aminoácidos de hialuronano sintasa (HASA) procedente del *virus Chlorella CZ-2*.

20 SEC. ID NO.: 108 es una secuencia de aminoácidos de hialuronano sintasa (HASA) procedente del *virus Chlorella CVG-1*.

Descripción Detallada de la Invención

Los inventores han concebido células genéticamente modificadas, y especialmente levaduras genéticamente
25 modificadas, que tienen la capacidad de producir ácido

hialurónico, en comparación con las células originales, y especialmente en comparación con las levaduras originales que no son naturalmente capaces de hacerlo.

Estas células genéticamente modificadas se describen a lo largo de la presente descripción.

Definiciones

El término "ácido hialurónico", también conocido como hialuronano o HA, es un polisacárido compuesto de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, unidos mediante enlaces glucosídicos alternos β -(1 $\rightarrow$ 4) y β -(1 $\rightarrow$ 3) y que tiene la fórmula química (C₁₄H₂₁NO₁₁)_n.

El ácido hialurónico se puede producir en una célula recombinante.

Como se usa en la presente, el término "recombinante", cuando se usa en referencia a una célula, indica que la célula ha sido modificada mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína endógeno y/o heterólogo en la célula o la alteración de una célula nativa o que la célula deriva de una célula así modificada. De esta manera, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes o ácidos nucleicos que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos (por ejemplo, endógenos) a un nivel diferente a su nivel nativo o expresan copias adicionales o suplementarias de nativos (por ejemplo, endógenos) en un nivel diferente al de su nivel nativo.

Como se usa en la presente, el término "recombinante", cuando se usa en referencia a un ácido nucleico o vector, son secuencias formadas/obtenidas mediante técnicas de ingeniería genética bien conocidas por el experimentado en la técnica. En consecuencia, las directrices del Instituto Nacional de Salud (NIH) de Estados Unidos indican que:

"Los ácidos nucleicos recombinantes [...] se definen como:

i. moléculas que (a) se construyen uniendo moléculas de ácido nucleico y (b) que pueden replicarse en una célula viva, es decir, ácidos nucleicos recombinantes;",

que refleja el uso convencional de la palabra "recombinante" unida a secuencias de ácido nucleico en el sentido de recombinado después de la inserción de otro ácido nucleico o de su unión con él.

Las proteínas que resultan de la expresión de ADN recombinante o de un vector recombinante dentro de células vivas también se denominan proteínas recombinantes.

Por consiguiente, el término "recombinante" es sinónimo del término "modificado genéticamente". El término "gen" es sinónimo del término "ácido nucleico" o "secuencia de nucleótidos".

Una secuencia de ácido nucleico recombinante para uso en una célula recombinante, y en particular en una levadura recombinante, de la invención puede proporcionarse en forma de una construcción de ácido nucleico. El término "construcción

de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico, ya sea de hebra simple o de doble hebra, que se aísla o deriva de un gen natural nativo (por ejemplo, endógeno) o es un ácido nucleico heterólogo o que se ha modificado para contener
5 segmentos de ácido nucleico que se combinan y yuxtaponen de una manera que de otro modo no existiría en la naturaleza. El término "construcción de ácido nucleico" es sinónimo del término "casete de expresión" o "casete de expresión de ácido nucleico heterólogo" cuando la construcción de ácido nucleico
10 contiene uno o más elementos reguladores necesarios para la expresión de una secuencia codificante, en el que tales secuencias de control están operativamente unidas a tal secuencia codificante. Ejemplos no limitantes de elementos reguladores incluyen promotores, potenciadores, silenciadores,
15 terminadores y señales poli-A.

Se puede proporcionar una secuencia de ácido nucleico recombinante para uso en una célula recombinante de la invención en forma de un vector de expresión, en donde la secuencia polinucleotídica está operativamente unida a por lo
20 menos una secuencia de control para la expresión de la secuencia polinucleotídica en una célula recombinante.

Los términos "obtenido de" u "originado de" u "originario de" un microorganismo o animal generalmente significan que una sustancia (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o
25 polipéptido) que se origina en el microorganismo o animal es

nativa de tal microorganismo o animal.

Los términos "derivado de" un microorganismo o animal generalmente significan que una sustancia (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o polipéptido) derivada del
5 microorganismo o animal es el resultado de modificaciones introducidas en la sustancia nativa (es decir, presente como tal) en ese microorganismo o animal. Por ejemplo, con respecto a una secuencia de ácido nucleico derivada de un microorganismo o animal, tal secuencia de ácido nucleico puede corresponder a
10 una versión recodificada y/o truncada de la secuencia de ácido nucleico nativa de este microorganismo o animal. Se pueden aportar otras modificaciones bien conocidas por el experimentado en la técnica a la sustancia nativa de un microorganismo o animal, dando lugar a que la sustancia usada
15 "deriva de" tal microorganismo o animal.

Como se usa en la presente, el término "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y que contiene más de cinco residuos de aminoácidos. Los aminoácidos se identifican
20 mediante designaciones de una o tres letras. El término "proteína", tal como se usa en la presente es sinónimo del término "polipéptido" y también puede referirse a dos o más polipéptidos. Por lo tanto, los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" pueden usarse indistintamente. Los
25 polipéptidos pueden modificarse opcionalmente (por ejemplo,

glicosilados, fosforilados, acilados, farnesilados, prenilados, sulfonados y similares) para adicionar funcionalidad. Los polipéptidos que exhiben actividad podrían denominarse como enzimas. Se entenderá que, como resultado de la degeneración del código genético, se pueden producir una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido determinado.

Un polipéptido codificado por un ácido nucleico recombinante para uso en una célula recombinante, y en particular en una levadura recombinante, de la invención puede comprender un péptido señal y/o una secuencia propeptídica. En el caso de que un polipéptido expresado por una célula recombinante, y en particular una levadura recombinante, de la invención comprenda un péptido señal y/o un propéptido, la identidad de secuencia puede calcularse sobre la secuencia del polipéptido maduro.

El término "unido operativamente" como se usa en la presente, se refiere a dos o más elementos de secuencia de ácido nucleico que están unidos físicamente y tienen una relación funcional entre sí. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si el promotor es capaz de iniciar o regular la transcripción o expresión de la secuencia codificante, en cuyo caso debe entenderse que la secuencia codificante está "bajo el control de" el promotor. En general, cuando dos secuencias de ácidos nucleicos están

operativamente unidas, estarán en la misma orientación y normalmente también en el mismo marco de lectura. En general serán esencialmente contiguos, aunque esto puede no ser necesario.

5 El término “nativo” o “endógeno” como se usa en la presente, con referencia a moléculas, y en particular enzimas y ácidos nucleicos, indica moléculas que se expresan en el organismo en el que se originaron o se encuentran en la naturaleza.

10 El término “gen endógeno” significa que el gen estaba presente en la célula antes de cualquier modificación genética, en la cepa de tipo salvaje. Los genes endógenos pueden sobreexpresarse introduciendo secuencias heterólogas además de, o para reemplazar, elementos reguladores endógenos, o
15 introduciendo una o más copias adicionales o suplementarias del gen en el cromosoma o en un plásmido (denominándose tales copias adicionales o suplementarias “genes exógenos o heterólogos” o “secuencias de nucleótidos heterólogos” o “ácidos nucleicos heterólogos” como se define en la presente).

20 Los genes endógenos también pueden modificarse para modular su expresión y/o actividad. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones en la secuencia codificante para modificar el producto génico o se pueden introducir secuencias heterólogas además de o para reemplazar elementos reguladores endógenos.

25 La modulación de un gen endógeno puede dar como resultado la

regulación positiva y/o el mejoramiento de la actividad del producto génico o, alternativamente, la regulación negativa y/o la atenuación de la actividad del producto génico endógeno. Otra forma de mejorar la expresión de genes endógenos es
5 introducir una o más copias adicionales o suplementarias del gen en el cromosoma o en un plásmido (estas copias suplementarias se denominan "genes exógenos o heterólogos" o "secuencias de nucleótidos heterólogos" o ácidos nucleicos heterólogos", tal como se define en la presente).

10 Por "una o más copias adicionales o suplementarias de un gen" de acuerdo con la invención, se entiende, por ejemplo, en la presente invención de 1 a 50 copias, en particular de 1 a 30 copias, más particularmente de 1 a 20 copias, y preferentemente de 1 a 10 copias. Estas copias pueden
15 insertarse en el mismo locus o en loci diferentes de una célula recombinante de la invención.

El término "gen exógeno" significa que el gen se introdujo en una célula, por medios bien conocidos por el experimentado en la técnica, mientras que este gen se produce o no de forma
20 natural en la célula de tipo salvaje. Las células pueden expresar genes exógenos si estos genes se introducen en la célula con todos los elementos que permiten su expresión en la célula. Transformar células con ADN exógeno es una tarea rutinaria para el experimentado en la técnica. Los genes
25 exógenos pueden integrarse en el cromosoma del hospedero o

expresarse extracromosómicamente a partir de plásmidos o vectores. En la técnica se conocen diversos plásmidos, que difieren con respecto a su origen de replicación y su número de copias en la célula. La secuencia de genes exógenos puede adaptarse para su expresión en la célula. De hecho, el experimentado en la técnica conoce la noción de sesgo de uso de codones y cómo adaptar secuencias nucleicas para un sesgo de uso de codones particular sin modificar la proteína deducida. En modalidades particulares, los genes con codones optimizados expresan enzimas nativas.

El término "gen heterólogo" o secuencia de ácido nucleico heterólogo" se refiere a un gen o secuencia de ácido nucleico que normalmente no se encuentra en una célula determinada en la naturaleza. Como tal, una secuencia de ácido nucleico heteróloga puede ser: (a) extraña a su célula hospedera (es decir, es "exógena" a la célula); (b) se encuentra naturalmente en la célula hospedera (es decir, "endógeno"), pero está presente en una cantidad no natural en la célula (es decir, mayor o menor cantidad que la que se encuentra naturalmente en la célula hospedera); o (c) encontrarse de forma natural en la célula hospedera, pero situado fuera de su lugar natural.

En la presente solicitud, se hace referencia a todos los genes con sus nombres comunes y con referencias a sus secuencias de nucleótidos y, en su caso, a sus secuencias de aminoácidos. Usando las referencias dadas en el número de

acceso para genes conocidos, los experimentados en la técnica pueden determinar los genes equivalentes en otros organismos, cepas bacterianas, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, etc. Este trabajo de rutina se realiza ventajosamente usando
5 secuencias consenso que puede determinarse realizando alineamientos de secuencias con genes derivados de otras células y diseñando sondas degeneradas para clonar el gen correspondiente en otro organismo.

El experimentado en la técnica conoce diferentes medios
10 para modular, y en particular sobre-regular o sub-regular, la expresión de genes endógenos. Por ejemplo, una forma de mejorar la expresión o sobreexpresar genes endógenos es introducir una o más copias adicionales o suplementarias del gen en el cromosoma o en un plásmido.

15 Otra forma es reemplazar el promotor endógeno de un gen por un promotor más fuerte. Estos promotores pueden ser homólogos o heterólogos. Los promotores particularmente interesantes en la presente invención se describen con más detalle en otra parte de la presente descripción.

20 La construcción de expresión de ácido nucleico además puede comprender secuencias de reconocimiento y/o marcadores de selección 5' y/o 3'.

El término "promotor inducible" se usa para calificar a un promotor cuya actividad es inducida, es decir aumentada:

25 - en presencia de uno o más metabolitos particulares.

Cuanto mayor sea la concentración de metabolitos en el medio, más fuerte será la actividad promotora; o

- en presencia de una concentración baja, o en ausencia, de uno o más metabolitos. Estos metabolitos son diferentes de aquellos cuya presencia creciente induce la actividad del promotor. Cuanto menor sea la concentración de metabolitos en el medio, más fuerte será la actividad promotora.

El término "promotor reprimible" se usa para calificar a un promotor cuya actividad está reprimida, es decir, reducida:

- en presencia de uno o más metabolitos particulares. Cuanto mayor sea la concentración de metabolitos en el medio, más débil será la actividad promotora; o

- en presencia de una concentración baja, o en ausencia, de uno o más metabolitos. Estos metabolitos son diferentes de aquellos cuya presencia creciente reprime la actividad del promotor. Cuanto menor sea la concentración del metabolito en el medio, más débil será la actividad del promotor.

Como se usa en la presente, el término "señal de anclaje" cuando se usa junto con una proteína o polipéptido, tal como una enzima (tal como, por ejemplo, hialuronidasa) significa, por ejemplo, un primer ácido nucleico que codifica una proteína que está operativamente unida a un segundo ácido nucleico que codifica una proteína o un polipéptido, o una primera proteína o polipéptido que está operativamente unido a una segunda proteína o polipéptido, tal como una enzima (tal como, por

ejemplo, hialuronidasa para formar, por ejemplo, una proteína de fusión), y que permite que la maquinaria de transporte celular de una célula, en particular de una célula de *S. cerevisiae*, ancle y/o posicione correctamente en la membrana de la célula la segunda proteína unida operativamente a la primera proteína.

Como se usa en la presente, el término "señal de secreción" cuando se usa junto con una proteína o polipéptido tal como una enzima (tal como, por ejemplo, hialuronidasa) significa, por ejemplo, un primer ácido nucleico que codifica un péptido o proteína que está operativamente unido a una segunda ácido nucleico que codifica una proteína, o una primera proteína que está unida a una segunda proteína, como por ejemplo una enzima (como, por ejemplo, hialuronidasa para formar, por ejemplo, una proteína de fusión), y que permite la maquinaria de transporte celular de una célula, en particular de una célula de *S. cerevisiae*, localice por lo menos la segunda proteína en la membrana de la célula y secrete la segunda proteína fuera de la célula, después de que la primera proteína se haya escindido, por ejemplo, de la segunda proteína.

Como se usan en la presente los términos "señal de secreción" y "señal de anclaje" cuando se usan junto con una proteína o polipéptido, tal como una enzima (tal como, por ejemplo, hialuronidasa), significan, por ejemplo, un primer

ácido nucleico que codifica un péptido o proteína que está unida operativamente a un segundo ácido nucleico que codifica una proteína, o una primera proteína que está unida operativamente a una segunda proteína, tal como una enzima (tal como, por ejemplo, hialuronidasa), y que permite la maquinaria de transporte celular de una célula, en particular de una célula de *S. cerevisiae*, localice por lo menos la segunda proteína en la membrana de la célula, en donde si la segunda proteína también está unida operativamente a una “señal de anclaje”, la segunda proteína no se secreta sino que permanece unida a la membrana de la célula. En algunos casos, una señal de anclaje de secreción puede proporcionar una función dual de señal de secreción y señal de anclaje.

Las secuencias de señales de secreción y anclaje, métodos para la expresión, anclaje y/o secreción de proteínas heterólogas, tales como enzimas (como, por ejemplo, hialuronidasa) en la superficie de una célula (como, por ejemplo, una célula de levadura), son bien conocidos en la técnica (ver por ejemplo, Ast *et al.*, (2013) *Cell* 152: 1134-1145, Ast and Schuldiner (2013) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48(3) 273-288, Van der Vaart *et al.*, (1997) *Applied Environmental Microbiology* 63(2) 615-620 y el contenido completo de cada una de estas publicaciones se incorpora en la presente por referencia).

La “actividad” de una enzima se usa indistintamente con

el término “función” y designa, en el contexto de la invención, la capacidad de una enzima para catalizar una reacción deseada. La cantidad de una enzima en una célula hospedera puede alterarse modificando la transcripción del gen que codifica la enzima. Esto se puede lograr, por ejemplo, modificando el número de copias de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima (por ejemplo, usando un vector de expresión con un número de copias mayor o menor que comprende la secuencia de nucleótidos, o introduciendo copias adicionales de la secuencia de nucleótidos en el genoma de la célula hospedera o eliminando o interrumpiendo la secuencia de nucleótidos en el genoma de la célula hospedera), cambiando el orden de las secuencias codificantes en un ARNm policistrónico de un operón o rompiendo un operón en genes individuales, cada uno con sus propios elementos de control, o aumentando la concentración del promotor u operador al que se enlaza operativamente la secuencia de nucleótidos.

Alternativamente o además, el número de copias de una enzima en una célula hospedera puede alterarse modificando el nivel de traducción de un ARNm que codifica la enzima. Esto se puede lograr por ejemplo modificando la estabilidad del ARNm, modificando la secuencia del sitio de unión al ribosoma, modificando la distancia o secuencia entre el sitio de unión al ribosoma y el codón de inicio de la secuencia codificante de la enzima, modificando toda la región intercistrónica

ubicada "en la dirección 5' de" o adyacente al lado 5' del
codón de inicio de la región codificante de la enzima,
estabilizando el extremo 3' de la transcripción de ARNm usando
horquillas y secuencias especializadas, modificando el uso de
5 codones de la enzima, alterando la expresión de los ARNt de
codones raros usados en la biosíntesis de la enzima, y/o
aumentando la estabilidad de la enzima, como, por ejemplo,
mediante mutación de su secuencia codificante.

La actividad de una enzima en una célula hospedera se
10 puede alterar de varias maneras, incluyendo, entre otras,
expresando una forma modificada de la enzima que exhibe una
mayor o menor solubilidad en la célula hospedera, expresando
una forma alterada de la enzima que carece de un dominio a
través del cual se inhibe la actividad de la enzima, expresando
15 una forma modificada de la enzima que tiene una K_{cat} mayor o
menor o una K_m menor o mayor para el sustrato, o expresando
una forma alterada de la enzima que es más o menos afectada
por la regulación de retroalimentación o retroalimentación por
parte de otra molécula en la vía.

20 Los términos "que codifica" o "codificar" se refieren al
proceso mediante el cual un polinucleótido, a través de los
mecanismos de transcripción y traducción, produce una secuencia
de aminoácidos.

El gen o genes que codifican la enzima o enzimas
25 consideradas en la presente invención pueden ser exógenos

o endógenos.

Los métodos implementados en la presente invención requieren preferentemente el uso de una o más construcciones de integración cromosómica para la introducción estable de una
5 secuencia de nucleótidos heteróloga en una ubicación específica en un cromosoma o para la alteración funcional de uno o más genes blanco en una célula genéticamente modificada. En algunas modalidades, la alteración de un gen blanco previene la expresión de la proteína funcional relacionada. En algunas
10 modalidades, la alteración de un gen blanco da como resultado la expresión de una proteína no funcional a partir del gen alterado.

En consecuencia, un "ácido nucleico endógeno alterado" en la presente invención se refiere a un ácido nucleico endógeno,
15 o gen, incapaz de codificar la proteína o polipéptido funcional o completamente funcional que codifica antes de ser alterado. El ácido nucleico puede alterarse, por ejemplo, mediante la introducción de una construcción de integración en el ácido nucleico, como se ilustra en los ejemplos. Esta integración
20 puede, por ejemplo, prevenir la expresión de la proteína o polipéptido funcional relacionado o dar como resultado la expresión de una proteína o polipéptido no funcional o no completamente funcional a partir del gen alterado.

Los parámetros de construcciones de integración
25 cromosómica que pueden variarse en la práctica de la presente

invención incluyen, entre otros, las longitudes de las secuencias homólogas; la secuencia de nucleótidos de las secuencias homólogas; la longitud de la secuencia integradora; la secuencia de nucleótidos de la secuencia integradora; y la
5 secuencia de nucleótidos del locus blanco. En algunas modalidades, un intervalo eficaz para la longitud de cada secuencia homóloga es de 20 a 5000 pares de bases, de preferencia de 50 a 100 pares de bases. En modalidades particulares, la longitud de cada secuencia homóloga es de
10 aproximadamente 50 pares de bases. Para obtener más información sobre la duración de la homología requerida para la selección de genes, ver D. Burke *et al.*, Methods in yeast Genetics - A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual (2000).

En algunas modalidades, (a) gen(es) alterado(s) en el(los)
15 constructo(s) de ADN mencionado(s) anteriormente que se pretende insertar, puede comprender ventajosamente uno o más marcadores seleccionables útiles para la selección de células transformadas. De preferencia, estos marcadores seleccionables están comprendidos en las construcciones de ADN de acuerdo con
20 la presente invención.

En algunas modalidades, el marcador seleccionable es un marcador de resistencia a antibióticos. Los ejemplos ilustrativos de marcadores de resistencia a antibióticos incluyen, entre otros, los productos genéticos NAT1, AUR1-C,
25 HPH, DSDA, KAN® y SH BLE. El producto del gen NAT 1 de *S.*

noursei confiere resistencia a la nourseotricina; el producto del gen AUR1-C de *Saccharomyces cerevisiae* confiere resistencia a la aerobasidina A (AbA); el producto del gen HPH de *Klebsiella pneumoniae* confiere resistencia a la higromicina B; el producto del gen DSDA de *E. coli* permite que las células crezcan en placas con D-serina como única fuente de nitrógeno; el gen KAN<R> del transposón Tn903 confiere resistencia al G418; y el producto del gen SH BLE de *Streptoalloteichus hindustanus* confiere resistencia a la zeocina (bleomicina).

En algunas modalidades, el marcador de resistencia a antibióticos se elimina después de aislar la célula genéticamente modificada de la invención. El experimentado en la técnica es capaz de elegir un marcador adecuado en un contexto genético específico.

En una modalidad particular, una célula recombinante de acuerdo con la invención carece de cualquier marcador de resistencia a antibióticos. Esto evita ventajosamente la necesidad de agregar antibióticos al medio de selección.

En algunas modalidades, el marcador seleccionable rescata una auxotrofia (por ejemplo, una auxotrofia nutricional) en la célula genéticamente modificada. En tales modalidades, una célula parental, y en particular una levadura parental, comprende una alteración funcional en uno o más productos génicos que funcionan en una vía biosintética de aminoácidos o nucleótidos, tales como, por ejemplo, los productos génicos

HIS3, LEU2, LYS1, LYS2, MET15, TRP1, ADE2 y URA3 en levadura, lo que hace que la célula madre sea incapaz de crecer en medios sin suplementación con uno o más nutrientes (fenotipo auxotrófico). Luego, el fenotipo auxotrófico puede rescatarse transformando la célula parental con una integración cromosómica que codifica una copia funcional del producto génico alterado (en algunas modalidades, la copia funcional del gen puede originarse en especies cercanas, tales como *Kluveromyces*, *Candida*, etc.), y la célula genéticamente modificada generada se puede seleccionar basándose en la pérdida del fenotipo auxotrófico de la célula microbiana original.

Para cada una de las secuencias de ácido nucleico que comprenden una secuencia promotora, una secuencia codificante (por ejemplo, una secuencia codificante de enzima) o una secuencia terminadora, en la presente se describen secuencias de referencia. La presente descripción también abarca secuencias de ácidos nucleicos que tienen porcentajes específicos de identidad de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos de referencia.

Para cada una de las secuencias de aminoácidos de interés, en la presente se describen secuencias de referencia. La presente descripción también abarca secuencias de aminoácidos (por ejemplo, secuencias de aminoácidos enzimáticas), que tienen porcentajes específicos de identidad de aminoácidos con

una secuencia de aminoácidos de referencia.

Por razones obvias, en toda la presente descripción, una secuencia de ácido nucleico específica o una secuencia de aminoácidos específica que cumpla, respectivamente, con la
5 identidad de nucleótidos o aminoácidos considerada, debería conducir además a la obtención de una proteína (o enzima) que presente la actividad biológica deseada. Como se usa en la presente, el "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácidos nucleicos o entre dos secuencias de aminoácidos se
10 determina comparando ambas secuencias óptimamente alineadas a través de una ventana de comparación.

La porción de la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos en la ventana de comparación puede incluir así adiciones o eliminaciones (por ejemplo "espacios") en comparación con la
15 secuencia de referencia (que no incluye estas adiciones o eliminaciones) para obtener una alineación óptima entre ambas secuencias.

Los términos "homología de secuencia" o "identidad de secuencia" u "homología" o "identidad" se usan indistintamente
20 en la presente. En el sentido de la invención se define en la presente que para determinar el porcentaje de homología de secuencia o de identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima. Para
25 optimizar el alineamiento entre las dos secuencias se pueden

introducir espacios en cualquiera de las dos secuencias que se comparan. Tal alineación se puede llevar a cabo en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Alternativamente, la alineación se puede llevar a cabo en una longitud más corta, por ejemplo, en aproximadamente 20, aproximadamente 50, aproximadamente 100 o más ácidos nucleicos/base o aminoácidos. La identidad de secuencia es el porcentaje de coincidencias idénticas entre las dos secuencias sobre la región alineada reportada.

Se puede realizar una comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias usando un algoritmo matemático. El experimentado en la técnica será consciente del hecho de que están disponibles varios programas de computadora diferentes para alinear dos secuencias y determinar la identidad entre dos secuencias (Kruskal, J. B. (1983) An overview of sequence comparison In D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, pp. 1-44 Addison Wesley).

El porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch para el alineamiento de dos secuencias. (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). El algoritmo puede alinear tanto las secuencias de aminoácidos como las

secuencias de nucleótidos. El algoritmo Needleman-Wunsch se ha implementado en el programa informático NEEDLE.

Para los fines de la invención se usó el programa NEEDLE del paquete EMBOSS (versión 2.8.0 o superior, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden J. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) páginas 276–277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Para secuencias de proteínas, se usa EBLOSUM62 para la matriz de sustitución. Para la secuencia de nucleótidos, se usa EDNAFULL. Los parámetros opcionales usados son una penalización por apertura de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0.5. No se agrega ninguna penalización del espacio final. En la sección Salida, se ha indicado Sí en respuesta a la pregunta “Breve identidad y similitud” y “SRS por pares” se ha indicado como formato de alineación de salida.

Después del alineamiento mediante el programa NEEDLE como se describió anteriormente, el porcentaje de identidad de secuencia entre una secuencia de consulta y una secuencia de la invención se calcula de la siguiente manera: Número de posiciones correspondientes en el alineamiento que muestran un aminoácido idéntico o un nucleótido idéntico en ambas secuencias dividido por el longitud total de la alineación después de restar el número total de espacios en la alineación. La identidad definida en la presente se puede obtener de NEEDLE usando la opción NOBRIEF y está etiquetada en la salida del

programa como "identidad más larga".

La similitud de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, es decir, el porcentaje de identidad de secuencia, se puede determinar mediante alineamientos de secuencia usando
5 varios otros algoritmos conocidos en la técnica, de preferencia con el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877), con hmmalign (paquete HMMER, <http://hmmer.wustl.edu/>) o con el algoritmo CLUSTAL (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson,
10 T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80) disponibles, por ejemplo, en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> o el programa GAP (algoritmo matemático de la Universidad de Iowa) o el algoritmo matemático de Myers y Miller (1989 - Cabios 4: 11-17) o Clone Manager 9. Los parámetros preferidos usados son
15 los parámetros predeterminados tal como se configuran en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

El grado de identidad de secuencia (coincidencia de secuencia) se puede calcular usando, por ejemplo, BLAST, BLAT o BlastZ (o BlastX). Se incorpora un algoritmo similar en los
20 programas BLASTN y BLASTP de Altschul *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410. Las búsquedas de polinucleótidos BLAST se realizan con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de polinucleótidos que sean homólogas a aquellos ácidos nucleicos que codifican la
25 proteína relevante.

Las búsquedas de proteínas BLAST se realizan con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas al polipéptido SHC. Para obtener alineamientos con espacios con fines comparativos, se usa Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402. Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros predeterminados de los respectivos programas. El análisis de coincidencia de secuencias puede complementarse con técnicas de mapeo de homología establecidas como Shuffle-LAGAN (Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Supl. 1: 154-162) o campos aleatorios de Markov. Cuando en la presente solicitud se hace referencia a porcentajes de identidad de secuencia, estos porcentajes se calculan en relación con la longitud total de la secuencia más larga, si no se indica específicamente lo contrario.

En modalidades particulares, el % de identidad entre dos secuencias se determina usando CLUSTAL O (versión 1.2.4).

La "fermentación" o "cultivo" se realiza generalmente en fermentadores con un medio de cultivo apropiado adaptado a la célula que se está cultivando, que contiene por lo menos una fuente de carbono simple y, si es necesario, co-sustratos.

El término "composición de fermentación" se refiere a una composición que comprende células hospederas genéticamente modificadas y productos o metabolitos producidos por las células hospederas genéticamente modificadas. Un ejemplo de

una composición de fermentación es un caldo de células completas, que puede ser el contenido completo de un recipiente (por ejemplo, un matraz, una placa o un fermentador), incluidas las células, la fase acuosa y los compuestos producidos a partir de las células hospederas genéticamente modificadas.

El término "medio" se refiere a un medio de cultivo o medio de cultivo o medio de fermentación.

Para una producción máxima de ácido hialurónico, las células recombinantes usadas como hospederos de producción tienen preferentemente una alta tasa de uso de carbohidratos. Estas características pueden ser conferidas por mutagénesis y selección, ingeniería genética o pueden ser naturales. Los medios de fermentación, o "medio de cultivo" o "medio de cultivación", para las presentes células pueden contener por lo menos aproximadamente 10 g/L de glucosa y/o sacarosa. Los sustratos de carbono adicionales pueden incluir, entre otros, monosacáridos, tales como fructosa, manosa, xilosa y arabinosa; oligosacáridos, tales como lactosa, maltosa, galactosa o sacarosa; polisacáridos, tales como almidón o celulosa o mezclas de los mismos y mezclas no purificadas de materias primas renovables, tales como licor de maíz impregnado de suero de queso, melaza de remolacha azucarera y malta de cebada. Otros sustratos de carbono pueden incluir glicerol, acetato y/o etanol.

Por lo tanto, se contempla que la fuente de carbono usada

en la presente invención puede abarcar una amplia variedad de sustratos que contienen carbono y sólo estará limitada por la elección de la célula y, en particular, de la levadura.

Aunque se contempla que todos los sustratos de carbono mencionados anteriormente y sus mezclas son adecuados en la presente invención, los sustratos de carbono preferidos son glucosa, fructosa y sacarosa, o mezclas de estos con azúcares C5, tales como xilosa y/o arabinosa para células y en particular levaduras, modificadas para usar azúcares C5, y más particularmente glucosa.

Los sustratos de carbono preferidos son glucosa o sacarosa.

Además de una fuente de carbono apropiada, los medios de fermentación pueden contener minerales, sales, cofactores, amortiguadores y otros componentes adecuados, conocidos por los experimentados en la técnica, adecuados para el crecimiento de los cultivos y la promoción de la ruta enzimática necesaria para la producción del producto deseado.

Además, se pueden considerar modificaciones genéticas adicionales adecuadas para el crecimiento de células recombinantes de acuerdo con la invención.

Los términos "condiciones aeróbicas" se refieren a concentraciones de oxígeno en el medio de cultivo que son suficientes para que una célula aeróbica o anaeróbica facultativa, y en particular una levadura, use di-oxígeno como

aceptor terminal de electrones.

“Condición microaeróbica” se refiere a un medio de cultivo en el que la concentración de oxígeno es menor que la del aire, es decir, una concentración de oxígeno de hasta 6% de O_2 .

5 Un “medio de cultivo apropiado” designa un medio (por ejemplo, un medio líquido estéril) que comprende nutrientes esenciales o beneficiosos para el mantenimiento y/o crecimiento de la célula, tales como fuentes de carbono o sustrato de carbono, fuentes de nitrógeno, por ejemplo, peptona, extractos
10 de levadura, extractos de carne, extractos de malta, urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio y fosfato de amonio; fuentes de fósforo, por ejemplo, fosfato monopotásico o fosfato dipotásico; oligoelementos (por ejemplo, sales metálicas), por ejemplo sales de magnesio, sales
15 de cobalto y/o sales de manganeso; así como factores de crecimiento, tales como aminoácidos, vitaminas, promotores de crecimiento y similares. El término “fuente de carbono” o “sustrato de carbono” o “fuente de carbono” de acuerdo con la presente invención representa cualquier fuente de carbono que
20 los experimentados en la técnica pueden usar para soportar el crecimiento normal de una célula, incluidas hexosas (tales como glucosa, galactosa o lactosa), pentosas, monosacáridos, oligosacáridos, disacáridos (tales como sacarosa, celobiosa o maltosa), melazas, almidón o sus derivados, celulosa,
25 hemicelulosas y combinaciones de los mismos.

Los medios de cultivo que son particularmente apropiados para producir células recombinantes de la invención, y en particular levaduras recombinantes de la invención, se describen con mayor detalle más adelante en el texto.

5 Como se usa en la presente, el término "aproximadamente" se refiere a un intervalo razonable alrededor de un valor determinado por el experimentado en la técnica. En determinadas modalidades, el término aproximadamente se refiere a $\pm$ una, dos o tres desviaciones estándar. En determinadas modalidades,
 10 el término aproximadamente se refiere a $\pm$ 5%, 10%, 20% ó 25%. En determinadas modalidades, el término aproximadamente se refiere a $\pm$ 0.1, 0.2 ó 0.3 unidades logarítmicas, por ejemplo, unidades de pH.

Características generales de las modificaciones genéticas
 15 introducidas de acuerdo con la invención.

- Todas las modificaciones del genoma se insertan en células recombinantes, y en particular en levaduras recombinantes, de acuerdo con técnicas conocidas de ingeniería genética:

20 - Las sucesivas secuencias de ácidos nucleicos incluidas en una construcción génica que se introduce en el genoma celular recombinante de acuerdo con la invención tienen la siguiente estructura:

Prom₁-ORF₁-term₁-ORF₂-gen₂-term₂ -.../...-Prom_n-ORF_n-term_n,

25 en donde:

- Prom1 es una secuencia que regula la expresión de la secuencia codificante ORF1,

- ORF1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína PROT1 deseada, y especialmente una enzima PROT1 deseada,

- Term1 es una secuencia terminadora de la transcripción que media la terminación de la transcripción proporcionando señales en el ARNm recién sintetizado que desencadenan procesos que liberan el ARNm del complejo transcripcional, y

10 - "1", "2", .../..."n" puede describir o no el mismo ORF (Open Reading Frame), promotor o terminador. El orden de las secuencias de ácidos nucleicos no importa. "n" es un número entero que normalmente oscila entre 5 y 20. Estas construcciones se insertan en uno de los cromosomas de células

15 recombinantes en una ubicación controlada. En algunas modalidades, el sitio de inserción no es esencial para la funcionalidad de la construcción insertada ni para la viabilidad de la célula genéticamente modificada resultante.

20 Como entenderán los experimentados en la técnica, puede resultar ventajoso modificar una secuencia codificante para mejorar su expresión en un hospedero particular. El código genético es redundante con 64 codones posibles, pero la mayoría de los organismos suelen usar un subconjunto de estos codones. Los codones que se usan con mayor frecuencia en una especie se

25 denominan codones óptimos y los que no se usan con mucha

frecuencia se clasifican como codones raros o de bajo uso. Los codones se pueden sustituir para reflejar el uso de codones preferido del hospedero, en un proceso a veces llamado "optimización de codones" o "control del sesgo de codones de especie". La optimización de codones para otras células hospederas se puede determinar fácilmente usando tablas de uso de codones o se puede realizar usando elementos de programación ("software") disponible comercialmente, tal como CodonOp (www.idtdna.com/CodonOptfrom) de Integrated DNA Technologies.

Se pueden preparar secuencias codificantes optimizadas que contienen codones preferidos por un hospedero procariota o eucariota particular (Murray *et al.*, 1989, Nucl Acids Res. 17: 477-508), para aumentar la velocidad de traducción o para producir transcritos de ARN recombinantes que tengan propiedades deseables, tal como una semivida más larga, en comparación con las transcripciones producidas a partir de una secuencia no optimizada. Los codones de paro de traducción también se pueden modificar para reflejar la preferencia del hospedero. Por ejemplo, los codones de paro típicos para *S. cerevisiae* y mamíferos son UAA y UGA, respectivamente. El codón de terminación típico para plantas monocotiledóneas es UGA, mientras que los insectos y *E. coli* usan comúnmente UAA como codón de paro (Dalphin *et al.*, 1996, Nucl Acids Res. 24: 216-8).

- Cuando la célula recombinante es una célula de levadura,

y en particular es una célula de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, las secuencias de ácido nucleico introducidas en el genoma de la levadura y que se originan en otros organismos distintos de *Saccharomyces cerevisiae* generalmente se
5 “transcodifican” (generalmente “optimizadas con codones”), es decir que estas secuencias de ácidos nucleicos se sintetizan con un uso de codones óptimo para la expresión en *S. cerevisiae*. La secuencia de nucleótidos (y no la secuencia de proteínas) de algunas secuencias de ácidos nucleicos de *S. cerevisiae*
10 también ha sido modificada (“transcodificada”) para minimizar la recombinación con una copia endógena de tal gen.

- Los genes pueden eliminarse mediante procedimientos estándar usados en ingeniería genética celular. En algunas modalidades, los genes destinados a la eliminación pueden
15 interrumpirse mediante la inserción de una de las construcciones genéticas descritas anteriormente o, alternativamente, los genes destinados a la eliminación se reemplazan por un tramo corto de nucleótido.

- Una secuencia de ácido nucleico puede volverse
20 “inducible o reprimible” eliminando una copia endógena de la secuencia de ácido nucleico (si es necesario) y colocando una nueva copia del ORF bajo el control de un promotor inducible o reprimible. Un promotor inducible o reprimible es un promotor cuya actividad se modula o controla, es decir, aumenta o
25 disminuye, ante un cambio en las condiciones ambientales o

estímulos externos. La inducción o represión puede controlarse artificialmente, lo que abarca la inducción o represión por factores abióticos como compuestos químicos que no se encuentran naturalmente en la célula, y en particular levadura, de interés, luz, niveles de oxígeno, calor o frío. Una lista y secuencias de promotores inducibles o reprimibles se describen en otra parte de la presente descripción.

Células recombinantes de acuerdo con la invención.

Los inventores han concebido células recombinantes, en particular levaduras recombinantes, que tienen la capacidad de producir ácido hialurónico.

La presente invención se relaciona con células recombinantes, y en particular a levaduras recombinantes, que tienen la capacidad de producir ácido hialurónico, y en donde esta capacidad de producir ácido hialurónico se obtiene mediante una pluralidad de alteraciones que se han introducido en su genoma, mediante métodos de ingeniería genética.

La presente invención se relaciona con una célula de levadura recombinante que produce ácido hialurónico (HA), en donde la célula recombinante comprende:

- (a) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa;
- (b) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-Glucosa deshidrogenasa (UDP-GlcDH o HASB);

(c) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa, en el que el polipéptido que tiene actividad hialuronidasa comprende una señal de secreción, de modo que la célula de levadura
 5 recombinante produce ácido hialurónico, en particular de un peso molecular deseado (HAMW, por sus siglas en inglés), y

(d) (i) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa (GLN1); y/o
 10 (ii) uno o más ácidos nucleicos endógenos alterados que codifican una glutamato sintasa (GLT1);

en donde la célula de levadura recombinante pertenece al género *Saccharomyces*, o al género *Candida*, o al género *Kluyveromyces*, o al género *Ogataea*, o al género *Yarrowia*, o al
 15 género *Debaryomyces*, o al género *Ashbya*, y está en particular seleccionado del grupo formado por *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces castelli*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*,
 20 *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces polysporus*, *Kluyveromyces thermo tolerens*, *Ogataea polimorfa*, *Yarrowia lypolytica*, *Debaryomyces hansenii* y *Ashbya gossypii*, y es preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*.

La presente invención se relaciona además con una célula
 25 hospedera recombinante que produce ácido hialurónico (HA) en

donde la célula hospedera recombinante comprende:

(a) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa;

(b) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-Glucosa deshidrogenasa (UDP-GlcDH o HASB);

(c) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa, en donde el polipéptido que tiene actividad hialuronidasa comprende una señal de secreción y una señal de anclaje, de modo que la célula hospedera produzca ácido hialurónico, en particular de un peso molecular deseado (HAMW); y

(d) (i) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa (GLN1); y/o

(ii) uno o más ácidos nucleicos endógenos alterados que codifican una glutamato sintasa (GLT1).

Los inventores han descubierto que se puede alcanzar la capacidad de producir ácido hialurónico por las células, y en particular por las células de levadura, introduciendo en el genoma de estas células una pluralidad de alteraciones genéticas.

La producción de ácido hialurónico por células de la invención, y en particular por células de levadura de la invención, se ha conseguido optimizando el metabolismo endógeno

de la UDP-Glucosa, y opcionalmente de la UDP-N-Acetil-glucosamina, y dirigiendo la subsecuente vía metabólica modificada artificialmente principalmente hacia la producción de ácido hialurónico manteniendo al mismo tiempo una viabilidad
5 óptima de las células genéticamente modificadas resultantes.

Se ha determinado que la producción de ácido hialurónico por células recombinantes de acuerdo con la invención puede aumentar aumentando la conversión de glucosa-6-fosfato en los sucesivos metabolitos intermedios (i) glucosa-1-fosfato, UDP-
10 glucosa, UDP-glucuronato y ácido hialurónico y (ii) fructosa-6-fosfato, glucosamina-6-fosfato, N-acetil-glucosamina-6-fosfato, N-acetil-glucosamina-1-fosfato, UDP-N-acetil-glucosamina y ácido hialurónico, manteniendo al mismo tiempo un equilibrio metabólico que permite una buena viabilidad de
15 las células recombinantes resultantes.

De hecho, para obtener una célula recombinante viable de la invención, se probaron muchas construcciones diferentes para obtener una célula recombinante viable y eficaz, y en particular una levadura recombinante viable. En particular,
20 estas levaduras recombinantes fueron difíciles de obtener porque la acumulación temporal de algunos intermediarios parecía ser tóxica para las levaduras.

Se encontraron dificultades técnicas inesperadas al establecer las condiciones adecuadas para la preparación de
25 una célula recombinante capaz de producir ácido hialurónico y,

en particular, de producir ácido hialurónico con un peso molecular controlado.

Por peso molecular "controlado" de un ácido hialurónico de la invención se entiende que por lo menos 80%, en particular
5 por lo menos 85%, del ácido hialurónico producido mediante un método de la invención tiene un peso molecular comprendido dentro de un cierto intervalo de peso molecular mediante la regulación de por lo menos un parámetro del método y/o de la célula recombinante de la invención, como por ejemplo:

10 - la naturaleza y el origen del ácido nucleico que codifica la hialuronidasa de la célula recombinante,

- la naturaleza y el origen del promotor que controla la expresión del ácido nucleico que codifica la(s) hialuronidasa(s) de la célula recombinante,

15 - la presencia de una señal de anclaje y/o de secreción asociada a la(s) hialuronidasa(s) codificada(s) de la célula recombinante,

- el pH del medio de cultivo durante la etapa de cultivo de la célula recombinante, y/o

20 - la duración del cultivo de la célula recombinante.

En efecto, después de muchas investigaciones y pruebas experimentales, los inventores descubrieron que era posible cultivar una célula recombinante, y en particular una célula de levadura recombinante, más particularmente una célula de
25 levadura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, capaz de

producir ácido hialurónico que tiene un peso molecular controlado usando los siguientes parámetros:

- la selección de la naturaleza y el origen de las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido que
5 tiene actividad hialuronidasa de la célula recombinante, en particular la levadura recombinante, de la invención; y/o

- la naturaleza y el origen del control del promotor que controla la expresión de las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido que tiene actividad hialuronidasa de
10 la célula recombinante, en particular la levadura recombinante, de la invención; y/o

- la presencia opcional de una señal de anclaje, además de una señal de secreción, asociada al polipéptido codificado que tiene actividad hialuronidasa de la célula recombinante,
15 en particular la levadura recombinante, de acuerdo con la invención; y/o

- el pH del medio de cultivo durante la etapa de cultivo de la célula recombinante, en particular de la célula de levadura recombinante, de acuerdo con la invención; y/o

20 - la duración del cultivo de la célula recombinante, en particular de la célula de levadura recombinante, de acuerdo con la invención.

Hasta donde saben los inventores, esto nunca se había logrado antes.

25 El peso molecular del ácido hialurónico (HA) puede estar

en el intervalo de menos de 50 kDa, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 50 kDa. Alternativamente, el peso molecular del ácido hialurónico (HA) puede estar en el intervalo de más de 50 kDa, preferentemente
 5 en el intervalo de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 250 kD.

En otra alternativa, el peso molecular del HA puede estar en el intervalo superior a 100 kDa, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 100 kDa a aproximadamente 1500
 10 kDa.

El ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa puede obtenerse o derivarse de *Saccharomyces cerevisiae*.

El ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene
 15 actividad hialuronidasa en una célula recombinante de la invención se puede obtener o derivar de por lo menos uno de *Cupiennius salei*, *Loxosceles intermedia*, *Hirudo nipponia*, *Bothrops atrox* o *Tityus serrulatus*.

El ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene
 20 actividad hialuronano sintasa en una célula recombinante de la invención se puede obtener o derivar de por lo menos uno de *Streptococcus zooepidemicus*, virus *Chlorella PBCV1*, virus *Chlorella CviK1*, virus *Chlorella IL-5-2s1*, virus *Chlorella CZ-2*, virus *Chlorella CVG-1*, *Xenopus laevis* o *Pasteurella*
 25 *multocida*, y en particular se obtiene o deriva de *Streptococcus*

zooepidemicus, virus *Chlorella PBCV1*, virus *Chlorella CviK1*, virus *Chlorella IL-5-2s1*, virus *Chlorella CZ-2*, virus *Chlorella CVG-1* o *Xenopus laevis*.

El ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa en una célula recombinante de la invención se puede obtener o derivar de por lo menos uno de *Arabidopsis thaliana*, virus *Chlorella PBCV1* o *Streptococcus zooepidemicus*, y en particular de *Arabidopsis thaliana* o virus *Chlorella PBCV1*.

La célula recombinante de acuerdo con la invención puede comprender un ácido nucleico recombinante que codifica uno o más de:

- (i) un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA1); y/o
- (ii) un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa (QRI1).

La célula recombinante de acuerdo con la invención puede comprender por lo menos un ácido nucleico recombinante que codifica uno o más de:

- (i) un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 (PGM1); y/o
- (ii) un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (UGP1); y/o
- (iii) un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa (GNA1); y/o

(iv) un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa (PCM1).

La célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención puede seleccionarse en particular del grupo formado
 5 por *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*,
Saccharomyces bayanus, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces castelli*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces lactis*,
Kluyveromyces marxianus, *Kluyveromyces polysporus*,
 10 *Kluyveromyces thermotolerans*, *Ogataea polymorpha*, *Yarrowia lypolytica*, *Debaryomyces hansenii* y *Ashbya gossypii* y es preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*.

La célula hospedera recombinante de acuerdo con la invención puede pertenecer al orden *Saccharomycetales* y se
 15 selecciona en particular del grupo formado por *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces bayanus*,
Saccharomyces paradoxus, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces castelli*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*,
 20 *Kluyveromyces polysporus*, *Kluyveromyces thermotolerans*,
Ogataea polymorpha, *Yarrowia lypolytica*, *Debaryomyces hansenii* y *Ashbya gossypii*, y es preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*.

Otro objetivo de la invención se relaciona con un método
 25 para producir ácido hialurónico (HA) de un peso molecular

deseado (HAMW) que comprende:

(a) cultivar una célula recombinante como se definió anteriormente, es decir, una célula de levadura recombinante o una célula hospedera recombinante de la invención, en un medio de cultivo durante un tiempo suficiente para producir ácido hialurónico (HA) del peso molecular deseado; y

(b) opcionalmente aislar o recuperar el ácido hialurónico (HA) de la célula recombinante y/o del medio de cultivo.

En el método de la invención, el HA puede tener un peso molecular de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 50 kDa, y preferentemente de 20 kDa a 30 kDa.

En el método de la invención, el HA puede tener alternativamente un peso molecular de 30 kDa a 50 kDa.

En el método de la invención, el HA puede tener alternativamente un peso molecular de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 150 kDa.

En el método de la invención, el HA puede tener alternativamente un peso molecular de aproximadamente 150 kDa a aproximadamente 1500 kDa.

En un método de la invención, el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa puede obtenerse o derivarse de *Cupiennius salei*, *Loxosceles intermedia*, *Hirudo nipponia*, *Bothrops atrox* o *Tityus serrulatus*.

En un método de la invención, el ácido nucleico que

codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa se puede obtener o derivar de por lo menos uno de *Streptococcus zooepidemicus*, virus *Chlorella PBCV1*, virus *Chlorella CviKl*, virus *Chlorella IL-5-2s1*, virus *Chlorella CZ-2*, virus *Chlorella*
 5 *CVG-1*, *Xenopus laevis* o *Pasteurella multocida*, y en particular se obtiene o deriva de por lo menos uno de *Streptococcus zooepidemicus*, virus *Chlorella PBCV1*, virus *Chlorella CviKl*, virus *Chlorella IL-5-2s1*, virus *Chlorella CZ-2*, virus *Chlorella*
CVG-1 o *Xenopus laevis*.

10 En un método de la invención, el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa puede obtenerse o derivarse de por lo menos uno de *Arabidopsis thaliana*, virus *Chlorella PBCV1* o *Streptococcus zooepidemicus*, y en particular obtenerse o derivarse de
 15 *Arabidopsis thaliana* o virus *Chlorella PBCV1*.

En el método de la invención, la célula recombinante puede comprender por lo menos un ácido nucleico recombinante que codifica uno o más de:

(i) un polipéptido que tiene actividad glutamina-
 20 fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA1); y/o

(ii) un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa (QRI1).

En el método de la invención, la célula recombinante puede comprender por lo menos un ácido nucleico recombinante que
 25 codifica uno o más de:

(i) un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 (PGM1);

(ii) un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (UGP1);

5 (iii) un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa (GNA1); y/o

(iv) un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa (PCM1).

En el método de la invención, la célula recombinante puede
10 ser un miembro del género *Saccharomyces* y, en particular, *Saccharomyces cerevisiae*.

En el método de la invención, el peso molecular del ácido hialurónico puede controlarse mediante el tiempo de fermentación.

15 En el método de la invención, el tiempo suficiente para producir ácido hialurónico (HA) de un peso molecular deseado puede ser un período de aproximadamente 35 horas a aproximadamente 50 horas, preferentemente de aproximadamente 40 horas a aproximadamente 50 horas, preferentemente
20 aproximadamente 48 horas.

En el método de la invención, el peso molecular del ácido hialurónico puede controlarse mediante el pH del medio de cultivo.

En el método de la invención, el peso molecular del ácido
25 hialurónico se puede controlar regulando el pH del medio de

cultivo durante la etapa de cultivo (a) de un método de la invención.

En el método de la invención, el peso molecular del ácido hialurónico se puede controlar eliminando la biomasa del medio de cultivo.

El método de la invención se puede llevar a cabo a escala industrial, preferentemente en donde el medio de cultivo es por lo menos aproximadamente 100L, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1000L a aproximadamente 3000L, incluso más preferentemente aproximadamente 10,000L o incluso más preferentemente aproximadamente 100,000L o incluso aproximadamente 250,000L.

Otro objetivo de la invención se relaciona con el ácido hialurónico (HA) obtenido u obtenible a partir de una célula recombinante de la invención o del método de la invención.

Otro objetivo de la invención se relaciona con un medio de cultivo que comprende el ácido hialurónico (HA) de acuerdo con la invención.

La presente invención se relaciona además con una composición que comprende el ácido hialurónico (HA) de acuerdo con la invención.

La presente invención se relaciona además con un producto industrial o un producto de consumo o un consumible que comprende (i) el HA que tiene un peso molecular en el intervalo superior a 100 kDa, de preferencia en el intervalo de

aproximadamente 100 kDa a aproximadamente 1500 kDa, (ii) el medio de cultivo de la invención o (iii) la composición de la invención.

La presente invención también se relaciona con el uso de una célula recombinante de acuerdo con la invención para la producción de ácido hialurónico (HA) que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 50 kDa o de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 1000 kDa.

Otro objetivo de la presente invención se relaciona con un método para producir ácido hialurónico que comprende las etapas de:

(a) cultivar una levadura recombinante de acuerdo con la invención en un medio de cultivo; y

(b) recuperar el ácido hialurónico del tal medio de cultivo,

en donde el ácido hialurónico recuperado en la etapa (b) tiene un peso molecular controlado mediante la selección de:

- la naturaleza y origen del ácido nucleico que codifica la hialuronidasa de la levadura recombinante,

- la naturaleza y el origen del promotor que controla la expresión del ácido nucleico que codifica la(s) hialuronidasa(s) de la levadura recombinante,

- la presencia de un anclaje y/o de una señal de secreción asociada a la(s) hialuronidasa(s) codificada(s) de la levadura

recombinante,

- el pH del medio de cultivo durante la etapa de cultivo de la levadura recombinante, y/o
- la duración del cultivo de la levadura recombinante.

5 Más particularmente, la invención se relaciona con una levadura recombinante productora de ácido hialurónico, en la que la levadura recombinante comprende:

(A) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-
10 fosfato amidotransferasa (GFA1);

(B) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa (QRI1);

(C) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican
15 un polipéptido que tiene actividad UDP-Glucosa deshidrogenasa (UDP-GlcDH o HASB);

(D) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa (HASA);
y

20 (E) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa, en donde el polipéptido que tiene actividad hialuronidasa comprende una señal de secreción, de modo que la célula de levadura recombinante produce ácido hialurónico, en particular de un
25 peso molecular deseado (HAMW),

siendo tal levadura recombinante *Saccharomyces cerevisiae*.

En una modalidad particular, la célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular la levadura
5 recombinante de acuerdo con la invención, comprende un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa (GLN1).

En una modalidad particular, la célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular la levadura
10 recombinante de acuerdo con la invención, es tal que por lo menos uno, y en particular todos, sus ácidos nucleicos endógenos que codifican una glutamato sintasa (GLT1) están alterados.

En una modalidad particular, la célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular la levadura
15 recombinante de acuerdo con la invención:

- comprende un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa (GLN1), y en particular un polipéptido que tiene actividad glutamina
20 sintetasa (GLN1) obtenido o derivado de *Saccharomyces cerevisiae*; y

- es tal que por lo menos uno, y en particular todos, sus ácidos nucleicos endógenos que codifican una glutamato sintasa (GLT1) están alterados.

25 En una modalidad particular, la célula recombinante de

acuerdo con la invención, y en particular la levadura recombinante de acuerdo con la invención, comprende sólo un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA1).

En una modalidad particular, la célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular la levadura recombinante, comprende entre 5 y 10 ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa (QRI1).

En una modalidad particular, la célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular la levadura recombinante, comprende entre 3 y 7 ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-Glucosa deshidrogenasa (UDP-GlcDH o HASB).

En otra modalidad, uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-Glucosa deshidrogenasa (UDP-GlcDH o HASB) se obtienen o derivan de por lo menos uno de *Arabidopsis thaliana*, virus *Chlorella PBCV1* o *Streptococcus zooepidemicus*, y en particular se obtienen o derivado de *Arabidopsis thaliana* o virus *Chlorella PBCV1*.

En una modalidad particular, la célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular la levadura recombinante, comprende entre 4 y 8 ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad

hialuronano sintasa (HASA).

En otra modalidad, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa (HASA) se obtienen o derivan de por lo
 5 menos uno de *Streptococcus zooepidemicus*, virus *Chlorella PBCV1*, virus *Chlorella CviK1*, virus *Chlorella IL-5-2s1*, virus *Chlorella CZ-2*, virus *Chlorella CVG-1*, *Xenopus laevis* o *Pasteurella multocida*, y en particular se obtiene o deriva de *Streptococcus zooepidemicus*, virus *Chlorella PBCV1*, virus
 10 *Chlorella CviK1*, virus *Chlorella IL-5-2s1*, virus *Chlorella CZ-2*, virus *Chlorella CVG-1* o *Xenopus laevis*.

En una modalidad particular, la célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular la levadura recombinante de la invención, sólo comprende un ácido nucleico
 15 recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa.

En otra modalidad, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa se obtienen o derivan de *Cupiennius salei*,
 20 *Loxosceles intermedia*, *Hirudo nipponia*, *Bothrops atrox* o *Tityus serrulatus*.

En otra modalidad, la célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular la célula de levadura recombinante puede comprender por lo menos un ácido nucleico
 25 recombinante que codifica uno o más de:

(A) un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 (PGM1); y/o

(B) un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (UGP1); y/o

5 (C) un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa (GNA1); y/o

(D) un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa (PCM1).

En particular, la célula recombinante de acuerdo con la
10 invención, y en particular la célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, comprende por lo menos dos, en particular al menos tres, y más particularmente todas las modificaciones indicadas anteriormente.

En una modalidad particular, el ácido nucleico que
15 codifica un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 (PGM1), el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (UGP1), el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa
20 (GFA1), el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa (GNA1), el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de fosfoacetilglucosamina mutasa (PCM1) y el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tienen actividad de
25 UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa (QRI1) son ácidos

nucleicos que se originan o derivan de una levadura, preferentemente de *Saccharomyces cerevisiae*.

En una modalidad particular, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido definido
5 anteriormente y comprendidos en una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular comprendidos en la levadura recombinante de la invención, están bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pPDC1, pTDH3, pCCW12, pCCW12.Sm, pCCW12.sk, pCCW12.sba, pCCW12.sar,
10 pTEF1, pEN02, pRPLA1, pNUP57 y pTEF3.

En una modalidad particular, los promotores inducibles o reprimibles mencionados en la presente descripción se seleccionan del grupo formado por promotores inducibles o reprimibles con cobre o promotores inducibles o reprimibles
15 con metionina, en particular seleccionados del grupo formado por pMET6, pMET25 y pSAM1.

La invención se relaciona además con un método para producir ácido hialurónico como se describió anteriormente, y que comprende las etapas de:

20 (a) cultivar una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una levadura recombinante como se define en la presente en un medio de cultivo; y

(b) recuperar el ácido hialurónico de tal medio de cultivo,

25 en donde el ácido hialurónico recuperado en la etapa (b)

tiene un peso molecular controlado mediante la selección de:

- la naturaleza y el origen del ácido nucleico que codifica la hialuronidasa de la célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular la levadura recombinante de
5 acuerdo con la invención, y/o

- la naturaleza y el origen del promotor que controla la expresión del ácido nucleico que codifica la(s) hialuronidasa(s) de la célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular la levadura recombinante, y/o

10 - la presencia de una señal de anclaje y/o de secreción asociada a la(s) hialuronidasa(s) codificada(s) de la célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular de la levadura recombinante, y/o

- el pH del medio de cultivo durante la etapa de cultivo
15 de la célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular de la levadura recombinante; y/o

- la duración del cultivo de la célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular de la levadura recombinante.

20 Ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una levadura recombinante de la invención, comprende uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un
25 polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa.

Un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa de acuerdo con la invención significa un polipéptido que convierte los metabolitos intermedios UDP-Glucoronato y UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) en ácido hialurónico ($((\beta\text{-D-1,3-GlcNAc-}\beta\text{-D-1,4-GlcA})_n)$).

En una modalidad, uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa están bajo el control de un promotor inducible o reprimible que es funcional en las células recombinantes de la invención, tal como por ejemplo los promotores inducibles o reprimibles pCUP1 o pMET25.

Uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa pueden estar bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pCCW12, pCCW12.Sm, pTDH3-1.Sba y pTDH3.Sar.

Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa pueden originarse o derivarse de por lo menos uno de *Streptococcus zooepidemicus* (sz), virus *Chlorella PBCV1* (Vir), virus *Chlorella CviKl* (Vir), virus *Chlorella IL-5-2s1* (Vir), virus *Chlorella CZ-2* (Vir), virus *Chlorella CVG-1* (Vir), *Xenopus laevis* (xl) o *Pasteurella multocida* (pm), y pueden originarse o derivarse, en particular, de *Streptococcus zooepidemicus*, virus *Chlorella PBCV1*, virus *Chlorella CviKl*, virus *Chlorella*

IL-5-2s1, virus *Chlorella* CZ-2, virus *Chlorella* CVG-1 o *Xenopus laevis*, como se muestra en los ejemplos de la presente.

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender entre 2 y 8, en particular entre 4 y 8 ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa (HASA). Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender, por ejemplo, 2 ó 6, y en particular 6, ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa (HASA).

De manera ilustrativa, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa pueden insertarse dentro del gen JLP1 y/o dentro del gen SAM3 y/o dentro del gen TRP1 y/o dentro del gen LYP1 de la célula recombinante, y en particular de la levadura recombinante, como se muestra en los ejemplos de la presente.

En una modalidad de la invención, una célula recombinante, y en particular una levadura recombinante, de la invención comprende:

- entre 2 y 8, en particular entre 4 y 8 ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa (HASA);
- uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican

un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa que se origina o deriva de por lo menos uno de *Streptococcus zooepidemicus* (sz), virus *Chlorella PBCV1* (Vir), *Xenopus laevis* (xl) o *Pasteurella multocida* (pm), y que origina o se deriva en particular de por lo menos uno de *Streptococcus zooepidemicus*, virus *Chlorella PBCV1* o *Xenopus laevis*; y

- uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa están bajo el control de un promotor inducible o reprimible que es funcional en las células recombinantes de la invención, tal como, por ejemplo, los promotores inducibles o reprimibles pCUP o pMET25 y/o bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pCCW12, pCCW12.Sm, pTDH3-1.Sba y pTDH3.Sar.

15 Ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una levadura recombinante de acuerdo con la invención, comprende uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-Glucosa deshidrogenasa (UDP-GlcDH o HASB).

Un polipéptido que tiene actividad UDP-Glucosa deshidrogenasa (UDP-GlcDH o HASB) de acuerdo con la invención significa un polipéptido que convierte el metabolito intermedio Uridina-Difosfato-Glucosa (UDP-Glucosa) en UDP-Glucuronato.

En una modalidad, uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-Glucosa deshidrogenasa (UDP-GlcDH o HASB) están bajo el control de un promotor inducible o reprimible que es funcional en células recombinantes de la invención, tal como, por ejemplo, los promotores inducibles o reprimibles pMET25 o pMET6.

Uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa pueden estar bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pCCW12, en particular los promotores pCCW12.sk y pCCW12.sba; pTEF1.Sba y pTDH3.Sk.

Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa pueden originarse o derivarse de por lo menos uno de *Arabidopsis thaliana*, virus *Chlorella PBCV1* o *Streptococcus zooepidemicus*, y en particular pueden originarse o derivarse de *Arabidopsis thaliana* o virus *Chlorella PBCV1*.

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender entre 2 y 7, en particular entre 3 y 7 ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa. Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede

comprender, por ejemplo, 2 ó 5 ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa.

De manera ilustrativa, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa pueden insertarse dentro del gen JLP1 y/o dentro del gen TRP1, y/o dentro del gen LYP1 de la célula recombinante, y en particular de la levadura recombinante, como se muestra en los ejemplos de la presente.

En una modalidad de la invención, una célula recombinante, y en particular una levadura recombinante, de la invención comprende:

- entre 2 y 7, y en particular entre 3 y 7 ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-Glucosa deshidrogenasa;

- uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa se originan o se derivan de por lo menos uno de *Arabidopsis thaliana*, *virus Chlorella PBCV1* o *Streptococcus zooepidemicus*, y que se originan o derivan en particular de *Arabidopsis thaliana* o *virus Chlorella PBCV1*; y

- uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa están bajo el control de un promotor inducible o reprimible que es funcional en las células recombinantes de la invención,

tal como por ejemplo los promotores inducibles o reprimibles pMET25 o pMET6 y/o bajo el control de un promotor seleccionado del grupo formado por pCCW12, en particular los promotores pCCW12.sk y pCCW12.sba; pTEF1.Sba y pTDH3.Sk.

5 Ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una levadura recombinante de acuerdo con la invención, comprende uno o más ácidos nucleicos recombinantes
10 que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa. Un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa de acuerdo con la invención significa un polipéptido que degrada el ácido hialurónico, es decir, que convierte un ácido hialurónico de un peso molecular dado en un ácido hialurónico de un peso
15 molecular más bajo.

Como se indicó anteriormente, los polipéptidos que tienen actividad hialuronidasa de la presente invención comprenden una señal de secreción.

En una modalidad, el polipéptido que tiene actividad
20 hialuronidasa comprende tanto una señal de secreción como una señal de anclaje.

En una modalidad, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa están bajo el control de un promotor inducible o reprimible
25 que es funcional en las células recombinantes de la invención.

Uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa pueden estar bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTEF1, pCCW12, pCCW12.sba, pCCW12.Sar, pPDC1, pTEF3, pTDH3, pNUP57, pCWP2 y pCCW10.ago.

Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa pueden originarse o derivarse de por lo menos uno de *Cupiennius salei* (Csa), *Loxosceles intermedia* (Li), *Hirudo nipponia* (Hn), *Bothrops atrox* (Ba) o *Tityus serrulatus* (Ts) como se muestra en los ejemplos de la presente.

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender sólo un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa.

De manera ilustrativa, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa pueden insertarse dentro del gen JLP1 y/o dentro del gen LYP1, como se muestra en los ejemplos de la presente.

En una modalidad de la invención, una célula recombinante, y en particular una levadura recombinante, de la invención comprende:

- sólo un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa;
- tal ácido nucleico recombinante codifica un polipéptido

que tiene actividad hialuronidasa que se origina o deriva de *Cupiennius salei* (Csa), *Loxosceles intermedia* (Li), *Hirudo nipponia* (Hn), *Bothrops atrox* (Ba) o *Tityus serrulatus* (Ts);

- tal ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa comprende (i) una señal de secreción y ninguna señal de anclaje o (ii) una señal de secreción y una señal de anclaje; y

- tal ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTEF1, pCCW12, pCCW12.sba, pCCW12.Sar, pPDC1, pTEF3, pTDH3, pNUP57, pCWP2 y pCCW10.ago.

Ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa.

Un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa de acuerdo con la invención significa un polipéptido que convierte glutamato en glutamina mientras consume un ATP y un NH_4^+ .

En una modalidad, uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa están bajo el control de un promotor

inducible o reprimible que es funcional en las células recombinantes de la invención.

Uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina
5 sintetasa pueden estar bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTEF1 y pTEF1.Ago.

Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa pueden originarse o derivarse de *Saccharomyces cerevisiae*, como se
10 muestra en los ejemplos de la presente.

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender sólo un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad
15 glutamina sintetasa.

De manera ilustrativa, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa pueden insertarse dentro del gen LYP1 o GLT1 de la célula recombinante, y en particular de la célula
20 de levadura recombinante, como se muestra en los ejemplos de la presente.

En una modalidad de la invención, una célula recombinante, y en particular una célula de levadura recombinante, de la invención comprende:

25 - sólo un ácido nucleico recombinante que codifica un

polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa;

- tal ácido nucleico recombinante codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa que se origina o deriva de *Saccharomyces cerevisiae*; y

5 - tal ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTEF1 y pTEF1.Ago.

En una modalidad adicional de la invención, una célula
10 recombinante, y en particular una célula de levadura recombinante, de la invención comprende:

- sólo un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina sintasa;

- tal ácido nucleico recombinante codifica un polipéptido
15 que tiene actividad glutamina sintetasa que se origina o deriva de *Saccharomyces cerevisiae*;

- tal ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste
20 en pTEF1 y pTEF1.Ago; y

- tal ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa está insertado dentro del gen LYP1 o GLT1 de la célula recombinante, y en particular de la célula de levadura recombinante.

25 Ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido

que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato
amidotransferasa

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con
5 la invención, puede comprender uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa.

Un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa de acuerdo con la invención significa
10 un polipéptido que convierte la fructosa-6-fosfato en glucosamina-6-fosfato.

En una modalidad, uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa están bajo el
15 control de un promotor inducible o reprimible que es funcional en las células recombinantes de la invención.

Uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa pueden estar bajo el
20 control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTEF1 y pTEF1.Ago.

Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa pueden originarse o derivarse de
25 *Saccharomyces cerevisiae*, como se muestra en los ejemplos de

la presente.

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender sólo un ácido nucleico
5 recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa.

De manera ilustrativa, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa pueden
10 insertarse dentro del gen SAM3 de la célula recombinante, y en particular de la célula de levadura recombinante, como se muestra en los ejemplos en la presente.

En una modalidad de la invención, una célula recombinante, y en particular una célula de levadura recombinante, de la
15 invención comprende:

- sólo un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa;

- tal ácido nucleico recombinante codifica un polipéptido
20 que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa que se origina o deriva de *Saccharomyces cerevisiae*; y

- tal ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato
25 amidotransferasa está bajo el control de un promotor

seleccionado del grupo que consiste de pTEF1 y pTEF1.Ago.

Ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa.

Un polipéptido que tiene actividad pirofosforilasa de UDP-N-acetilglucosamina de acuerdo con la invención significa un polipéptido que puede convertir N-acetil-glucosamina en UDP-N-acetil-glucosamina.

En una modalidad, uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa están bajo el control de un promotor inducible o reprimible que es funcional en las células recombinantes de la invención, tal como, por ejemplo, el promotor inducible o promotores reprimibles pMET6 o pCUP1.

Uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa pueden estar bajo el control del promotor pTDH3.

Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa pueden originarse o derivarse de *Saccharomyces*

cerevisiae, como se muestra en los ejemplos de la presente.

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender entre 5 y 10 ácidos nucleicos recombina-
5 recombina-tes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa. Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender, por ejemplo, 5, 7 u 8 ácidos nucleicos recombina-
10 recombina-tes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa.

De manera ilustrativa, uno o más ácidos nucleicos recombina-tes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa pueden insertarse
15 dentro del gen HIS3 y/o dentro del gen JLP1 y/o dentro del gen SAM3 de la célula recombinante, y en particular de la levadura recombinante, como se muestra en los ejemplos de la presente.

En una modalidad de la invención, una célula recombinante, y en particular una célula de levadura recombinante, de la
20 invención comprende:

- entre 5 y 10 ácidos nucleicos recombina-tes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa;
- uno o más ácidos nucleicos recombina-tes que codifican
25 un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina

pirofosforilasa que se origina o deriva de *Saccharomyces cerevisiae*;

- uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa están bajo el control de un promotor inducible o reprimible que es funcional en las células recombinantes de la invención, tal como por ejemplo los promotores inducibles o reprimibles pMET6 o pCUP1 y/o bajo el control del promotor pTDH3.

10 Ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 (PGM1).

Un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 (PGM1) de acuerdo con la invención significa un polipéptido que convierte la glucosa-6-fosfato en el metabolito intermedio glucosa-1-fosfato.

En una modalidad, uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad Fosfoglucomutasa-1 (PGM1) están bajo el control de un promotor inducible o reprimible que es funcional en células recombinantes de la invención, tal como por ejemplo los

promotores inducibles o reprimibles.

Uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 (PGM1) pueden estar bajo el control del promotor pPDC1.

5 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 (PGM1) pueden originarse o derivarse de *Saccharomyces cerevisiae*, como se muestra en los ejemplos de la presente.

10 Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender sólo un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 (PGM1).

15 De manera ilustrativa, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 pueden insertarse dentro del gen SAM3 de la célula recombinante, y en particular de la levadura recombinante, como se muestra en los ejemplos de la presente.

20 En una modalidad de la invención, una célula recombinante, y en particular una levadura recombinante, de la invención comprende:

- sólo un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1;

- tal ácido nucleico recombinante codifica un polipéptido

25 que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 que se origina o deriva

de *Saccharomyces cerevisiae*; y

- tal ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 está bajo el control del promotor pPDC1.

5 Ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, comprende uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad
10 UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (UGP1).

Un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (UGP1) de acuerdo con la invención significa un polipéptido que convierte el metabolito intermedio
15 glucosa-1-fosfato en el metabolito intermedio UDP-glucosa.

En una modalidad, uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa están bajo el control de un promotor inducible o reprimible que es funcional
20 en células recombinantes de la invención, tal como por ejemplo los promotores inducibles o reprimibles pSAM1 o pCUP1.

Uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa pueden estar bajo el control de un
25 promotor seleccionado del grupo que consiste de pPDC1 y pEN02.

Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa pueden originarse o derivarse de *Saccharomyces cerevisiae*, como se muestra en los ejemplos de la presente.

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender entre 5 y 10 ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa. Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender, por ejemplo, 5, 7 u 8 ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa.

De manera ilustrativa, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene un gen de actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa pueden insertarse dentro del gen HIS3 y/o dentro del gen JLP1 y/o dentro del gen SAM3 de la célula recombinante, y en particular de la levadura recombinante, como se muestra en los ejemplos de la presente.

En una modalidad de la invención, una célula recombinante, y en particular una célula de levadura recombinante, de la invención comprende:

- entre 5 y 10 ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa;

- uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa que se origina o deriva de *Saccharomyces cerevisiae*; y

- uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido están bajo el control de un promotor inducible o reprimible que es funcional en las células recombinantes de la invención, tal como, por ejemplo, los promotores inducibles o reprimibles pSAM1 o pCUP1 y/o bajo el control de un promotor seleccionado del grupo formado por pPDC1 y pEN02.

Ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa (GNA1).

Un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa (GNA1) de acuerdo con la invención significa un polipéptido que puede convertir glucosamina-6-fosfato en N-acetil-glucosamina-6-fosfato.

En una modalidad, uno o más de los ácidos nucleicos

recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa están bajo el control de un promotor inducible o reprimible que es funcional en las células recombinantes de la invención.

5 Uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa pueden estar bajo el control del promotor pCWP2.

10 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa pueden originarse o derivarse de *Saccharomyces cerevisiae*, como se muestra en los ejemplos de la presente.

15 Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender sólo un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa.

20 De manera ilustrativa, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa pueden insertarse dentro del gen SAM3 de la célula recombinante, y en particular de la levadura recombinante, como se muestra en los ejemplos del presente documento.

25 En una modalidad de la invención, una célula recombinante,

y en particular una levadura recombinante, de la invención comprende:

- sólo un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa;

- el ácido nucleico recombinante codifica un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa que se origina o deriva de *Saccharomyces cerevisiae*; y

- el ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa está bajo el control del promotor pCWP2.

Ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad de fosfoacetilglucosamina mutasa (PCM1).

Un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa (PCM1) de acuerdo con la invención significa un polipéptido que puede convertir N-acetil-glucosamina-6-fosfato N-acetil-glucosamina-1-fosfato.

En una modalidad, uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa están bajo el control de un

promotor inducible o reprimible que es funcional en las células recombinantes de la invención.

Uno o más de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa pueden estar bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTEF3 y pTEF1.

Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa pueden originarse o derivarse de *Saccharomyces cerevisiae*, como se muestra en los ejemplos de la presente.

Una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención, puede comprender sólo un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa.

De manera ilustrativa, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa pueden insertarse dentro del gen SAM3 de la célula recombinante, y en particular de la levadura recombinante, como se muestra en los ejemplos de la presente.

En una modalidad de la invención, una célula recombinante, y en particular una célula de levadura recombinante, de la invención comprende:

- sólo un ácido nucleico recombinante que codifica un

polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa;

- el ácido nucleico recombinante codifica un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa que se origina o deriva de *Saccharomyces cerevisiae*; y

5 - el ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa está bajo el control del promotor, un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTEF3 y pTEF1.

HIALURONANO SINTASA (HASA)

10 La enzima hialuronano sintasa es una proteína que se describe en la técnica para catalizar la conversión de UDP-glucuronato o UDP-N-acetil-glucosa en ácido hialurónico. La hialuronano sintasa procedente de *Streptococcus zooepidemicus*, virus *Chlorella PBCV1*, *Xenopus laevis* o *Pasteurella multocida*
15 puede denominarse HASA.

Un método implementado para medir el nivel de actividad de un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa pertenece al conocimiento general del experimentado en la técnica.

20 A este respecto, el experimentado en la técnica puede referirse ventajosamente al método de determinación colorimétrica después del tratamiento con ácido sulfúrico concentrado y carbazol descrito por Bitter and Muir (Analytical Biochemistry, 4, 330-334, 1962).

25 El polipéptido preferido que tiene actividad hialuronano

sintasa en la presente invención es una enzima que tiene un número EC de n° 2.4.1.212.

De acuerdo con una modalidad preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa pueden originarse o derivarse de organismos preferentemente seleccionados en un grupo que consiste de organismos procariotas y organismos eucariotas. En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa pueden originarse o derivarse de arqueobacterias. En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa pueden originarse o derivarse de bacterias, y especialmente de *Streptococcus zooepidemicus* (Sz) o de *Pasteurella multocida* (Pm), de virus *Chlorella PBCV1* (Vir), virus *Chlorella CviK1* (Vir), virus *Chlorella IL-5-2s1* (Vir), virus *Chlorella CZ-2* (Vir), virus *Chlorella CVG-1* (Vir) o de *Xenopus laevis* (Xl).

De acuerdo con una modalidad aún preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa se pueden seleccionar del grupo que consiste de secuencias de ácidos nucleicos que tienen (i) por lo menos 65%, ventajosamente por lo menos 70%, preferentemente por lo menos 80%, de identidad de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico como se establece

como la secuencia SEC. ID NO.: 1 (Vir), SEC. ID NO.: 2 (Vir), SEC. ID NO.: 3 (Pm), SEC. ID NO.: 4 (Pm), SEC. ID NO.: 5 (Pm), SEC. ID NO.: 6 (Xl), SEC. ID NO.: 7 (sz), SEC. ID NO.: 101 (Vir), SEC. ID NO.: 102 (Vir), SEC. ID NO.: 103 (Vir) o SEC. ID NO.: 104 (Vir) y (ii) una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico que tiene, respectivamente, la secuencia de ácido nucleico como se establece como la secuencia SEC. ID NO.: 1 (Vir), SEC. ID NO.: 2 (Vir), SEC. ID NO.: 3 (Pm), SEC. ID NO.: 4 (Pm), SEC. ID NO.: 5 (Pm), SEC. ID NO.: 6 (Xl), SEC. ID NO.: 7 (sz), SEC. ID NO.: 101 (Vir), SEC. ID NO.: 102 (Vir), SEC. ID NO.: 103 (Vir) o SEC. ID NO.: 104 (Vir).

Una actividad biológica de la misma naturaleza respecto de esta secuencia es, como se ha explicado anteriormente, la capacidad de codificar un polipéptido que convierte el UDP-glucuronato o la UDP-N-acetil-glucosa en ácido hialurónico.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 65% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que

la secuencia de ácido nucleico de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 70% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca
5 secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con tal secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad
10 biológica de la misma naturaleza que tal secuencia de ácido nucleico de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 80% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca
15 secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que tal secuencia
20 de ácido nucleico de referencia.

Para la secuencia de aminoácidos del polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa procedente de *Streptococcus zooepidemicus*, *virus Chlorella PBCV1*, *Xenopus laevis* o *Pasteurella multocida*, el experimentado en la técnica puede
25 hacer referencia, respectivamente, a los números de acceso

B4U0D4, Q84419, P13563, Q7BLV3, M1GZS8, M1H5V3, M1H2Q1 y M1HN86 en la base de datos UniProt, o a SEC. ID NO.: 8 (Vir), SEC. ID NO.: 9 (Pm) SEC. ID NO.: 10 (Xl), SEC. ID NO.: 11 (Sz), SEC. ID NO.: 105 (Vir), SEC. ID NO.: 106 (Vir), SEC. ID NO.: 107 (Vir) o SEC. ID NO.: 108 (Vir) descritas en la presente, en particular a la SEC. ID NO.: 8 (Vir), SEC. ID NO.: 9 (Pm) SEC. ID NO.: 10 (Xl), SEC. ID NO.: 11 (Sz), SEC. ID NO.: 105 (Vir), SEC. ID NO.: 106 (Vir) o SEC. ID NO.: 108 (Vir), y más particularmente a SEC. ID NO.: 8 (Vir), SEC. ID NO.: 9 (Pm), SEC. ID NO.: 10 (Xl), SEC. ID NO.: 11 (Sz).

De acuerdo con otra modalidad particular, el uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa pueden ser ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 50%, ventajosamente por lo menos 65%, preferentemente por lo menos 80%, de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos establecida como la SEC. ID NO.: 8 (Vir), SEC. ID NO.: 9 (Pm) SEC. ID NO.: 10 (Xl), SEC. ID NO.: 11 (Sz), SEC. ID NO.: 105 (Vir), SEC. ID NO.: 106 (Vir), SEC. ID NO.: 107 (Vir) o la SEC. ID NO.: 108 (Vir), y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEC. ID NO.: 8 (Vir), SEC. ID NO.: 9 (Pm) SEC. ID NO.: 10 (Xl), SEC. ID NO.: 11 (Sz), SEC. ID NO.: 105 (Vir), SEC. ID NO.: 106 (Vir), SEC.

ID NO.: 107 (Vir) o SEC. ID NO.: 108 (Vir).

Una actividad biológica de la misma naturaleza con respecto a esta secuencia es la descrita anteriormente, es decir, la capacidad de catalizar la conversión de UDP-glucuronato o UDP-N-acetil-glucosa en ácido hialurónico.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 50% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con tal secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que tal secuencia de aminoácidos de referencia dada.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 65% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con tal secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la

secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia
 5 abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con tal secuencia de aminoácidos de referencia, y también una identidad biológica de la misma naturaleza que tal secuencia
 10 de aminoácidos de referencia.

Como se mencionó anteriormente, el nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa en la presente invención está regulado por al menos un promotor y al
 15 menos un terminador, tal como se define en la presente a continuación con más detalle, que están presentes en la posición 5' y 3' respectivamente de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa.

20 UDP-GLUCOSA DESHIDROGENASA (UDP-GlcDH O HASB)

La UDP-glucosa deshidrogenasa es una proteína que se sabe en la técnica que cataliza la conversión de UDP-glucosa en UDP-glucuronato. La UDP-glucosa deshidrogenasa que se origina en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, el virus *Chlorella PBCV1* o
 25 el *Streptococcus zooepidemicus* puede denominarse HASB.

Un método implementado para medir el nivel de actividad de un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa pertenece al conocimiento general del experimentado en la técnica.

5 A este respecto, el experimentado en la técnica podrá referirse ventajosamente al método descrito por Oka y Jigami (FEBS Journal 273, 2645-2657, 2006).

El polipéptido preferido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa en la presente descripción es una enzima que
10 tiene un número EC 1.1.1.22.

De acuerdo con una modalidad preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa pueden originarse o derivarse de organismos seleccionados preferentemente de un
15 grupo que comprende organismos procariotas y organismos eucariotas. En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa pueden originarse o derivarse de arqueobacterias. En algunas modalidades preferidas, uno o más
20 ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa pueden originarse o derivarse de levadura, y especialmente de *Arabidopsis thaliana*, virus *Chlorella PBCV1* o *Streptococcus zooepidemicus haromyces*.

25 De acuerdo con una modalidad aún preferida, uno o más

ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa se pueden seleccionar del grupo que consiste de secuencias de ácidos nucleicos que tienen (i) por lo menos 65%, ventajosamente por lo menos 70%, preferentemente por lo menos 80%, de identidad de ácido nucleico con un ácido nucleico como se establece como la secuencia SEC. ID NO.: 12 (At), SEC. ID NO.: 13 (Vir), SEC. ID NO.: 14 (Vir) o SEC. ID NO.: 15 (Sz), y (ii) una actividad biológica de la misma naturaleza que el ácido nucleico como se establece como la secuencia SEC. ID NO.: 12 (At), SEC. ID NO.: 13 (Vir), SEC. ID NO.: 14 (Vir) o SEC. ID NO.: 15 (Sz). Los ácidos nucleicos expuestos como secuencias SEC. ID NO.: 12 (At), SEC. ID NO.: 13 (Vir), SEC. ID NO.: 14 (Vir) y SEC. ID NO.: 15 (Sz) codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa procedente, respectivamente, de *Arabidopsis thaliana* (At), virus *Chlorella PBCV1* (Vir) o *Streptococcus zooepidemicus* (Sz), que en la presente también puede denominarse colectivamente HASB.

Una actividad biológica de la misma naturaleza respecto de esta secuencia es, como se explicó anteriormente, la capacidad de codificar un polipéptido que convierte la UDP-glucuronato en UDP-glucuronato.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 65% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca

secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de
5 nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la tal secuencia de ácido nucleico de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 70% de identidad de nucleótidos
10 con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con las secuencias
15 de ácidos nucleicos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que tales secuencias de ácidos nucleicos de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 80% de identidad de nucleótidos
20 con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una
25 actividad biológica de la misma naturaleza que tales secuencias

de ácidos nucleicos de referencia.

Para la secuencia de aminoácidos del polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana*, virus *Chlorella PBCV1* o *Streptococcus zooepidemicus*, el experimentado en la técnica puede hacer referencia a los números de acceso NP_173979.1, NP_048965 o KIS19289, respectivamente, en la base de datos UniProt, o a las secuencias como se establece en la SEC. ID NO.: 16 (At), SEC. ID NO.: 17 (Vir) y SEC. ID NO.: 18 (Sz) descritas en la presente.

De acuerdo con otra modalidad particular, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-Glucosa deshidrogenasa pueden ser ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 55%, ventajosamente por lo menos 65%, de preferencia por lo menos 80%, de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO.: 16 (At), SEC. ID NO.: 17 (Vir) y SEC. ID NO.: 18 (Sz), y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO.: 16 (At), SEC. ID NO.: 17 (Vir) y SEC. ID NO.: 18 (Sz).

Una actividad biológica de la misma naturaleza con respecto a esta secuencia es la descrita anteriormente, es decir, la capacidad de catalizar la conversión de UDP-

glucuronato en UDP-glucuronato.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 55% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia
5 abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos
10 con la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que tal secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 65% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia
15 abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos
20 con la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia
25

abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una
 5 actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se mencionó anteriormente, el nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa deshidrogenasa en
 10 la presente invención está regulado por al menos un promotor y al menos un terminador, tal como se define más adelante en la presente con mayor detalle, que están presentes en la posición 5' y 3' respectivamente de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad
 15 UDP-glucosa deshidrogenasa.

HIALURONIDASA (HYAL)

La enzima hialuronidasa es una proteína que se describe en la técnica para catalizar la degradación de moléculas de ácido hialurónico en moléculas de ácido hialurónico más
 20 pequeñas. La hialuronidasa procedente de *Cupiennius salei*, *Loxosceles intermedia*, *Hirudo nipponia*, *Bothrops atrox*, *Tityus serrulatus* o *Vespa magnifica* puede denominarse HYAL.

El polipéptido que tiene actividad hialuronidasa de la invención puede poseer tanto una señal de secreción como una
 25 señal de anclaje o una señal de secreción y ninguna señal de

anclaje o una señal de secreción-anclaje con una función dual de secreción y anclaje. Cuando el polipéptido codificado que tiene actividad hialuronidasa posee tanto una señal de secreción como una señal de anclaje, puede denominarse HYAL-31
5 como se representa en los ejemplos. Cuando el polipéptido codificado que tiene actividad hialuronidasa posee una señal de secreción y ninguna señal de anclaje, puede denominarse HYAL-3 como se representa en los ejemplos.

Un método implementado para medir el nivel de actividad
10 de un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa pertenece al conocimiento general del experimentado en la técnica.

A este respecto, el experimentado en la técnica puede controlar ventajosamente el peso molecular del ácido hialurónico obtenido en un gel de agarosa.

15 El polipéptido preferido que tiene actividad hialuronidasa en la presente descripción es una enzima que tiene un número EC de n° EC 3.2.1.35.

De acuerdo con una modalidad preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene
20 actividad hialuronidasa pueden originarse o derivarse de organismos preferentemente seleccionados de un grupo que comprende organismos procariotas y organismos eucariotas. En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa
25 pueden originarse o derivarse de arqueobacterias. En algunas

modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa pueden originarse o derivarse de organismos seleccionados preferentemente entre levaduras. En algunas otras modalidades

5 preferidas, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa pueden originarse o derivarse de *Cupiennius salei* (Csa), *Loxosceles intermedia* (Li), *Hirudo nipponia* (Hn), *Bothrops atrox* (Ba), *Tityus serrulatus* (Ts) o *Vespa magnifica* (Vm), y

10 en particular de *Cupiennius salei* (Csa), *Loxosceles intermedia* (Li), *Hirudo nipponia* (Hn), *Bothrops atrox* (Ba) y *Tityus serrulatus* (Ts).

De acuerdo con una modalidad aún preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido

15 que tiene actividad hialuronidasa se pueden seleccionar del grupo que consiste de secuencias de ácidos nucleicos que tienen por lo menos 65%, ventajosamente por lo menos 70%, preferentemente por lo menos 80%, de identidad de ácido nucleico con un ácido nucleico de la SEC. ID NO.: 19 (Ba), SEC.

20 ID NO.: 25 (Li), SEC. ID NO.: 21 (Csa), SEC. ID NO.: 27 (Ts), SEC. ID NO.: 23 (Hn), o SEC. ID NO.: 29 (Vm) y también una actividad biológica de la misma naturaleza que el ácido nucleico de SEC. ID NO.: 19 (Ba), SEC. ID NO.: 25 (Li), SEC. ID NO.: 21 (Csa), SEC. ID NO.: 27 (Ts), SEC. ID NO.: 23 (Hn),

25 o SEC. ID NO.: 29 (Vm). El ácido nucleico de SEC. ID NO.: 19

(Ba), SEC. ID NO.: 25 (Li), SEC. ID NO.: 21 (Csa), SEC. ID NO.: 27 (Ts), SEC. ID NO.: 23 (Hn) o SEC. ID NO.: 29 (Vm) codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa, comprende una señal de secreción y ninguna señal de anclaje, y se origina o deriva de *Bothrops atrox*, *Loxosceles intermedia*, *Cupiennius salei*, *Tityus serrulatus*, *Hirudo nipponia* o *Vespa magnifica*, respectivamente.

De acuerdo con otra modalidad preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa se pueden seleccionar del grupo que consiste de secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 65%, ventajosamente por lo menos 70%, de preferencia por lo menos 80% de identidad de ácido nucleico con un ácido nucleico de la SEC. ID NO.: 22 (Csa), SEC. ID NO.: 26 (Li), SEC. ID NO.: 24 (Hn), SEC. ID NO.: 20 (Ba), SEC. ID NO.: 28 (Ts) o SEC. ID NO.: 30 (Vm), y también una actividad biológica de la misma naturaleza que el ácido nucleico de la SEC. ID NO.: 22 (Csa), SEC. ID NO.: 26 (Li), SEC. ID NO.: 24 (Hn), SEC. ID NO.: 20 (Ba), SEC. ID NO.: 28 (Ts) o SEC. ID NO.: 30 (Vm). El ácido nucleico de la SEC. ID NO.: 22 (Csa), SEC. ID NO.: 26 (Li), SEC. ID NO.: 24 (Hn), SEC. ID NO.: 20 (Ba), SEC. ID NO.: 28 (Ts) o SEC. ID NO.: 30 (Vm) codifican un polipéptido que tiene actividad de hialuronidasa, comprenden una señal de secreción y una señal de anclaje, y se originan o derivan de *Cupiennius salei*, *Loxosceles intermedia*, *Hirudo nipponia*,

Bothrops atrox, *Tityus serrulatus* o *Vespa magnifica*, respectivamente.

En una modalidad particular, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa se pueden seleccionar del grupo que consiste de

5 secuencias de ácido nucleico (i) que tienen por lo menos 65%, ventajosamente por lo menos 70%, de preferencia por lo menos 80%, de identidad de ácido nucleico con un ácido nucleico de la SEC. ID NO.: 19 (Ba), SEC. ID NO.: 25 (Li), SEC. ID NO.: 21

10 (Csa), SEC. ID NO.: 27 (Ts) o SEC. ID NO.: 23 (Hn) y (ii) que tiene una actividad biológica de la misma naturaleza que el ácido nucleico de la SEC. ID NO.: 19 (Ba), SEC. ID NO.: 25 (Li), SEC. ID NO.: 21 (Csa), SEC. ID NO.: 27 (Ts), o SEC. ID NO.: 23 (Hn).

15 En una modalidad particular, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa se pueden seleccionar del grupo que consiste de secuencias de ácidos nucleicos que tienen (i) por lo menos 65%, ventajosamente por lo menos 70%, de preferencia

20 por lo menos 80%, de identidad de ácido nucleico con un ácido nucleico de la SEC. ID NO.: 22 (Csa), SEC. ID NO.: 26 (Li), SEC. ID NO.: 24 (Hn), SEC. ID NO.: 20 (Ba) o SEC. ID NO.: 28 (Ts) y (ii) que tiene una actividad biológica de la misma naturaleza que el ácido nucleico de la SEC. ID NO.: 22 (Csa),

25 SEC. ID NO.: 26 (Li), SEC. ID NO.: 24 (Hn), SEC. ID NO.: 20

(Ba), o SEC. ID NO.: 28 (Ts).

Una actividad biológica de la misma naturaleza respecto de esta secuencia es, como se explicó anteriormente, la capacidad de codificar un polipéptido que cataliza la degradación de moléculas de ácido hialurónico en moléculas de ácido hialurónico más pequeñas.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 65% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 70% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica de la misma

naturaleza que la secuencia de ácido nucleico de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 80% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca
5 secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de
10 ácido nucleico de referencia.

Para la secuencia de aminoácidos de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad de hialuronidasa de *Cupiennius salei*, *Loxosceles intermedia*, *Hirudo nipponia*, *Bothrops atrox* o *Tityus serrulatus*, el experimentado en la técnica puede hacer
15 referencia a los números de acceso A0A0S4JYH2, R4J7Z9, X4Y2L4, A0A2H4Z8F4 o P85841, respectivamente en la base de datos UniProt, o a la SEC. ID NO.: 33 (Csa), SEC. ID NO.: 37 (Li), SEC. ID NO.: 35 (Hn), SEC. ID NO.: 31 (Ba), SEC. ID NO.: 39
20 (Ts) o SEC. ID NO.: 41 (Vm), descritas en la presente.

De acuerdo con otra modalidad particular, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa pueden ser ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos
25 seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen

por lo menos 50%, ventajosamente por lo menos 65%, preferentemente por lo menos 80%, de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO.: 33 (Csa), SEC. ID NO.: 37 (Li), SEC. ID NO.: 35 (Hn), SEC. ID NO.: 31 (Ba), SEC. ID NO.: 39 (Ts) o SEC. ID NO.: 41 (Vm) que comprenden una señal de secreción y ninguna señal de anclaje, y además una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos SEC. ID NO.: 33 (Csa), SEC. ID NO.: 37 (Li), SEC. ID NO.: 35 (Hn), SEC. ID NO.: 31 (Ba), SEC. ID NO.: 39 (Ts) o SEC. ID NO.: 41 (Vm).

De acuerdo con otra modalidad particular, el uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa pueden ser ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 55%, ventajosamente por lo menos 65%, preferentemente por lo menos 80%, de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO.: 34 (Csa), SEC. ID NO.: 38 (Li), SEC. ID NO.: 36 (Hn), SEC. ID NO.: 32 (Ba), SEC. ID NO.: 40 (Ts) o SEC. ID NO.: 42 (Vm) que comprenden una señal de secreción y una señal de anclaje, y además una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO.: 34 (Csa), SEC. ID NO.: 38 (Li), SEC. ID NO.: 36 (Hn), SEC. ID NO.: 32 (Ba), SEC. ID NO.: 40 (Ts) o SEC. ID NO.: 42 (Vm).

En una modalidad particular, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa pueden ser ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 55%, ventajosamente por lo menos 65%, de preferencia por lo menos 80%, de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO.: 33 (Csa), SEC. ID NO.: 37 (Li), SEC. ID NO.: 35 (Hn), SEC. ID NO.: 31 (Ba), o la SEC. ID NO.: 39 (Ts), y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de SEC. ID NO.: 33 (Csa), SEC. ID NO.: 37 (Li), SEC. ID NO.: 35 (Hn), SEC. ID NO.: 31 (Ba), o la SEC. ID NO.: 39 (Ts).

En otra modalidad particular, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa pueden ser ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 55%, ventajosamente por lo menos 65%, de preferencia por lo menos 80%, de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO.: 34 (Csa), SEC. ID NO.: 38 (Li), SEC. ID NO.: 36 (Hn), SEC. ID NO.: 32 (Ba) o la SEC. ID NO.: 40 (Ts), y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO.: 34 (Csa), SEC. ID NO.: 38 (Li), SEC. ID NO.: 36 (Hn), SEC. ID

NO.: 32 (Ba) o SEC. ID NO.: 40 (Ts).

Una actividad biológica de la misma naturaleza con respecto a esta secuencia es la descrita anteriormente, es decir, la capacidad de catalizar la degradación de moléculas de ácido hialurónico en moléculas de ácido hialurónico más pequeñas.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 55% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 65% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia, y

también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia
5 abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una
10 actividad biológica de la misma naturaleza que tal secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se mencionó anteriormente, el nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa en la presente
15 invención están regulados por al menos un promotor y al menos un terminador, tal como se define más adelante en la presente con mayor detalle, que están presentes en la posición 5' y 3' respectivamente de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa.

20 GLUTAMINA SINTETASA (GLN1)

La enzima glutamina sintetasa es una proteína que se describe en la técnica para catalizar la conversión de glutamato en glutamina. La glutamina sintetasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae* puede denominarse GLN1.

25 Un método implementado para medir el nivel de actividad

de un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa pertenece al conocimiento general del experimentado en la técnica.

A este respecto, el experimentado en la técnica podrá
5 referirse ventajosamente al método descrito por Legrain *et al.*,
(1982) European Journal of Biochemistry 123, 611-616.

El polipéptido preferido que tiene actividad glutamina sintetasa en la presente invención es una enzima que tiene un número EC de n° EC 6.3.1.2.

10 De acuerdo con una modalidad preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa pueden originarse o derivarse de organismos preferentemente seleccionados de un grupo que comprende organismos procariotas y organismos eucariotas. En
15 algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa pueden originarse o derivarse de arqueobacterias. En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina
20 sintetasa pueden originarse o derivarse de una levadura, y especialmente de *Saccharomyces cerevisiae*.

De acuerdo con una modalidad aún preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa se pueden seleccionar
25 del grupo que consiste de secuencias de ácidos nucleicos que

tienen (i) por lo menos 65%, ventajosamente por lo menos 70%, preferentemente por lo menos 80%, de identidad de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico expuesta como la secuencia SEC. ID NO.: 96 (Sc), y (ii) una actividad biológica
5 de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico expuesta como la secuencia SEC. ID NO.: 96 (Sc). El ácido nucleico expuesto como la secuencia SEC. ID NO.: 96 codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, que también puede
10 denominarse GLN1.

Una actividad biológica de la misma naturaleza en relación con esta secuencia es, como se explicó anteriormente, la capacidad de codificar un polipéptido que convierte el glutamato en glutamina, en particular mediante el consumo de
15 un ATP y un NH_4^+ .

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 65% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 66%, 67%,
20 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que
25 la secuencia de ácido nucleico de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 70% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 71%, 72%,
5 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico de
10 referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 80% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 81%, 82%,
15 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico de referencia.

20 Para la secuencia de aminoácidos del polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, el experimentado en la técnica puede hacer referencia al número de acceso P32288 en la base de datos UniProt, o a la secuencia SEC. ID NO.: 97 descrita en la
25 presente.

De acuerdo con otra modalidad particular, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa pueden ser ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos
5 seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 35%, ventajosamente por lo menos 65%, preferentemente por lo menos 80%, de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO.: 97, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia
10 de aminoácidos de la SEC. ID NO.: 97.

Una actividad biológica de la misma naturaleza con respecto a esta secuencia es la descrita anteriormente, es decir, la capacidad para catalizar la conversión de glutamato en glutamina.

15 Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 35% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 36%,
37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%,
20 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%,
61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%,
73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%,
85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,
97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de
25 aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica

de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 65% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia
5 abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de
10 aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia
15 abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una
20 actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se mencionó anteriormente, el nivel de expresión del polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa en la presente invención está regulado por al menos un promotor y al
25 menos un terminador, tal como se define más detalladamente a

continuación, que están presentes en la posición 5' y 3' respectivamente de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa.

5 GLUTAMATO SINTASA (GLT1)

La enzima glutamato sintasa es una proteína que se describe en la técnica para catalizar la conversión de glutamina en glutamato. La glutamato sintasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae* puede denominarse GLT1.

10 Un método implementado para medir el nivel de actividad de un polipéptido que tiene actividad glutamato sintasa pertenece al conocimiento general del experimentado en la técnica.

A este respecto, el experimentado en la técnica puede
15 referirse ventajosamente al método descrito por Roon *et al.*, (1974) Journal of bacteriology 118,89-95.

El polipéptido preferido que tiene actividad glutamato sintasa en la presente invención es una enzima que tiene un número EC de n° EC 1.4.1.14 (SEC. ID NO.: 98).

20 Para la secuencia de aminoácidos del polipéptido que tiene actividad glutamato sintasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el experimentado en la técnica puede hacer referencia al número de acceso Q12680 en la base de datos UniProt, o a la secuencia SEC. ID NO.: 99 descrita en la presente.

25 Como se mencionó anteriormente, el nivel de expresión de

un polipéptido que tiene actividad glutamato sintasa puede reducirse en una célula recombinante, y en particular en una levadura recombinante de acuerdo con la invención en comparación con la célula, y en particular levadura, en su forma no recombinada, es decir, por lo menos un gen endógeno de la célula recombinante, y en particular de la levadura recombinante, está alterado.

GLUTAMINA-FRUCTOSA-6-FOSFATO AMIDOTRANSFERASA (GFA1)

La enzima glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa es una proteína que se describe en la técnica para catalizar la conversión de fructosa-6-fosfato en glucosamina-6-fosfato. La glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae* puede denominarse GFA1.

Un método implementado para medir el nivel de actividad de un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa pertenece al conocimiento general del experimentado en la técnica.

A este respecto, el experimentado en la técnica puede referirse ventajosamente al método descrito por Shiga Shibatan y Hiroaki Kitazawa (Plant Biotechnology 26, 149-152, 2009).

El polipéptido preferido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa en la presente invención es una enzima que tiene un número EC de n° EC 2.6.1.16.

De acuerdo con una modalidad preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que

tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato
amidotransferasa pueden originarse o derivarse de organismos
preferentemente seleccionados en un grupo que comprende
organismos procariotas y organismos eucariotas. En algunas
5 modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que
codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina-
fructosa-6-fosfato amidotransferasa pueden originarse o
derivarse de arqueobacterias. En algunas modalidades, uno o
más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un
10 polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-
fosfato amidotransferasa pueden originarse o derivarse de
organismos seleccionados preferentemente de *Bacillus*
subtilis y levaduras. En algunas otras modalidades
preferidas, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que
15 codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina-
fructosa-6-fosfato amidotransferasa pueden originarse o
derivarse de una levadura, y especialmente de *Saccharomyces*
cerevisiae.

De acuerdo con una modalidad aún preferida, uno o más
20 ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido
que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato
amidotransferasa se pueden seleccionar del grupo que consiste
de secuencias de ácidos nucleicos que tienen (i) por lo menos
65%, ventajosamente por lo menos 70%, de preferencia por lo
25 menos 80%, de identidad de ácido nucleico con la secuencia de

ácido nucleico como se establece como la secuencia SEC. ID NO.: 47 (Sc), y (ii) una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico como se establece como la secuencia SEC. ID NO.: 47 (Sc). El ácido nucleico expuesto como
5 la secuencia SEC. ID NO.: 47 codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, que también puede denominarse GFA1.

De acuerdo con otra modalidad, el uno o más ácidos
10 nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa se pueden seleccionar del grupo que consiste de las secuencias de ácido nucleico que tienen (i) por lo menos 65%, ventajosamente por lo menos 70%, de preferencia por lo menos 80%, de identidad
15 del ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico establecida como la secuencia SEC. ID NO.: 48 o SEC. ID NO.: 49, y (ii) una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico como se establece como la secuencia SEC. ID NO.: 48 o SEC. ID NO.: 49. La secuencia de
20 ácido nucleico expuesta como la secuencia SEC. ID NO.: 48 o la SEC. ID NO.: 49 codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa procedente de del *virus Chlorella PBCV1*.

Una actividad biológica de la misma naturaleza respecto a
25 esta secuencia es, como se explicó anteriormente, la capacidad

de codificar un polipéptido que convierte la fructosa-6-fosfato en glucosamina-6-fosfato.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 65% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca
5 secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de
10 nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 70% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca
15 secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de
20 ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 80% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca
25

secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una
5 actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico de referencia.

Para la secuencia de aminoácidos del polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, el experimentado en la
10 técnica puede hacer referencia al número de acceso NP8012818 en la base de datos UniProt, o a la secuencia SEC. ID NO.: 50 descrita en la presente.

Para la secuencia de aminoácidos del polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa
15 procedente del virus *Chlorella PBCV1*, el experimentado en la técnica también puede hacer referencia al número de acceso NP_048448 en la base de datos UniProt, o a la secuencia SEC. ID NO. 51 descrita en la presente.

De acuerdo con otra modalidad particular, uno o más ácidos
20 nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa pueden ser ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 35%,
25 ventajosamente por lo menos 65%, preferentemente por lo menos

80%, de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO.: 50 o con la SEC. ID NO.: 51, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácido de la SEC. ID NO.: 50 o con la SEC. ID NO.: 51.

Una actividad biológica de la misma naturaleza con respecto a esta secuencia es la descrita anteriormente, es decir, la capacidad de catalizar la conversión de fructosa-6-fosfato en glucosamina-6-fosfato.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 35% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 65% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia

abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con tal secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se mencionó anteriormente, el nivel de expresión del polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa en la presente invención está regulado por al menos un promotor y por al menos un terminador, tal como se define más detalladamente a continuación en la presente, que están presentes en la posición 5' y 3' respectivamente de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa.

UDP-N-ACETILGLUCOSAMINA PIROFOSFORILASA (QRI1)

La enzima UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa es una proteína que se describe en la técnica para catalizar la conversión de N-acetil-glucosamina-6-fosfato en UDP-N-acetil-glucosa. La UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae* puede denominarse QRI1.

Un método implementado para medir el nivel de actividad de un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa pertenece al conocimiento general del experimentado en la técnica.

A este respecto, el experimentado en la técnica puede referirse ventajosamente al método descrito por Mio *et al.* (The Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, No 23, 5 de junio de 1998, 14392-14397) excepto que la UDP-N-acetil-glucosamina se detecta mediante LC MS/MS usando una columna Synergi RP Fusion.

El polipéptido preferido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa en la presente invención es una enzima que tiene un número EC de n° EC 2.7.7.23.

De acuerdo con una modalidad preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa pueden originarse o derivarse de organismos preferentemente seleccionados en un grupo que consiste de organismos procariotas y organismos eucariotas. En algunas modalidades,

uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa pueden originarse o derivarse de arqueobacterias. En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa pueden originarse o derivarse de organismos preferentemente seleccionados de *Bacillus subtilis* y levaduras. En algunas otras modalidades preferidas, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa pueden originarse o derivarse de levaduras, y especialmente de *Saccharomyces cerevisiae*.

De acuerdo con una modalidad aún preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa se pueden seleccionar del grupo que consiste de secuencias de ácido nucleico que tienen (i) por lo menos 65%, ventajosamente por lo menos 70%, preferentemente por lo menos 80%, de identidad de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico como se establece como la SEC. ID NO.: 52, y (ii) una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico como se establece como la SEC. ID NO.: 52. La secuencia de ácido nucleico expuesta como la SEC. ID NO.: 52 codifica un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina

pirofosforilasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, que también puede denominarse QRI1.

Una actividad biológica de la misma naturaleza respecto de esta secuencia es, como se ha explicado anteriormente, la
5 capacidad de codificar un polipéptido que convierte el N-acetil-glucosamina-6-fosfato en UDP-N-acetil-glucosa.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 65% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca
10 secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia,
15 y también una actividad biológica de la misma naturaleza que esta secuencia de ácido nucleico de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 70% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca
20 secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica
25 de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico de

referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 80% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca
5 secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de
10 ácido nucleico de referencia.

Para la secuencia de aminoácidos del polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, el experimentado en la técnica puede hacer referencia al número de acceso NP_010180 en la base
15 de datos UniProt, o a la SEC. ID NO.: 53 descrita en la presente.

De acuerdo con otra modalidad particular, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa pueden ser
20 ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 35%, ventajosamente por lo menos 45%, de preferencia por lo menos 80%, de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta como
25 secuencia la SEC. ID NO.: 53, y también una actividad biológica

de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos expuesta como la secuencia SEC. ID NO.: 53.

Una actividad biológica de la misma naturaleza con respecto a esta secuencia es la descrita anteriormente, es decir, la capacidad de catalizar la conversión de N-acetil-glucosamina-6-fosfato en UDP-N-acetil-glucosa.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 35% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 45% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%,

71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se mencionó anteriormente, el nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa en la presente invención está regulado por al menos un promotor y por al menos un terminador, tal como se define más adelante en la presente en detalle, que están presentes en la posición 5' y 3' respectivamente de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa.

FOSFOGLUCUMUTASA-1 (PGM1)

La enzima fosfoglucomutasa-1 es una proteína que se describe en la técnica para catalizar la conversión de glucosa-6-fosfato en glucosa-1-fosfato. La fosfoglucomutasa-1
5 procedente de *Saccharomyces cerevisiae* puede denominarse PGM1. Un método implementado para medir el nivel de actividad de un polipéptido frente a la actividad fosfoglucomutasa-1 pertenece al conocimiento general del experimentado en la técnica.

A este respecto, el experimentado en la técnica puede
10 referirse ventajosamente al método descrito por Tiwari and Bhat (Biochemical and Biophysical Research Communications 366, 340-345, 2008).

El polipéptido preferido que tiene actividad de fosfoglucomutasa-1 en la presente invención es una enzima que
15 tiene un número EC del n° 5.4.2.2.

De acuerdo con una modalidad preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 pueden originarse a partir de organismos seleccionados preferentemente en un grupo que
20 consiste de organismos procariotas y organismos eucariotas. En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 pueden originarse o derivarse de arqueobacterias. En algunas modalidades, uno o más ácidos
25 nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene

actividad fosfoglucomutasa-1 pueden originarse o derivarse de organismos preferentemente seleccionados de bacterias. En una modalidad preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 pueden originarse o derivarse de *Saccharomyces cerevisiae*.

De acuerdo con una modalidad, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 se pueden seleccionar del grupo que consiste de secuencias de ácido nucleico que tienen (i) por lo menos 80% de identidad de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico expuesta como la secuencia SEC. ID NO.: 54, que se origina a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, y (ii) una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico expuesta como la secuencia SEC. ID NO.: 54.

Una actividad biológica de la misma naturaleza respecto de esta secuencia es, como se explicó anteriormente, la capacidad de codificar un polipéptido que convierte la Glucosa-6-fosfato en Glucosa-1-fosfato.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 80% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la

secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico de referencia.

Para la secuencia de aminoácidos del péptido que tiene
5 actividad fosfoglucomutasa-1 de *Saccharomyces cerevisiae*, el experimentado en la técnica puede hacer referencia al número de acceso NP33401 en la base de datos UniProt, o a la SEC. ID NO.: 55 descrita en la presente.

De acuerdo con otra modalidad particular, uno o más ácidos
10 nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 pueden ser ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 80% de identidad de aminoácidos con la secuencia
15 de aminoácidos expuesta como la secuencia SEC. ID NO.: 55, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos expuesta como la secuencia SEC. ID NO.: 55.

Una actividad biológica de la misma naturaleza con
20 respecto a esta secuencia es la descrita anteriormente, es decir, la capacidad de catalizar la conversión de Glucosa-6-fosfato en Glucosa-1-fosfato.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% de identidad de
25 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia

abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una
5 actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se mencionó anteriormente, el nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoglucomutasa-1 en la
10 presente invención está regulado por al menos un promotor y al menos un terminador, tal como se define más adelante en la presente con mayor detalle, que están presentes en la posición 5' y 3' respectivamente de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad
15 fosfoglucomutasa-1.

UTP-GLUCOSA-1-FOSFATO URIDILTRANSFERASA (UGP1)

La enzima UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa es una proteína que se describe en la técnica para catalizar la conversión de glucosa-1-fosfato en UDP-glucosa. La UTP-
20 glucosa-1-fosfato uridililtransferasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae* puede denominarse UGP1.

Un método implementado para medir el nivel de actividad de un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa pertenece al conocimiento general del
25 experimentado en la técnica.

A este respecto, el experimentado en la técnica podrá referirse ventajosamente al método descrito por Roeben (J. Mol. Biol 364, 551-560, 2006).

El polipéptido preferido que tiene actividad UTP-glucosa-
5 1-fosfato uridililtransferasa en la presente invención es una enzima que tiene un número EC de nº 2.7.7.9.

De acuerdo con una modalidad preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa
10 mayoritariamente derivan de organismos seleccionados preferentemente de un grupo que consiste de organismos procariotas y organismos eucariotas. En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato
15 uridililtransferasa puede originarse o derivarse de arqueobacterias. En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa pueden originarse o derivarse de organismos preferentemente
20 seleccionados de bacterias. En una modalidad preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa pueden originarse o derivarse de *Saccharomyces cerevisiae*.

De acuerdo con una modalidad particular, uno o más ácidos
25 nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene

actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa se pueden seleccionar del grupo que consiste de secuencias de ácido nucleico que tienen (i) por lo menos 80% de identidad de ácido nucleico con un ácido nucleico como se establece como la
5 secuencia SEC. ID NO.: 56, procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, y (ii) una actividad biológica de la misma naturaleza que el ácido nucleico como se establece como la secuencia SEC. ID NO.: 56.

Una actividad biológica de la misma naturaleza respecto
10 de esta secuencia es, como se explicó anteriormente, la capacidad de codificar un polipéptido que convierte la Glucosa-1-fosfato en UDP-glucosa.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 80% de identidad de nucleótidos
15 con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una
20 actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico de referencia.

Para la secuencia de aminoácidos del polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, el experimentado en la técnica
25 puede hacer referencia al número de acceso NP_32861 en la base

de datos UniProt, o a la secuencia expuesta como la secuencia SEC. ID NO.: 57 descrita en la presente.

De acuerdo con otra modalidad particular, el uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido
5 que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa pueden ser ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 80% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta como
10 la SEC. ID NO.: 57, y además una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEC. ID NO.: 57.

Una actividad biológica de la misma naturaleza con respecto a esta secuencia es la descrita anteriormente, es
15 decir, la capacidad de catalizar la conversión de glucosa-1-fosfato en UDP-glucosa.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia
20 abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de
25 aminoácidos de referencia.

Como se mencionó anteriormente, el nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa en la presente invención está regulado por al menos un promotor y al menos un terminador, tal como en la presente se define con más detalle, que están presentes en la posición 5' y 3' respectivamente de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa.

10 GLUCOSAMINA-6-FOSFATO N-ACETILTRANSFERASA (GNA1)

La enzima glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa es una proteína que se describe en la técnica para catalizar la conversión de glucosamina-6-fosfato en N-acetil-glucosamina-6-fosfato. La glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae* puede denominarse GNA1. Un método implementado para medir el nivel de actividad de un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa pertenece al conocimiento general del experimentado en la técnica.

20 A este respecto, el experimentado en la técnica puede referirse ventajosamente al método descrito por Li *et al.* (Anal. Biochem. 370, 142-146, 2007).

El polipéptido preferido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa en la presente invención es una enzima que tiene un número EC de n° 2.3.1.4.

25

De acuerdo con una modalidad preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa pueden originarse o derivarse de organismos seleccionados preferentemente de un grupo que consiste de organismos procariotas y organismos eucariotas. En algunas modalidades preferidas, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa pueden originarse o derivarse de una levadura, y especialmente de *Saccharomyces cerevisiae*.

De acuerdo con una modalidad particular, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa del grupo que consiste de secuencias de ácido nucleico que tienen (i) por lo menos 80% de identidad de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico como se establece como la secuencia SEC. ID NO.: 58, y (ii) una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico expuesta como la secuencia SEC. ID NO.: 58. La secuencia de ácido nucleico expuesta como la secuencia SEC. ID NO.: 58 codifica un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, que también puede denominarse GNA1.

Una actividad biológica de la misma naturaleza respecto a esta secuencia es, como se explicó anteriormente, la capacidad

de codificar un polipéptido que convierte la Glucosamina-6-fosfato en N-acetil-glucosamina-6-fosfato.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 80% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca
5 secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una
10 actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico de referencia.

Para la secuencia de aminoácidos del polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, el experimentado en la técnica
15 puede hacer referencia al número de acceso NP_116637 en la base de datos UniProt, o a la SEC. ID NO.: 59 descrita en la presente.

De acuerdo con otra modalidad particular, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene
20 actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa pueden ser ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 80% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta como la
25 SEC. ID NO.: 59, y también una actividad biológica de la misma

naturaleza que la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEC. ID NO.: 59.

Una actividad biológica de la misma naturaleza con respecto a esta secuencia es la descrita anteriormente, es decir, la capacidad de catalizar la conversión de glucosamina-6-fosfato en N-acetil-glucosamina-6-fosfato.

Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se mencionó anteriormente, el nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa en la presente invención está regulado por al menos un promotor y al menos un terminador, tal como se define en la presente a continuación con más detalle, que están presentes en la posición 5' y 3' respectivamente de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa.

FOSFOACETILGLUCOSAMINA MUTASA (PCM1)

La enzima fosfoacetilglucosamina mutasa es una proteína que se describe en la técnica para catalizar la conversión de N-acetil-glucosamina-6-fosfato en N-acetil-glucosamina-1-fosfato. La fosfoacetilglucosamina mutasa procedente de
5 *Saccharomyces cerevisiae* puede denominarse PCM1.

Un método implementado para medir el nivel de actividad de un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa pertenece al conocimiento general del experimentado en la técnica.

10 A este respecto, el experimentado en la técnica puede referirse ventajosamente al método descrito por Bandini *et al.* (Molecular Microbiology 85(3), 513-534, 2012).

El polipéptido preferido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa en la presente invención es una
15 enzima que tiene un número EC de nº 5.4.2.3.

De acuerdo con una modalidad preferida, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa mayoritariamente derivan de organismos seleccionados preferentemente en un grupo
20 que consiste de organismos procariotas y organismos eucariotas. En algunas modalidades preferidas, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa pueden originarse o derivarse de una levadura, y especialmente de *Saccharomyces cerevisiae*.

25 De acuerdo con una modalidad particular, uno o más ácidos

nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa se pueden seleccionar del grupo que consiste de secuencias de ácidos nucleicos que tienen (i) por lo menos 80% de identidad de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico expuesta como la SEC. ID NO.: 60, y (ii) una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico expuesta como la SEC. ID NO.: 60. El ácido nucleico expuesta como la SEC. ID NO.: 60 codifica un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa procedente de *Saccharomyces*, que también puede denominarse PCM1.

Una actividad biológica de la misma naturaleza respecto de esta secuencia es, como se explicó anteriormente, la capacidad de codificar un polipéptido que convierte la N-acetil-glucosamina-6-fosfato en N-acetil-glucosamina-1-fosfato.

Como se describe en la presente, una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 80% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de ácido nucleico de referencia.

Para la secuencia de aminoácidos del polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, el experimentado en la técnica puede hacer referencia al número de acceso NP_010856 en la base de
5 datos UniProt, o a la SEC. ID NO.: 61 descrita en la presente.

De acuerdo con otra modalidad particular, uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa pueden ser ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia
10 de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 80% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEC. ID NO.: 61, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos expuesta como la
15 SEC. ID NO.: 61.

Una actividad biológica de la misma naturaleza con respecto a esta secuencia es la descrita anteriormente, es decir, la capacidad de catalizar la conversión de N-acetil-glucosamina-6-fosfato en N-acetil-glucosamina-1-fosfato.

20 Como se describe en la presente, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia abarca secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%,
25 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con

la secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se mencionó anteriormente, el nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa en la presente invención está regulado por al menos un promotor y al menos un terminador, tal como se define más detalladamente a continuación en la presente, que están presentes en las posiciones 5' y 3' respectivamente de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad fosfoacetilglucosamina mutasa.

PROMOTORES

Como se describe en la presente, la expresión de los genes de interés que han sido modificados genéticamente para obtener una célula recombinante de acuerdo con la invención comprende secuencias reguladoras apropiadas que son funcionales en las células recombinantes de la invención, y en particular en células de levadura recombinantes de la invención, incluyendo en particular *Saccharomyces cerevisiae*.

Pueden usarse varios promotores para la expresión deseada de las secuencias codificantes de interés.

Los promotores de acuerdo con la invención pueden seleccionarse del grupo formado por los siguientes promotores:

- pTDH3 (SEC. ID NO.: 62),

- pTDH3.sk (SEC. ID NO.: 63),
- pTDH3-1.Sba (SEC. ID NO.: 64),
- pTDH3.Sar (SEC. ID NO.: 65),
- pEN02 (SEC. ID NO.: 66),
- 5 • pTEF3 (SEC. ID NO.: 67),
- pTEF1 (SEC. ID NO.: 68),
- pTEF1.ago (SEC. ID NO.: 69),
- pTEF1.sba (SEC. ID NO.: 70),
- pPDC1 (SEC. ID NO.: 71),
- 10 • pCCW12 (SEC. ID NO.: 72),
- pCCW12.Sm (SEC. ID NO.: 73),
- pCCW12.sk (SEC. ID NO.: 74),
- pCCW12.sba (SEC. ID NO.: 75),
- pCCW12.sar (SEC. ID NO.: 76),
- 15 • pNUP57 (SEC. ID NO.: 77),
- pCCW10.ago (SEC. ID NO.: 78),
- pCWP2 (SEC. ID NO.: 79), y
- pRPLA1 (SEC. ID NO.: 80).

Los promotores más particularmente interesantes en la
 20 presente invención pueden seleccionarse del grupo que consiste
 de:

- pTDH3 (SEC. ID NO.: 62),
- pTDH3.sk (SEC. ID NO.: 63),
- pTDH3-1.Sba (SEC. ID NO.: 64),
- 25 • pTDH3.Sar (SEC. ID NO.: 65),

- pEN02 (SEC. ID NO.: 66),
- pTEF3 (SEC. ID NO.: 67),
- pTEF1 (SEC. ID NO.: 68),
- pTEF1.ago (SEC. ID NO.: 69),
- 5 • pTEF1.sba (SEC. ID NO.: 70),
- pPDC1 (SEC. ID NO.: 71),
- pCCW12 (SEC. ID NO.: 72),
- pCCW12.Sm (SEC. ID NO.: 73),
- pCCW12.sk (SEC. ID NO.: 74),
- 10 • pCCW12.sba (SEC. ID NO.: 75), y
- pCCW12.sar (SEC. ID NO.: 76),

Estos promotores pueden seleccionarse, en particular, del grupo que consiste de pTDH3, pTDH3-1.Sba, pTDH3.Sar, pEN02, pTEF3, pTEF1, pPDC1, pCCW12, pCCW12.Sm, pCCW12.sk, pCCW12.sba
15 y pCCW12.sar.

Alternativamente, los promotores interesantes en la presente invención pueden seleccionarse del grupo que consiste de:

- pNUP57 (SEC. ID NO.: 77), y
- 20 • pCCW10.ago (SEC. ID NO.: 78).

Otros promotores de interés en la presente invención pueden ser:

- pCWP2 (SEC. ID NO.: 79); y
- pRPLA1 (SEC. ID NO.: 80).

25 Como se mencionó anteriormente, los promotores inducibles

o reprimibles son promotores cuya actividad está controlada por la presencia o ausencia de factores bióticos o abióticos y también por la cantidad de tal factor. En consecuencia, para algunos promotores, su actividad será inducida en particular, y, por lo tanto, aumentarse cuando la cantidad de un factor determinado aumenta o se aumenta y, en consecuencia, la actividad de estos mismos promotores puede reprimirse y, por lo tanto, reducirse cuando la cantidad de tal factor disminuye o se reduce. La cantidad de tal(es) factor(es) en el medio de cultivo de una célula de levadura recombinante de la invención que comprende promotores inducibles o reprimibles puede ser decidida y así controlada por el experimentado en la técnica.

Por ejemplo, aumentar la cantidad de cobre en un medio de cultivo de una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención que comprende un promotor pCUP-1 inducirá y, por lo tanto, aumentará la transcripción del gen bajo el control de este promotor. Por el contrario, reducir la cantidad de cobre en el medio de cultivo conducirá a una represión y, por lo tanto, a una transcripción reducida del gen bajo el control de este promotor.

En otro ejemplo, aumentar la cantidad de metionina en un medio de cultivo de una célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención que comprende un promotor pMET6 reprimirá y, por tanto, disminuirá la transcripción del gen bajo el control de este promotor. Por el contrario, la

reducción de la cantidad de metionina en el medio de cultivo conducirá a una transcripción inducida y por lo tanto aumentada del gen bajo el control de este promotor.

Por esta razón, en el presente texto se hace referencia a los siguientes promotores como promotores inducibles o reprimibles.

De acuerdo con una primera modalidad, los promotores inducibles o reprimibles de acuerdo con la invención pueden seleccionarse del grupo que comprende promotores inducibles o reprimibles con cobre, promotores inducibles o reprimibles con metionina y promotores inducibles o reprimibles con treonina, y son en particular CUP1 - cobre inducible o reprimible (SEC. ID NO.: 81).

De acuerdo con esta modalidad, el promotor inducible o reprimible de acuerdo con la invención puede ser en particular pCUP1.

La actividad de estos promotores es así inducida por la presencia creciente de metionina, cobre o treonina como se indicó anteriormente, y su actividad disminuye, es decir, se reprime, cuando se reduce la cantidad de metionina, cobre o treonina.

De acuerdo con una segunda modalidad, los promotores inducibles o reprimibles de acuerdo con la invención pueden seleccionarse del grupo que comprende promotores inducibles o reprimibles con cobre, promotores inducibles o reprimibles con

lisina y promotores inducibles o reprimibles con metionina, y en particular seleccionados del grupo que consiste de:

- pMET6 - metionina inducible o reprimible (SEC. ID NO.: 82),
- pMET25 - metionina inducible o reprimible (SEC. ID NO.: 83),

5 y

- pSAM1 - metionina inducible o reprimible (SEC. ID NO.: 84).

De acuerdo con esta modalidad particular, el promotor inducible o reprimible de acuerdo con la invención puede seleccionarse del grupo formado por pMET6, pMET25 y pSAM1.

10 La actividad de estos promotores queda así reprimida por la presencia creciente de metionina, cobre, lisina o glucosa como se indicó anteriormente, y su actividad aumenta, es decir, es inducida, cuando se reduce la cantidad de metionina, cobre, lisina o glucosa.

15 En una modalidad particular, los promotores inducibles o reprimibles de acuerdo con la invención pueden seleccionarse del grupo que comprende promotores inducibles o reprimibles con cobre, promotores inducibles o reprimibles con glucosa, promotores inducibles o reprimibles con lisina, promotores
20 inducibles o reprimibles con metionina y promotores inducibles o reprimible con treonina.

En una modalidad más particular, el promotor inducible o reprimible de acuerdo con la invención puede seleccionarse del grupo formado por pCUP1, pMET6, pSAM1 y pMET25.

25 También pueden usarse promotores sintéticos como se

describe en Blazeck & Alper (2013) *Biotechnol. J.* 8 46-58.

Los promotores de la invención pueden proceder de cualquier organismo de la clase *Saccharomycetes* y, en particular, pueden proceder de un organismo seleccionado del grupo formado por al menos uno de *Saccharomyces cerevisiae*,
 5 *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces castelii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces arboricola*, *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces mikatae*, *Ashbya gossypii*, *Kluveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*,
 10 *Debaryomyces castelii*, *Yarrowia lipolitica* y *Cyberlindnera jadinii*.

Los promotores de la invención pueden originarse preferentemente a partir de un organismo seleccionado del grupo que consiste de *Saccharomyces cerevisiae* (sc), *Saccharomyces mikatae* (Sm), *Saccharomyces kudriavzevii* (sk), *Saccharomyces bayanus* (sba) y *Saccharomyces arboricola* (Sar).

TERMINADORES

Como se describe en la presente, la expresión de los genes de interés que han sido modificados genéticamente para obtener una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una levadura recombinante de acuerdo con la invención, comprende secuencias terminadoras de la transcripción apropiadas que son funcionales en células recombinantes de la invención, y en particular en células de levadura recombinantes de la invención, en particular en
 20
 25

Saccharomyces cerevisiae.

Estos terminadores de la transcripción, idénticos o diferentes, se pueden encontrar en la literatura Yamanishi *et al.*, (2013) ACS Synthetic Biology 2, 337-347.

5 Los terminadores más particularmente interesantes en la presente invención pueden seleccionarse del grupo que comprende:

- tTPI1 del gen que codifica la Triosa Fosfato Isomerasa (SEC. ID NO.: 85),
- 10 • tMET25 del gen que codifica la O-acetil homoserina-O-acetil serina sulfhidrilasa (SEC. ID NO.: 86),
- tDIT1 (SEC. ID NO.: 87),
- tRPL3 (SEC. ID NO.: 88),
- tRPL3.sm (SEC. ID NO.: 89),
- 15 • tRPL3.sba (SEC. ID NO.: 90),
- tRPL41B (SEC. ID NO.: 91),
- tRPL15A (SEC. ID NO.: 92),
- tRPL15A.sba (SEC. ID NO.: 93),
- tIDP1 (SEC. ID NO.: 94),
- 20 • tTEF1.sba (SEC. ID NO.: 95), y
- tTDH3 (SEC. ID NO.: 100).

En particular, este terminador puede seleccionarse del grupo que consiste de tTPI1, tMET25, tDIT1, tRPL3, tRPL3.sm, tRPL3.sba, tRPL41B, tRPL15A, tRPL15A.sba, tIDP1, tTEF1.sba y

25 tTDH3.

Los terminadores de la invención pueden proceder de cualquier organismo de la clase Saccharomycetes y, en particular, pueden proceder de un organismo seleccionado del grupo formado por *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces*
5 *Bayanus*.

CÉLULAS RECOMBINANTES

Las células recombinantes de la invención se pueden seleccionar del grupo formado por levaduras y bacterias.

Las células recombinantes de la invención, tales como una
10 célula hospedera recombinante de la invención, son preferentemente células de levadura recombinantes.

En general, la levadura puede crecer rápidamente y puede cultivarse a mayor densidad en comparación con las bacterias, y no requiere un ambiente aséptico en el entorno industrial.
15 Además, las células de levadura se pueden separar más fácilmente del medio de cultivo en comparación con las células bacterianas, lo que simplifica enormemente el proceso de extracción y purificación del producto.

Una célula recombinante de la invención, y en particular
20 una célula de levadura recombinante de la invención, es preferentemente una célula de *Saccharomycetales*.

Una célula recombinante de la invención, y en particular una levadura recombinante de la invención, puede pertenecer en particular al género *Saccharomyces*, o al género *Candida*, o al
25 género *Kluyveromyces*, o al género *Ogataea*, o al género

Yarrowia, o al género *Debaryomyces* o al género *Ashbya*.

Una célula recombinante de la invención perteneciente al género *Saccharomyces* se puede seleccionar del grupo formado por *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*,
 5 *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces castelli*, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces arboricolus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces uvarum* y *Saccharomyces delbrueckii*.

10 Una célula recombinante de la invención que pertenece al género *Candida* puede seleccionarse del grupo formado por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitaniae* y *Candida guilliermondii*.

15 Una célula recombinante de la invención que pertenece al género *Kluyveromyces* se puede seleccionar del grupo que consiste de *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces polysporus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Kluyveromyces dobzhanskii* y *Kluyveromyces wickerhamii*.

20 Una célula recombinante de la invención perteneciente al género *Ogataea* puede seleccionarse del grupo formado por *Ogataea polymorpha*, *Ogataea histrionica*, *Ogataea deakii*, *Ogataea kolombanensis*, *Ogataea philodendra*, *Ogataea siamensis*, *Ogataea angusta*, *Ogataea parapolyomorpha*, *Ogataea minuta*,
 25 *Ogataea nonfermentans* y *Ogataea kodamae*.

Una célula recombinante de la invención que pertenece al género *Yarrowia* se puede seleccionar del grupo formado por *Yarrowia lypolytica*, *Yarrowia parophonii*, *Yarrowia galli*, *Yarrowia oslonensis*, *Yarrowia alimentaria*, *Yarrowia hollandica*
 5 y *Yarrowia yakushimensis*.

Una célula recombinante de la invención perteneciente al género *Debaryomyces* se puede seleccionar del grupo formado por *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces carsonii*, *Debaryomyces castellii*, *Debaryomyces marama*, *Debaryomyces occidentalis*,
 10 *Debaryomyces oviformis*, *Debaryomyces nepalensis*, *Debaryomyces coudertii*, *Debaryomyces udenii*, *Debaryomyces psychrosporus* y *Debaryomyces yamadae*.

Una célula recombinante de la invención que pertenece al género *Ashbya* puede seleccionarse del grupo formado por *Ashbya*
 15 *gossypii* y *Ashbya aceri*.

Una célula recombinante de la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de la invención, puede seleccionarse en particular del grupo que consiste de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*,
 20 *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces castelli*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces polysporus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Ogataea polymorpha*, *Yarrowia*
 25 *lypolytica*, *Debaryomyces hansenii* y *Ashbya gossypii*, y es

preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*.

En una modalidad particular, las célula de levadura recombinante de acuerdo con la invención es del género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* o *Eremothecium*, más particularmente es de las especies seleccionadas del grupo que
5 consiste de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces Marxianus*, *Ogataea polymorpha* y *Ashbya gossypii*.

En una modalidad, una célula hospedera recombinante de la invención es una levadura seleccionada que pertenece al orden
10 *Saccharomycetales*, en particular a la familia *Saccharomycetaceae*, y se selecciona en particular del grupo que consiste de *Yarrowia lipolitica*, *Kluyveromyces Marxianus*, *Ogataea polymorpha*, *Ashbya gossypii* y *Saccharomyces cerevisiae*.

15 Más preferentemente, una célula recombinante de la invención puede ser una célula de *Saccharomyces cerevisiae*.

Como se mencionó anteriormente, una célula recombinante según la invención tiene la capacidad de producir ácido hialurónico mediante la inserción de uno o más ácidos nucleicos
20 recombinantes de acuerdo con la presente invención. En determinadas modalidades, una levadura recombinante de acuerdo con la invención tiene la capacidad de producir ácido hialurónico que tiene un tamaño controlado (peso molecular controlado) mediante la inserción de uno o más ácidos nucleicos
25 recombinantes de acuerdo con la presente invención.

Los métodos implementados para insertar una construcción de ADN específica dentro de un gen pertenecen al conocimiento general de un experimentado en la técnica. Un método relacionado se describe con más detalle en los siguientes
5 ejemplos.

Sin embargo, surgieron dificultades técnicas inesperadas porque las consecuencias de la inserción de construcciones de ADN en el genoma de una célula, y en particular en el genoma de una levadura, tal como, por ejemplo, en el genoma de
10 *Saccharomyces cerevisiae*, son impredecibles. En particular, también es impredecible la tasa de supervivencia de las células, y en particular de las levaduras, y su capacidad para crecer y producir el ácido hialurónico deseado.

Para obtener una célula recombinante, y en particular una
15 levadura recombinante, de la invención, los inventores probaron muchas construcciones diferentes para obtener una célula recombinante, y en particular una levadura, viable y eficaz.

CONDICIONES DE CULTIVO

La presente invención se refiere también al uso de una
20 célula recombinante de la invención, para la producción de ácido hialurónico, en particular de ácido hialurónico de peso molecular controlado.

La presente invención se relaciona además con un método para producir ácido hialurónico (HA) de un peso molecular
25 deseado (HAMW) que comprende:

(a) cultivar una célula recombinante de la presente invención en un medio de cultivo durante un tiempo suficiente para producir ácido hialurónico (HA) del peso molecular deseado; y

5 (b) opcionalmente aislar o recuperar el ácido hialurónico (HA) de la célula recombinante y/o del medio de cultivo.

Normalmente, las células de la invención, y en particular las levaduras de la invención, se cultivan a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20°C a aproximadamente 37°C,
10 preferentemente a una temperatura que varía de 27 a 34°C, en un medio de cultivo apropiado.

Los medios de crecimiento adecuados para las células de la invención, y en particular para las levaduras de la invención, son medios comunes preparados comercialmente tales
15 como caldo que incluye base nitrogenada de levadura, sulfato de amonio y dextrosa como fuente de carbono/energía o medio YPD, una mezcla de peptona, extracto de levadura y dextrosa en proporciones óptimas para el cultivo al máximo. También se pueden usar otros medios de crecimiento definidos o sintéticos
20 y el medio apropiado para el crecimiento de la célula particular, y en particular de la levadura, será conocido por un experimentado en la técnica de la microbiología o la ciencia de la fermentación.

Un medio particular que es adecuado en la presente es el
25 medio SY que comprende los siguientes elementos:

KH_2PO_4 : 100 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2.8 mM; K_2SO_4 : 11.5 mM; Na_2SO_4 :
 1.1 mM; NaCl : 2.6 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.7 mM; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 15 μM ; KI :
 6 μM ; FeCl_3 : 30 μM ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 61 μM ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 25 μM ; H_2SO_4 :
 110 μM ; Sal hemicálcica de los ácidos pantoténicos: 42 μM ;
 5 clorhidrato de tiamina: 59 μM ; clorhidrato de piridoxina: 49
 μM ; Mioinositol ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$): 555 μM ; Ácido nicotínico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$):
 29 μM ; D-biotina: 0.82 μM ; Citrato de amonio tribásico: 33 mM;
 y glucosa o sacarosa 2-30%.

Las fuentes de carbono que pueden usarse en el medio de
 10 cultivo incluyen fructosa, manosa, xilosa y arabinosa;
 oligosacáridos tales como lactosa, maltosa, galactosa o
 sacarosa; polisacáridos, tales como almidón o celulosa o
 mezclas de los mismos; y mezclas no purificadas de materias
 primas renovables, tal como el suero de queso, licor de maíz,
 15 melaza de remolacha azucarera y malta de cebada.

Las fuentes de nitrógeno que pueden incluirse en el medio
 de cultivo incluyen peptona, extractos de levadura, extractos
 de carne, extractos de malta, urea, sulfato de amonio, cloruro
 de amonio, nitrato de amonio, fosfato de amonio, citrato de
 20 amonio y combinaciones de los mismos.

El medio de cultivo puede comprender además oligoelementos
 (por ejemplo, sales metálicas), por ejemplo sales de magnesio,
 sales de cobalto y/o sales de manganeso; así como factores de
 crecimiento, tales como aminoácidos, vitaminas, promotores de
 25 crecimiento y similares.

Ejemplos de vitaminas que pueden incluirse son los ácidos pantoténicos hemicálcico, clorhidrato de tiamina; clorhidrato de piridoxina; mioinositol; Ácido nicotínico; D-Biotina, ácido fólico, ácido p-aminobenzoico, riboflavina.

5 Un medio de cultivo de la invención además puede incluir elementos raros, tales como $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KI, FeCl_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ o H_2SO_4 , MgCl_2 , CaCl_2 , NaCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , ZnCl, H_3BO_3 , MnSO_4 , Na_2MoO_4 .

10 El término "medio de cultivo apropiado" está definido anteriormente.

El experimentado en la técnica conoce ejemplos de medios de cultivo conocidos para una célula recombinante de acuerdo con la presente invención, y se presentan en la siguiente publicación de D. Burke *et al.*, *Methods in yeast Genetics - A*
15 *cold spring harbour Laboratory course Manual*. (2000).

Los intervalos de pH adecuados para la fermentación pueden estar entre pH 3.0 y pH 7.5, en donde se prefiere pH 4 a pH 6 como condición inicial.

Como se menciona en otra parte de esta descripción, el
20 valor del pH del medio de cultivo se puede regular durante la etapa de cultivo de un método de la invención para modular la actividad del polipéptido frente a la actividad hialuronidasa, que afectará el peso molecular de las moléculas de ácido hialurónico producidas por la célula recombinante de la
25 invención, y en particular por la levadura recombinante de la

invención.

En particular, el pH del medio de cultivo se puede modificar según el ácido hialurónico que se pretende producir mediante la levadura recombinante. Por ejemplo, el pH del medio
5 de cultivo puede permanecer en un pH de 4, de 5.5 o de 6 durante el tiempo de cultivo.

En una modalidad particular, el pH del medio de cultivo puede cambiar o cambiarse durante el tiempo que dura el cultivo de la célula recombinante de la invención, en particular de la
10 levadura recombinante de la invención. Como se mencionó anteriormente, *Saccharomyces cerevisiae* acidifica el medio en el que se cultiva y así reduce el pH de su medio de cultivo. Por ejemplo, el pH del medio de cultivo puede comenzar en 6, puede reducirse a 4 y luego volver a subir a 6. En otro ejemplo,
15 el pH del medio de cultivo puede comenzar en 6, permanecer o mantenerse en 6 y luego puede reducirse a 4.

En una modalidad particular, el pH del medio de cultivo se puede modular durante la etapa de cultivo (a) de un método de la invención, de modo que al final de la etapa de cultivo
20 de un método de la invención, el pH del medio de cultivo sea el mismo que el pH al comienzo de tal etapa de cultivo (a).

En otra modalidad, el pH del medio de cultivo puede permanecer igual durante el tiempo que dura el cultivo de la célula recombinante de la invención, y en particular la célula
25 de levadura recombinante de la invención.

La duración del cultivo de una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular de la levadura recombinante de la invención, puede variar dependiendo del peso molecular del ácido hialurónico de interés. Cuanto mayor sea el período de tiempo, menor será el peso molecular del ácido hialurónico en un medio de cultivo dado de una célula recombinante de la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de la invención.

La duración del tiempo de cultivo de una célula recombinante de la invención, y en particular de una célula de levadura recombinante en la presente invención, puede ser un período de aproximadamente 35 horas a aproximadamente 50 horas, preferentemente de aproximadamente 40 horas a aproximadamente 50 horas y es en particular de aproximadamente 48 horas.

Las fermentaciones pueden realizarse en condiciones aeróbicas o micro-aeróbicas.

La cantidad de producto de ácido hialurónico en el medio de fermentación se puede determinar usando varios métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) o cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés).

El presente proceso puede emplear un método de fermentación por lotes. Una fermentación por lotes clásica es un sistema cerrado en donde la composición del medio se establece al comienzo de la fermentación y no está sujeta a

alteraciones artificiales durante la fermentación. Así, al comienzo de la fermentación, se inocula el medio con el organismo u organismos deseados y se permite que se produzca la fermentación sin agregar nada al sistema. Sin embargo, normalmente un método o sistema de fermentación “por lotes” es por lotes con respecto a la adición de una fuente de carbono y a menudo se intenta controlar factores, tales como la temperatura, el pH y la concentración de oxígeno. En los sistemas por lotes, las composiciones de metabolitos y biomasa del sistema cambian constantemente hasta el momento en que se detiene la fermentación. Dentro de los cultivos por lotes, las células progresan a través de una fase de retraso estática hasta una fase de registro de alto crecimiento y finalmente a una fase estacionaria en donde la tasa de crecimiento disminuye o se detiene. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria eventualmente morirán. Las células en fase logarítmica generalmente son responsables de la mayor parte de la producción del producto final o intermedio.

En la presente invención también se puede usar un sistema Fed-Batch. Un sistema Fed-Batch es similar a un sistema por lotes típico, con la excepción de que el sustrato de fuente de carbono se adiciona en incrementos a medida que avanza la fermentación. Los sistemas Fed-Batch son útiles cuando la represión de catabolitos (por ejemplo, represión de glucosa) puede inhibir el metabolismo de las células y cuando es

deseable tener cantidades limitadas de sustrato en el medio. La medición de la concentración real de sustrato en los sistemas Fed-Batch es difícil y, por lo tanto, se estima en función de los cambios de factores mensurables como el pH, el
5 oxígeno disuelto y la presión parcial de los gases residuales, tal como CO₂.

Los métodos de cultivo por lotes y Fed-Batch son comunes y bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar ejemplos en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*,
10 Crueger, Crueger and Brock, segunda edición (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA., o Deshpande, Mukund V., *Appl. Bioquímica. Biotechnol.*, 36, 227, (1992). Aunque la presente invención se realiza en modo por lotes, se contempla que el método sería adaptable a la fermentación continua.

15 La fermentación continua es un sistema abierto en el que se agrega continuamente un medio de fermentación definido a un biorreactor y se retira simultáneamente una cantidad igual de medio acondicionado para su procesamiento. La fermentación continua generalmente mantiene los cultivos a una densidad alta
20 constante en donde las células están principalmente en fase logarítmica de crecimiento.

La fermentación continua permite la modulación de un factor o cualquier número de factores que afectan el crecimiento celular o la concentración del producto final. Por
25 ejemplo, un método mantendrá un nutriente limitante, como la

fuentes de carbono o el nivel de nitrógeno, a una tasa fija y permitirá que todos los demás parámetros varíen. En otros sistemas, una serie de factores que afectan el crecimiento pueden alterarse continuamente mientras la concentración celular, medida por la turbidez del medio, se mantiene constante. Los sistemas continuos se esfuerzan por mantener condiciones de crecimiento estables y, por lo tanto, la pérdida de células debida al medio que se extrae debe equilibrarse con la tasa de crecimiento celular en la fermentación. Los métodos para modular nutrientes y factores de crecimiento para procesos de fermentación continua así como técnicas para maximizar la velocidad de formación de productos son bien conocidos en la técnica de la microbiología industrial.

Se contempla que la presente invención se puede poner en práctica usando procesos por lotes, de alimentación por lotes o continuos y que cualquier modo conocido de fermentación sería adecuado. Además, se contempla que las células puedan inmovilizarse sobre un sustrato como catalizadores de células completas y someterse a condiciones de fermentación para su producción.

Para seguir mejorando la producción de ácido hialurónico, una modalidad particular puede consistir en cultivar las células recombinantes de la invención, en particular las células de levadura recombinantes de la invención, en un medio de cultivo apropiado, tal como el mencionado anteriormente, en

el que el medio de cultivo comprende una cantidad óptima de fuente de carbono, especialmente glucosa o sacarosa.

En modalidades preferidas, la fuente de carbono comprendida en el medio de cultivo óptimo consiste de glucosa y/o sacarosa. En modalidades preferidas, el medio de cultivo óptimo comprende 1% p/p o más glucosa y/o sacarosa, en particular comprende 5% p/p o más glucosa y/o sacarosa, en particular comprende 10% p/p o más glucosa y/o sacarosa, en particular comprende 15% p/p o más de glucosa y/o sacarosa. En modalidades preferidas, el medio de cultivo óptimo comprende como máximo 40% p/p de glucosa, que incluye como máximo 35% p/p de glucosa.

En una modalidad preferida, el método de la invención se lleva a cabo a escala industrial.

Más particularmente, el medio de cultivo del método de acuerdo con la invención puede ser por lo menos aproximadamente 100L, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1000L a aproximadamente 3000L, incluso más preferentemente aproximadamente 10,000 L, incluso más preferentemente 100,000 L, o incluso aproximadamente 250,000L.

La invención se relaciona además con un método para producir ácido hialurónico como se describió anteriormente, y que comprende las etapas de:

(a) cultivar una célula recombinante de la invención en un medio de cultivo; y

(b) recuperar el ácido hialurónico del medio de cultivo, en donde el ácido hialurónico recuperado en la etapa (b) tiene un peso molecular controlado mediante la selección de:

- la naturaleza y el origen de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa de la célula recombinante de la invención, y en particular de la levadura recombinante de la invención,

- la naturaleza y el origen del promotor que controla la expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa de la célula recombinante de la invención, y en particular de la levadura recombinante de la invención,

- la presencia o ausencia de una señal de anclaje asociada a uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa de la célula recombinante de la invención, y en particular de la levadura recombinante de la invención,

- el pH del medio de cultivo durante la etapa de cultivo de la célula recombinante de la invención, y en particular de la levadura recombinante de la invención, y/o

- la duración del cultivo de la célula recombinante de la invención, y en particular de la levadura recombinante de la invención.

El peso molecular del ácido hialurónico puede ser un peso molecular particular o más preferentemente un intervalo

específico de pesos moleculares tal como, por ejemplo, menos de 50 kDa, en el intervalo de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 50 kDa, mayor o igual a 50 kDa, en el intervalo de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 150 kDa, en el
5 intervalo de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 250 kDa, mayor o igual a 100 kDa, en el intervalo de aproximadamente 100 kDa a aproximadamente 1,500 kDa, en el intervalo de aproximadamente 150 kDa hasta aproximadamente 1,500 kDa, superior a 1,000 kDa o superior a 1,500 kDa.

10 La presente invención también se relaciona con el uso de una célula recombinante de acuerdo con la invención, y en particular una célula de levadura recombinante de la invención, para la producción de ácido hialurónico (HA) que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 20 kDa a
15 aproximadamente 50 kDa o de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 1000 kDa.

Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa de una célula recombinante de la invención se pueden seleccionar, por
20 ejemplo, entre aquellos que se originan o derivan de por lo menos uno de *Cupiennius salei* (Csa), *Loxosceles intermedia* (Li), *Hirudo nipponia* (Hn), *Bothrops atrox* (Ba), *Tityus serrulatus* (Ts) o *Vespa magnifica* (Vm), en particular de por lo menos uno de *Cupiennius salei* (Csa), *Loxosceles intermedia*
25 (Li), *Hirudo nipponia* (Hn), *Bothrops atrox* (Ba) o *Tityus*

serrulatus (Ts), más particularmente de aquellas de secuencias expuestas como las secuencias SEC. ID NO.: 19 (Ba), SEC. ID NO.: 25 (Li), SEC. ID NO.: 21 (Csa), SEC. ID NO.: 27 (Ts) o SEC. ID NO.: 23 (Hn) (en presencia de una señal de secreción y en ausencia de una señal de anclaje).

Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa de una célula recombinante de la invención se pueden seleccionar, por ejemplo, entre aquellos que se originan o derivan de por lo menos uno de *Cupiennius salei* (Csa), *Loxosceles intermedia* (Li), *Hirudo nipponia* (Hn), *Bothrops atrox* (Ba), *Tityus serrulatus* (Ts) o *Vespa magnifica* (Vm), en particular de *Cupiennius salei* (Csa), *Loxosceles intermedia* (Li), *Hirudo nipponia* (Hn), *Bothrops atrox* (Ba) o *Tityus serrulatus* (Ts), en particular de aquellas de secuencias expuestas como las secuencias SEC. ID NO.: 22 (Csa), SEC. ID NO.: 26 (Li), SEC. ID NO.: 24 (Hn), SEC. ID NO.: 20 (Ba) o SEC. ID NO.: 28 (Ts) (en presencia tanto de una señal de secreción como de una señal de anclaje).

Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa de una célula recombinante de la invención se pueden colocar, por ejemplo, bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTEF1, pCCW12, pCCW12.sba, pCCW12.Sar, pPDC1, pTEF3, pTDH3, pNUP57 y pCCW10.ago.

En particular, los promotores de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa de una célula recombinante de la invención, y en particular de una levadura recombinante de la invención, pueden originarse o derivarse de *Saccharomyces* 5 *Bayanus*, *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces arboricola* u otros saccharomycetales, o *Abishia gossypii*.

La señal de secreción de la presente invención puede 10 tener, por ejemplo:

- la secuencia de ácido nucleico expuesta como la SEC. ID NO.: 43; y/o

- la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEC. ID NO.: 44.

15 La señal de anclaje de la presente invención puede tener por ejemplo:

- la secuencia de ácido nucleico expuesta como la SEC. ID NO.: 45; y/o

- la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC. ID NO.: 20 46.

La señal de secreción puede fusionarse con el polipéptido que tiene actividad hialuronidasa creando un ácido nucleico quimérico comenzando por una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de señal seguido de un ácido nucleico 25 recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad

hialuronidasa como se definió previamente.

La señal de secreción y la señal de anclaje pueden fusionarse con el polipéptido que tiene actividad hialuronidasa creando un ácido nucleico quimérico comenzando por una
5 secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de señal seguida de un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa como se definió previamente, seguido de una secuencia de ácido nucleico que codifica la señal de anclaje.

10 Estas secuencias quiméricas de ácidos nucleicos pueden obtenerse mediante técnicas conocidas por el experimentado en la técnica, tales como la síntesis química de ácidos nucleicos o cualquier técnica de recombinación, como la clonación o la PCR.

15 La invención se relaciona además con un método como se describió anteriormente, para producir ácido hialurónico que tiene un peso molecular menor o igual a aproximadamente 50 kDa, y en particular menor que 50 kDa y mayor o igual a aproximadamente 20 kDa, en donde:

20 (a) el pH del medio es superior a 4 y, en particular, está en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 7;

(b) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa integrado en el genoma de la célula recombinante de la invención se origina
25 o se deriva:

(i) de *Tityus serrulatus*, posee una señal de secreción pero carece de una señal de anclaje, y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTDH3, pEN02, pTEF3, pTEF1, pPDC1, pCCW12, pCCW12.Sm, pCCW12.sk, pCCW12.sba, pCCW12.sar, pTDH3-1.Sba y pTDH3.Sar;

(ii) de *Cupiennius salei*, posee una señal de secreción pero carece de una señal de anclaje y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pNUP57 y pCCW10.ago;

(iii) de *Cupiennius salei*, posee una señal de secreción y una señal de anclaje, y está bajo el control del promotor pCWP2;

(iv) de *Loxosceles intermedia* posee una señal de secreción pero carece de una señal de anclaje, y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTDH3, pEN02, pTEF3, pTEF1, pPDC1, pCCW12, pCCW12.Sm, pCCW12.sk, pCCW12.sba, pCCW12.sar, pTDH3-1.Sba y pTDH3.Sar; o

(v) de *Hirudo nipponia*, posee una señal de secreción pero carece de una señal de anclaje y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pNUP57 y pCCW10.ago; o

(vi) de *Hirudo nipponia*, posee tanto una señal de secreción como una señal de anclaje, y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTDH3, pEN02, pTEF3, pTEF1, pPDC1, pCCW12, pCCW12.Sm, pCCW12.sk,

pCCW12.sba, pCCW12.sar, pTDH3-1.Sba y pTDH3.Sar; y

(c) la etapa de recuperar el ácido hialurónico del medio de cultivo se realiza aproximadamente 48 horas después del comienzo del cultivo de la célula recombinante de la invención, en particular la célula de levadura recombinante de la invención;

siendo la célula recombinante en particular una célula de levadura recombinante, y más particularmente una célula de *Saccharomyces cerevisiae*.

La invención se relaciona además con un método como se describió anteriormente, para producir ácido hialurónico que tiene un peso molecular mayor o igual a aproximadamente 50 kDa y menor o igual a aproximadamente 1000 kDa, en donde:

(a) el pH del medio está entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6 y opcionalmente varía de aproximadamente 6 a aproximadamente 4 durante la etapa de cultivo de la célula recombinante, en particular la célula de levadura recombinante, de la invención;

(b) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa integrada en el genoma de la célula recombinante de la invención se origina o deriva:

(i) de *Tityus serrulatus*, posee una señal de secreción pero carece de una señal de anclaje, y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTDH3,

pEN02, pTEF3, pTEF1, pPDC1, pCCW12, pCCW12.Sm, pCCW12.sk, pCCW12.sba, pCCW12.sar, pTDH3-1.Sba y pTDH3.Sar;

(ii) de *Tityus serrulatus*, posee tanto una señal de secreción como una señal de anclaje, y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTDH3, pEN02, pTEF3, pTEF1, pPDC1, pCCW12, pCCW12.Sm, pCCW12.sk, pCCW12.sba, pCCW12.sar, pTDH3-1.Sba y pTDH3.Sar;

(iii) de *Loxosceles intermedia*, posee tanto una señal de secreción como una señal de anclaje, y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pNUP57 y pCCW10.ago;

(iv) de *Loxosceles intermedia*, posee una señal de secreción pero carece de una señal de anclaje, y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTDH3, pEN02, pTEF3, pTEF1, pPDC1, pCCW12, pCCW12.Sm, pCCW12.sk, pCCW12.sba, pCCW12.sar, pTDH3-1.Sba y pTDH3.Sar,

(v) de *Cupiennius salei*, posee tanto una señal de secreción como una señal de anclaje, y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pNUP57 y pCCW10.ago,

(vi) de *Cupiennius salei*, posee una señal de secreción pero carece de una señal de anclaje, y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pNUP57 y pCCW10.ago, o

(vii) de *Hirudo nipponia*, posee tanto una señal de

secreción como una señal de anclaje, y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTDH3, pEN02, pTEF3, pTEF1, pPDC1, pCCW12, pCCW12.Sm, pCCW12.sk, pCCW12.sba, pCCW12.sar, pTDH3-1.Sba y pTDH3.Sar; y

5 (c) la etapa de recuperar el ácido hialurónico del medio de cultivo se realiza aproximadamente 48 horas después del comienzo del cultivo de la célula recombinante de la invención, en particular la célula de levadura recombinante de la invención;

10 siendo la célula recombinante en particular una célula de levadura recombinante, y más particularmente una célula de *Saccharomyces cerevisiae*.

La invención se relaciona además con un método como se describió anteriormente, para producir ácido hialurónico que
15 tiene un peso molecular mayor que aproximadamente 1000 kDa, y en particular que tiene un peso molecular de aproximadamente 1000 kDa a aproximadamente 1.5 millones de Da, en donde:

 (a) el pH del medio es de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 y opcionalmente varía de aproximadamente 6 a
20 aproximadamente 4 durante la etapa de cultivo de la célula recombinante, en particular la levadura recombinante, de la invención;

 (b) uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido que tiene actividad de hialuronidasa integrada
25 en el genoma de la célula recombinante de la invención se

origina o se deriva:

(i) de *Tityus serrulatus*, posee una señal de secreción pero carece de una señal de anclaje y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pNUP57 y pCCW10.ago;

(ii) de *Loxosceles intermedia*, posee una señal de secreción, pero carece de una señal de anclaje y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pNUP57 y pCCW10.ago;

(iii) de *Bothrops atrox*, posee una señal de secreción pero carece de una señal de anclaje, y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTDH3, pEN02, pTEF3, pTEF1, pPDC1, pCCW12, pCCW12.Sm, pCCW12.sk, pCCW12.sba, pCCW12.sar, pTDH3-1.Sba y pTDH3.Sar; o

(iv) de *Bothrops atrox*, posee tanto una señal de secreción como una señal de anclaje, y está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste de pTDH3, pEN02, pTEF3, pTEF1, pPDC1, pCCW12, pCCW12.Sm, pCCW12.sk, pCCW12.sba, pCCW12.sar, pTDH3-1.Sba y pTDH3.Sar; y

(c) la etapa de recuperar el ácido hialurónico del medio de cultivo se realiza aproximadamente 48 horas después del comienzo del cultivo de la célula recombinante de la invención, en particular la célula de levadura recombinante de la invención;

siendo la célula recombinante en particular una levadura

recombinante, y más particularmente una célula de *Saccharomyces cerevisiae*.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con el ácido hialurónico (HA) obtenido u obtenible a partir de una
5 célula recombinante de la invención o de un método de acuerdo con la invención.

Un aspecto adicional de la invención es un medio de cultivo que comprende el ácido hialurónico de la invención.

La invención se relaciona además con una composición que
10 comprende el ácido hialurónico de acuerdo con la invención.

La invención también se relaciona con un producto industrial o un producto de consumo o un consumible que comprende (i) el ácido hialurónico de la invención, (ii) el medio de cultivo que comprende ácido hialurónico de la
15 invención o (iii) la composición que comprende ácido hialurónico de la invención.

En particular, tal producto industrial o producto de consumo o consumible de acuerdo con la invención puede ser un producto cosmético, un producto de sabor, un producto de
20 fragancia, un producto alimenticio, un alimento, una bebida, un texturante, una composición farmacéutica, un suplemento dietético, un nutracéutico, un producto de limpieza y/o una composición dental y/o de higiene bucal.

PURIFICACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO

25 De acuerdo con un aspecto específico de la invención, la

producción fermentativa de ácido hialurónico comprende preferentemente una etapa de aislamiento del ácido hialurónico producido a partir del medio de cultivo. Recuperar el ácido hialurónico del medio de cultivo es una tarea rutinaria para un experimentado en la técnica. Puede lograrse mediante una serie de técnicas bien conocidas en la técnica que incluyen, entre otras, pervaporación, precipitación selectiva, filtración, centrifugación, secado por aspersión, liofilización o extracción líquida. El experimentado en la técnica sabe adaptar los parámetros de cada técnica en función de las características del material a separar.

Se prefiere la levadura como modelo de célula en la presente invención porque el ácido hialurónico sintetizado se exporta por completo fuera de las células, simplificando así el proceso de purificación.

El arrastre de gas se logra con un gas de arrastre elegido de helio, argón, dióxido de carbono, hidrógeno, nitrógeno o una mezcla de los mismos.

La extracción líquida se logra con un solvente orgánico como fase hidrofóbica, tal como pentano, hexano, heptano o dodecano. También se pueden usar solventes de renovación.

Los experimentados en la técnica reconocerán que, debido a la naturaleza degenerada del código genético, se puede usar una variedad de moléculas de ADN que difieren en sus secuencias de nucleótidos para codificar una enzima determinada de la

descripción. Se hace referencia en el presente documento a la secuencia de ADN nativa que codifica las enzimas biosintéticas descritas anteriormente simplemente para ilustrar una modalidad de la descripción, y la descripción incluye moléculas de ADN de cualquier secuencia que codifique las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos y proteínas de las enzimas usadas en los métodos de la descripción. De manera similar, un polipéptido normalmente puede tolerar una o más sustituciones, eliminaciones e inserciones de aminoácidos en su secuencia de aminoácidos sin pérdida o pérdida significativa de una actividad deseada. La descripción incluye tales polipéptidos con secuencias de aminoácidos diferentes a las proteínas específicas descritas en la presente, siempre que los polipéptidos modificados o variantes tengan la actividad enzimática anabólica o catabólica del polipéptido de referencia. Además, las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ADN que se muestran en la presente ilustran simplemente modalidades de la descripción.

En la presente, se describen genes y proteínas específicos útiles en los métodos, composiciones y organismos de la descripción; sin embargo, se reconocerá que no es necesaria una identidad absoluta con tales genes. Por ejemplo, cambios en una partícula. Se puede realizar un gen o polinucleótido particular que comprende una secuencia que codifica un polipéptido o enzima y seleccionar su actividad. Normalmente,

estos cambios comprenden mutaciones conservadoras y mutaciones silenciosas. Estos polinucleótidos y polipéptidos modificados o mutados pueden seleccionarse para determinar la expresión de una enzima funcional usando métodos conocidos en la técnica.

5 Debido a la degeneración inherente del código genético, también se pueden usar otros polinucleótidos que codifican polipéptidos sustancialmente iguales o funcionalmente equivalentes para clonar y expresar los polinucleótidos que codifican tales enzimas.

10 Las técnicas conocidas por los experimentados en la técnica pueden ser adecuadas para identificar genes homólogos y enzimas homólogas adicionales. En general, los genes análogos y/o las enzimas análogas pueden identificarse mediante análisis funcional y tendrán similitudes funcionales.

15 Las técnicas conocidas por los experimentados en la técnica pueden ser adecuadas para identificar genes análogos y enzimas análogas o cualquier gen, proteína o enzima de la vía biosintética; las técnicas pueden incluir, entre otras, la clonación de un gen mediante PCR usando cebadores basados en
20 una secuencia publicada de un gen/enzima de interés, o mediante PCR degenerada usando cebadores degenerados diseñados para amplificar una región conservada entre un gen de interés. Además, un experimentado en la técnica puede usar técnicas para identificar genes, proteínas o enzimas homólogos o análogos
25 con homología o similitud funcional. Las técnicas incluyen

examinar una célula o un cultivo celular para determinar la actividad catalítica de una enzima a través de pruebas enzimáticas *in vitro* para tal actividad (por ejemplo, como se describe en la presente o en Kiritani, K., *Branched-Chain Amino Acids Methods Enzymology*, 1970), luego aislar la enzima con tal actividad mediante purificación, determinación de la secuencia proteica de la enzima mediante técnicas, tales como degradación de Edman, diseño de cebadores de PCR para la secuencia de ácido nucleico probable, amplificación de tal secuencia de ADN mediante PCR y clonación de tal secuencia de ácido nucleico. Para identificar genes homólogos o similares y/o enzimas homólogas o similares, genes análogos y/o enzimas o proteínas análogas, las técnicas también incluyen la comparación de datos relacionados con un gen o enzima candidato con bases de datos, tales como BRENDA, KEGG o MetaCYC. El gen o enzima candidato puede identificarse dentro de las bases de datos mencionadas anteriormente de acuerdo con las enseñanzas de la presente.

DERIVADOS

El término "ácido hialurónico (HA)", como se usa en la presente, también pretende cubrir derivados del ácido hialurónico, tales como, entre otros, ácido hialurónico acetilado o sulfatado útil para aplicaciones en un producto cosmético, un producto de sabor, un producto de fragancia, un producto alimenticio, un alimento, una bebida, un texturante,

una composición farmacéutica, un suplemento dietético, un nutraceutico, un producto de limpieza y/o una composición de higiene dental y/o bucal o combinaciones de los mismos.

Puede prepararse ácido hialurónico como una composición.

5 FORMULACIONES Y PRODUCTOS

Una composición de la invención puede incorporarse a una formulación/producto, tal como una formulación/producto nutraceutico, farmacéutico, veterinario, enológico o cosmético.

10 Por lo tanto, la presente invención proporciona una formulación que comprende una composición de la invención. Por ejemplo, la presente invención puede proporcionar una formulación cosmética que comprenda la composición de la invención.

15 La presente invención también proporciona un producto que comprende una composición de la invención. Por ejemplo, la presente invención puede proporcionar un producto cosmético que comprenda la composición de la invención.

Se entiende por "producto cosmético" cualquier sustancia
20 o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes externas del cuerpo humano (epidermis, sistema capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las membranas mucosas de la cavidad bucal, con el fin exclusiva o principalmente de limpiarla, perfumarla, cambiar su
25 apariencia, protegerla, mantenerla en buen estado, corregir

los olores corporales y/o combinaciones de los mismos.

Se entiende por "sustancia" un elemento químico y sus compuestos en estado natural u obtenidos mediante cualquier proceso de fabricación, incluido cualquier aditivo necesario
5 para conservar su estabilidad y cualquier impureza derivada del proceso usado, pero excluyendo cualquier solvente que pueda separarse sin afectar la estabilidad de la sustancia o cambiar su composición.

Se entiende por "mezcla" una mezcla o solución compuesta
10 de dos o más sustancias.

La presente invención también proporciona el uso de una composición de la invención en una formulación/producto nutracéutico, farmacéutico, veterinario, enológico o cosmético.

15 Tales formulaciones o productos se denominarán en lo sucesivo "formulaciones o productos de la invención".

La formulación/producto nutracéutico, farmacéutico, veterinario, enológico o cosmético puede opcionalmente además comprender ingredientes farmacéuticos/veterinarios/cosméticos
20 (que incluyen activos cosméticos), tales como excipientes, vehículos y mezclas de los mismos, según corresponda.

"Cosmético" o "Ingredientes activos cosméticos" significa todos y cada uno de los compuestos, ingredientes, intermediarios, moléculas, sustancias, materias primas o
25 productos naturales, naturales, idénticos a la naturaleza,

sintéticos, producidos sintéticamente, producidos biosintéticamente, sostenibles, renovables y/o biodegradables, individualmente o como parte de una mezcla de compuestos, ingredientes, intermediarios, moléculas, sustancias, materias
5 primas o productos, mezclas, composiciones, formulaciones (incluidos, entre otros, humectantes para la piel, cremas, bálsamos, sueros, aceites, maquillaje para ojos y rostro, productos para lavar el cabello, productos para el cabello defrizantes, colorantes para el cabello (incluidos, entre
10 otros, colorantes naturales para el cabello) y/o combinaciones de los mismos), productos terminados y tecnologías relacionadas que incluyen, entre otros, componentes, incorporados, por ejemplo, en una formulación cosmética (tal como, entre otros, limitado a colorantes naturales, conservadores, emulsionantes,
15 antioxidantes y similares que, por ejemplo, no tienen actividad sobre la piel, el cabello, el cuero cabelludo y similares, pero desempeñan un papel en la formulación del producto terminado), sistemas de administración, auxiliares de marketing (tales como, por ejemplo, uniesferas coloreadas aplicadas a
20 formulaciones translúcidas) y métodos para hacer que cualquier cosa relacionada con ellas sea útil/usada/destinada a:

- aplicación frotando, vertiendo, rociando, rociando o de otro modo directamente en o sobre un cuerpo humano o animal y/o poniéndolo en contacto con las diversas partes externas
25 y/o superficiales de un cuerpo humano o animal (incluidos,

entre otros, la piel, el cabello, el vello corporal, el sistema capilar, el cuero cabelludo, las uñas, los labios, los genitales externos, los dientes, la mucosa oral y/o nasal y similares); y/o aplicación indirecta sobre o a un cuerpo humano o animal, tal como por ejemplo, aplicación como parte de un textil o aplicación a un textil como parte de un dispositivo de administración (tal como una cápsula) o un sistema de administración (tal como mezclas o formulaciones) aplicadas a un textil; y/o

10 - limpiar, cuidar, refrescar, embellecer, acondicionar, tratar, calmar, texturizar, promover el atractivo, proteger, mantener, mejorar, realzar, alterar y/o cambiar una parte externa y/o superficie de un cuerpo humano o animal (tales como, pero no se limita al cuero cabelludo) o la apariencia

15 estética de un cuerpo humano o animal; y/o con vistas principalmente a limpiar o perfumar, o proteger o mantener en buen estado o combatir el olor corporal o cambiar la apariencia o corregir o reparar un estado de desequilibrio de la piel, mucosa oral, cuero cabelludo o cabello proporcionando un efecto

20 calmante, cicatrización, reparación o revitalización, hidratación de la piel o con la finalidad de aliviar, lubricar, humedecer, tonificar, cicatrizar, esterilizar, aliviar, corregir y/o remediar estados de sequedad, irritación, lesión o fatiga, y/o con un punto de vista de corregir trastornos de

25 pigmentación o proporcionar una prevención y/o tratamiento no

farmacéutico de la caspa, el acné, la irritación y/o la inflamación y similares y/o reequilibrar la flora bacteriana (tal como, por ejemplo, el microbioma) en la superficie de la piel (tal como, por ejemplo, promoviendo el nivel de flora bacteriana beneficiosa en la superficie de la piel) y/o con el fin de mantener un cuerpo humano o animal en buenas condiciones con fines de salud y/o bienestar y/o para mejorar la apariencia de un cuerpo humano o animal, por ejemplo, mejorando la apariencia de un producto aplicado a un ser humano o un cuerpo; y/o

- proporcionar una función y/o beneficio cosmético y/o dermatológico con un beneficio de actividad biológica (pero sin afectar la estructura o función del cuerpo. Para evitar dudas, un Cosmético o Ingrediente Activo Cosmético o cualquier parte del mismo también puede calificar como un Producto Funcional Ingrediente y/o Nutracéutico.

“Ingrediente funcional” significa un ingrediente alimentario o parte de un alimento que proporciona beneficios medicinales o para la salud, incluyendo cualquiera de los siguientes: un carotenoide, fibra dietética, ácido graso, saponina, antioxidante, flavonoide, isotiocianato, fenol, polifenol (tal como resveratrol), esteroles o estanoles vegetales (fitosteroles y fitostanoles), un poliol, un prebiótico, un fitoestrógeno, proteína de soja, sulfuros/tiol, una vitamina, glucosamina, conservadores, agentes de hidratación,

ingredientes gelificantes comestibles, mezclas de geles comestibles y composiciones de geles, alcoholes saturados alifáticos primarios de cadena larga, agentes colorantes, agentes texturizantes, emulsionantes y combinaciones de los mismos.

“Nutracéutico” significa todos y cada uno de los compuestos, mezclas de compuestos, ingredientes funcionales, moléculas, composiciones, materias primas e intermediarios (incluidos componentes y dispositivos de administración) naturales, de origen natural, sostenibles, producidos sintética y biosintéticamente (que incluyen componentes y dispositivos de administración (tal como cápsulas) relacionadas con los mismos, sistemas de administración de los mismos (tales como mezclas o formulaciones) y métodos para preparar lo anterior) que están asociados con beneficios para la salud y/o cosméticos, así como con el mejoramiento o el mantenimiento de la apariencia del cuerpo humano. Para evitar dudas, los nutracéuticos incluyen compuestos que pueden usarse como complementos de los alimentos o bebidas, ya sea una formulación sólida, cápsula, comprimido, formulación líquida, solución o suspensión.

Alternativamente, la formulación/producto nutracéutico, farmacéutico, veterinario, enológico o cosmético puede consistir o consistir esencialmente de la composición de la invención.

La formulación/producto cosmético puede ser una formulación antienvjecimiento.

Como se usa en la presente, las referencias a excipientes farmacéutica, veterinaria o cosméticamente aceptables pueden
5 referirse a adyuvantes, diluyentes y/o vehículos farmacéuticamente, veterinarios o cosméticamente aceptables como conocen los experimentados en la técnica.

Por "farmacéutica/veterinaria/cosméticamente aceptable" se pretende decir que los componentes adicionales de la
10 composición son generalmente seguros, no tóxicos y no son biológicamente ni de ningún otro modo indeseables. Por ejemplo, los componentes adicionales pueden ser generalmente estériles y libres de pirógenos. Estos componentes deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con la composición de la
15 invención y no perjudiciales para sus destinatarios. Por lo tanto, "excipientes farmacéuticamente aceptables" incluye cualquier compuesto(s) usado para formar parte de la formulación que esté destinado a actuar simplemente como un excipiente, es decir, que no esté destinado a tener actividad
20 biológica en sí mismo.

La formulación/producto nutracéutico, farmacéutico, veterinario, enológico o cosmético puede presentarse en forma líquida o sólida.

Las formulaciones/productos de dosificación líquida para
25 administración oral incluyen soluciones, emulsiones,

suspensiones acuosas u aceitosas, jarabes y elixires.

Las formulaciones y productos (por ejemplo, formulaciones/productos farmacéuticos, veterinarios o cosméticos) descritos en la presente, como los destinados a la
5 administración oral, se pueden preparar según métodos conocidos por los experimentados en la técnica, tal como mezclando los componentes de la formulación/producto entre sí.

La formulación o producto (por ejemplo, formulación/producto farmacéutico, veterinario o cosmético)
10 puede contener uno o más ingredientes adicionales, tales como ingredientes y excipientes farmacéuticos, tales como agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservadores.

La formulación o producto (por ejemplo, formulación/producto farmacéutico, veterinario o cosmético)
15 también puede contener uno o más ingredientes activos adicionales, tales como ingredientes activos cosméticos o farmacéuticos, tales como ácido hialurónico, extracto de centella asiática, péptidos, tales como Matrixyl® y Argireline®
20 y mezclas de los mismos.

La formulación o producto de la invención puede contener el o los ingredientes activos mezclados con excipientes (o ingredientes) no tóxicos y farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes (o ingredientes) pueden ser, por ejemplo:
25 diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato

de sodio, lactosa, fosfato cálcico o fosfato sódico; agentes granulantes y desintegrantes, por ejemplo, almidón de maíz, maltodextrina o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o goma arábica; o agentes
5 lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico, talco y mezclas de los mismos.

Las formulaciones o productos líquidos (por ejemplo, formulaciones/productos farmacéuticos, veterinarios o cosméticos) pueden estar contenidos dentro de una cápsula, que
10 puede estar recubierta o sin recubrir como se definió anteriormente.

Los vehículos farmacéuticos o veterinarios adecuados incluyen diluyentes o cargas sólidas inertes, soluciones acuosas estériles y diversos solventes orgánicos. Ejemplos de
15 vehículos líquidos son jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, fosfolípidos, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, polioxietileno y agua.

Además, el vehículo o diluyente puede incluir cualquier material de liberación prolongada conocido en la técnica, tal
20 como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera.

Los vehículos farmacéuticos adecuados incluyen soluciones acuosas estériles inertes y diversos solventes orgánicos. Ejemplos de vehículos líquidos son jarabe, aceites vegetales,
25 fosfolípidos, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos,

polioxietileno y agua. Además, el vehículo o diluyente puede incluir cualquier material de liberación prolongada conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera.

5 Los vehículos cosméticos adecuados son típicamente aquellos que son adecuados para la administración tópica en la superficie exterior del cuerpo humano, tal como la piel y/o el cabello y/o el cuero cabelludo.

Normalmente, estos vehículos son dermatológicamente
10 aceptables.

La frase "vehículo dermatológicamente aceptable" significa que el vehículo es adecuado para aplicación tópica al tejido queratinoso, tiene buenas propiedades estéticas, es compatible con los activos de la composición y no causará
15 preocupaciones irrazonables de seguridad o toxicidad.

El vehículo puede adoptar una amplia variedad de formas. En algunos casos, la solubilidad o dispersabilidad de los componentes (por ejemplo, extractos, activos de protección solar, componentes adicionales) pueden dictar la forma y el
20 carácter del vehículo. Los ejemplos no limitantes incluyen soluciones simples (por ejemplo, acuosas o anhidras), dispersiones, emulsiones y formas sólidas (por ejemplo, geles, barras, sólidos fluidos o materiales amorfos).

Los vehículos dermatológicamente aceptables pueden estar
25 en forma de una emulsión. Una emulsión puede clasificarse

generalmente como que tiene una fase acuosa continua (por ejemplo, aceite en agua y agua en aceite en agua) o una fase aceitosa continua (por ejemplo, agua en aceite o aceite en agua). La fase aceitosa de la presente invención puede comprender aceites de silicona, aceites que no son de silicona tales como aceites de hidrocarburos, ésteres, éteres y similares, y mezclas de los mismos. La fase acuosa normalmente comprende agua e ingredientes solubles en agua (por ejemplo, agentes humectantes, agentes acondicionadores, antimicrobianos, humectantes y/u otros activos para el cuidado de la piel solubles en agua). Sin embargo, en algunos casos, la fase acuosa puede comprender componentes distintos del agua, incluidos, entre otros, agentes humectantes, agentes acondicionadores, antimicrobianos, humectantes y/u otros activos solubles en agua para el cuidado de la piel. En algunos casos, el componente no acuoso de la composición comprende un humectante, tal como glicerina y/u otro(s) poliol(es). Las emulsiones también pueden contener un emulsionante. Los emulsionantes pueden ser no iónicos, aniónicos o catiónicos.

El vehículo puede contener uno o más diluyentes hidrofílicos dermatológicamente aceptables. Como se usa en la presente, "diluyente" incluye materiales en los que la composición de la invención puede dispersarse, disolverse o incorporarse de otro modo. Los diluyentes hidrofílicos incluyen agua, diluyentes hidrofílicos orgánicos, tales como alcoholes

monovalentes inferiores (por ejemplo, C1-C4) y glicoles y polioles de bajo peso molecular, incluidos propilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerol, butilenglicol, 1,2,4-butantriol, ésteres de sorbitol, 1,2,6-hexantriol, 5 etanol, isopropanol, ésteres de sorbitol, butandiol, éter propanol, éteres etoxilados, éteres propoxilados y combinaciones de los mismos.

La formulación/producto cosmético puede incluir opcionalmente uno o más ingredientes adicionales comúnmente 10 usados en composiciones cosméticas (por ejemplo, colorantes, agentes para tonificar la piel, agentes antienvjecimiento de la piel, agentes antiinflamatorios, agentes de protección solar, combinaciones de estos y similares), siempre que los ingredientes adicionales no alteren indeseablemente los 15 beneficios anti-glicación proporcionados por la composición.

En algunos casos, puede ser deseable seleccionar agentes para el tono de la piel que funcionen a través de diferentes vías biológicas para que los activos no interfieran entre sí, lo que podría reducir la eficacia de ambos agentes. Los 20 ingredientes adicionales, cuando se incorporan a la composición, deben ser adecuados para su uso en contacto con tejido de piel humana sin toxicidad indebida, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica y similares.

El término "vehículo", como se usa en la presente, también 25 puede referirse a un producto natural o un producto originario

de la naturaleza que ha sido transformado o modificado para que sea distinto del producto natural del que se originó, tal como maltodextrina.

La cantidad de la composición de la invención presente en
5 formulaciones o productos nutraceuticos, farmaceuticos, veterinarios, enologicos o cosméticos variará en función de la aplicación.

Normalmente, la cantidad de composición de la invención que puede estar presente en formulaciones o productos
10 nutraceuticos, farmaceuticos, veterinarios, enologicos o cosméticos será de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 50% en peso, tal como de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 30% o de aproximadamente 1% a aproximadamente 20% de las formulaciones o productos nutraceuticos, farmaceuticos,
15 veterinarios, enologicos o cosméticos, tales como de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 20%, o de aproximadamente 0.1 a 10% o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5% en peso de la formulación o producto.

Los experimentados en la técnica reconocerán que, debido
20 a la naturaleza degenerada del código genético, se puede usar una variedad de moléculas de ADN que difieren en sus secuencias de nucleótidos para codificar una enzima determinada de la descripción. Se hace referencia en el presente documento a la secuencia de ADN nativa que codifica las enzimas biosintéticas
25 descritas anteriormente simplemente para ilustrar una

modalidad de la descripción, y la descripción incluye moléculas de ADN de cualquier secuencia que codifique las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos y proteínas de las enzimas usadas en los métodos de la descripción. De manera similar, un
5 polipéptido normalmente puede tolerar una o más sustituciones, eliminaciones e inserciones de aminoácidos en su secuencia de aminoácidos sin pérdida o pérdida significativa de una actividad deseada. La descripción incluye estos polipéptidos con secuencias de aminoácidos diferentes a las proteínas
10 específicas descritas en la presente, siempre que los polipéptidos modificados o variantes tengan la actividad enzimática anabólica o catabólica del polipéptido de referencia. Además, las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ADN que se muestran en la presente
15 simplemente ilustran modalidades de la descripción.

En la presente se describen genes y proteínas específicos útiles en los métodos, composiciones y organismos de la descripción; sin embargo, se reconocerá que no es necesaria una identidad absoluta con tales genes. Por ejemplo, se pueden
20 realizar y seleccionar cambios en un gen o polinucleótido particular que comprende una secuencia que codifica un polipéptido o enzima para la actividad. Normalmente, estos cambios comprenden mutaciones conservadoras y mutaciones silenciosas. Estos polinucleótidos y polipéptidos modificados
25 o mutados pueden seleccionarse para determinar la expresión de

una enzima funcional usando métodos conocidos en la técnica.

Debido a la degeneración inherente del código genético, también se pueden usar otros polinucleótidos que codifican polipéptidos sustancialmente iguales o funcionalmente equivalentes para clonar y expresar los polinucleótidos que codifican tales enzimas.

Las técnicas conocidas por los experimentados en la técnica pueden ser adecuadas para identificar genes homólogos y enzimas homólogas adicionales. En general, los genes análogos y/o las enzimas análogas pueden identificarse mediante análisis funcional y tendrán similitudes funcionales.

Las técnicas conocidas por los experimentados en la técnica pueden ser adecuadas para identificar genes análogos y enzimas análogas o cualquier gen, proteína o enzima de la vía biosintética; las técnicas pueden incluir, entre otras, la clonación de un gen mediante PCR usando cebadores basados en una secuencia publicada de un gen/enzima de interés, o mediante PCR degenerada usando cebadores degenerados diseñados para amplificar una región conservada entre un gen de interés. Además, un experimentado en la técnica puede usar técnicas para identificar genes, proteínas o enzimas homólogos o análogos con homología o similitud funcional. Las técnicas incluyen examinar una célula o un cultivo celular para determinar la actividad catalítica de una enzima a través de pruebas enzimáticas *in vitro* para tal actividad (por ejemplo, como se

describe en la presente o en Kiritani, K., *Branched-Chain Amino Acids Methods Enzymology*, 1970), luego aislar la enzima con tal actividad mediante purificación, determinación de la secuencia proteica de la enzima mediante técnicas, tales como degradación de Edman, diseño de cebadores de PCR para la secuencia de ácido nucleico probable, amplificación de la secuencia de ADN mediante PCR y clonación de la secuencia de ácido nucleico. Para identificar genes homólogos o similares y/o enzimas homólogas o similares, genes análogos y/o enzimas o proteínas análogas, las técnicas también incluyen la comparación de datos relacionados con un gen o enzima candidato con bases de datos, tales como BRENDA, KEGG o MetaCYC. El gen o enzima candidato puede identificarse dentro de las bases de datos mencionadas anteriormente de acuerdo con las enseñanzas de la presente.

Se debe entender que los términos “entre... y...” y “que van desde... hasta...” incluyen los límites, a menos que se especifique lo contrario. A lo largo de esta descripción y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra “comprenden” y variaciones tales como “comprende”, “que comprende” y “posee” implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo indicado de números enteros o etapas, pero sin exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. El término “que comprende” también significa “que

incluye", así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y. Debe observarse también que, tal como se usa en esta descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el, la" incluyen referentes plurales, a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. A modo de ejemplo, una referencia a "un gen" o "una enzima" es una referencia a "uno o más genes" o "una o más enzimas".

Debe entenderse que esta descripción no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos particulares descritos en la presente, ya que pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir modalidades particulares únicamente y no pretende limitar el alcance de la presente descripción, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen los mismos significados que entiende comúnmente el experimentado en la técnica. De acuerdo con la presente descripción, pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante que estén dentro de los conocimientos de la técnica.

Esta descripción no se limita en su aplicación a los detalles de construcción y disposición de los componentes

establecidos en la siguiente descripción o ilustrados en las figuras. La descripción es susceptible de otras modalidades y de practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras. Además, la fraseología y terminología usadas en este documento tienen
5 fines descriptivos y no deben considerarse limitantes. Preferentemente, los términos usados en la presente se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological Terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kolbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010
10 Basilea, Suiza).

Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta descripción. Cada uno de los documentos citados en la presente (incluyendo todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante,
15 instrucciones, presentaciones de secuencias de números de acceso de GenBank, etc.), ya sea arriba o abajo, se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.

Los ejemplos y las figuras que siguen se presentan a modo de ilustración y sin limitación implícita de la invención.

20 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Protocolo para elaborar una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante de acuerdo con la invención

Todas las cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* implementadas a continuación se construyeron a partir de cepas
25 estándares usando un procedimiento estándar de genética

molecular de levaduras (Methods in yeast Genetics - A cold spring harbour Laboratory course Manual (2000) por D. Burke, D. Dawson, T. Stearns CSHL Press).

Se integraron grupos de los genes mencionados a
5 continuación en levadura recombinante a la vez usando la capacidad de la levadura para recombinar eficientemente extremos de ADN libres que tienen homología de secuencia.

Además, para una mejor comprensión de los siguientes genotipos:

10 - jlp1, lyp1, sam3, his3, leu2, trp1 y ura3 son sitios de inserción.

- Las letras minúsculas significan que el gen considerado está inactivo, las letras mayúsculas reflejan un gen activo.

- "::<": después del nombre de un gen significa que el gen
15 está interrumpido por lo que sigue (si se inserta más de un gen, se indican entre paréntesis []). La interrupción del gen es concomitante con una eliminación completa de la secuencia codificante pero conserva el promotor. En consecuencia, el gen seguido de "::<" está inactivo y se anota en minúsculas. Si no
20 se especifica, la transcripción del gen insertado está controlada por el promotor del gen alterado.

- "gene.Kl" significa que el gen se origina en *Kluyveromyces lactis*.

Más particularmente, las secuencias codificantes a clonar
25 se sintetizaron artificialmente. Para secuencias heterólogas

(no de levadura), las secuencias nucleicas se modificaron para obtener una secuencia codificante sinónima usando el uso de codones de levadura. Usando enzimas de restricción y tecnología de clonación clásica, cada secuencia sintética se clonó entre
5 un promotor de la transcripción y un terminador de la transcripción. Cada secuencia promotora está precedida por una secuencia de 50 a 200 nucleótidos homóloga a la secuencia del terminador en la dirección 5'. De manera similar, el terminador de cada gen (un gen que comprende la secuencia terminadora
10 codificadora del promotor) está seguido por secuencias homólogas al gen inmediatamente siguiente. De modo que cada una de las unidades a integrar tenga una superposición de 50-200 nucleótidos tanto con la unidad en la dirección 5' como con la unidad en la dirección 3'. Para la primera unidad, el
15 promotor está precedido por 50-200 nucleótidos homólogos al nucleótido del cromosoma de levadura para el locus en el que se integrará. De manera similar, para la última unidad, al terminador le siguen 50-200 nucleótidos homólogos al nucleótido del cromosoma de levadura para el locus en el que se integrará.
20 Luego, cada unidad se amplifica por PCR a partir de las construcciones de plásmidos, produciendo X unidades de ADN lineal que tienen secuencias superpuestas. Al menos uno de estos genes es un marcador auxotrófico, con el fin de seleccionar el evento de recombinación. Todos los fragmentos
25 lineales se transforman en la levadura a la vez y se selecciona

una célula de levadura recombinante para la auxotrofia relacionada con el marcador usado. Luego se verifica la integridad de la secuencia mediante PCR y secuenciación.

Ejemplo 2: Ejemplos comparativos para la producción de ácido hialurónico

1. Producción de ácido hialurónico inferior a 50 kDa

A. En primer lugar, se obtienen tres cepas recombinantes: YA5234-1, YA5235-1 y YA5302-2.

En consecuencia, estas tres cepas son las siguientes:

10 **YA5234-1** : MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1- trPL3-
pMET6-QRI1-tIDP1- HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-
trPL41B, pCUP1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-
trPL15A], leu2, lyp1::[pCCW12.sba-HYAL-3.Ts-trPL15A,
pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1,
15 pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba],
sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-
UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-
XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-
trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1- TRP1]x2

20 **YA5235-1**: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1- trPL3-
pMET6-QRI1-tIDP1- HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-
trPL41B, pCUP1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-
trPL15A], leu2, lyp1::[pNUP57-HYAL-3.Csa-trPL15A, pCCW12.Sk-
HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, pCCW12.Sba-
25 HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba],

sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1- TRP1]x2

5 **YA5302-2** : MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1- trPL3-
pMET6-QRI1-tIDP1- HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-
trPL41B, pCUP1-UGP1-trPL3, pCUP1-QRI1-tIDP1, pPDC1-UGP1-tTPI1,
pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-trPL15A], leu2,
lyp1::[pCCW12.Sba-HYAL-3.Li-trPL15A, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-
10 tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, pCCW12.Sba-HASB.vir-
trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], sam3::[LEU2.Kl,
pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-
GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-
QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-
15 tIDP1- TRP1]x2

HYAL-3 representa una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa asociada con una señal de secreción pero sin una señal de anclaje.

20 HASA, HASA-1, HASA-A, HASA2 y XHASA2 representan todos un
ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad
hialuronano sintasa. Se diferencian entre sí en que son
diferentes versiones recodificadas de una secuencia de ácido
nucleico que codifica las enzimas hialuronano sintasa. HASA-1
25 tiene la secuencia SEC. ID NO.: 1, HASA-A tiene la secuencia

SEC. ID NO.: 2, HASA2 tiene la secuencia SEC. ID NO.: 7 y XHASA2 tiene la secuencia SEC. ID NO.: 6.

HASB y HASB-A representan una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa 6-
 5 deshidrogenasa. Se diferencian entre sí en que son versiones recodificadas diferentes de una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima. HASB.At tiene la secuencia SEC. ID NO.: 12, HASB.Vir tiene la secuencia SEC. ID NO.: 13 y HASB-A.Vir tiene la secuencia SEC. ID NO.: 14.

10 Todas estas cepas se incubaron en 25 mL de medio SY amortiguado con MES 0.1 M pH 5.5 en un Erlenmeyer con deflectores durante 48 horas a 28°C con agitación vigorosa.

El medio SY comprende los siguientes elementos:

KH₂PO₄: 100 mM; MgSO₄·7H₂O: 2.8 mM; K₂SO₄: 11.5 mM; Na₂SO₄:
 15 1.1 mM; NaCl: 2.6 mM; CaCl₂·2H₂O: 0.7 mM; CuSO₄·5H₂O: 15 µM; KI:
 6 µM; FeCl₃: 30 µM; ZnSO₄·7H₂O: 61 µM; MnSO₄H₂O: 25 µM; H₂SO₄:
 110 µM; Sal hemicálcica de los ácidos pantoténicos: 42 µM;
 clorhidrato de tiamina: 59 µM; clorhidrato de piridoxina: 49
 µM; Mioinositol (C₆H₁₂O₆): 555 µM; Ácido nicotínico (C₆H₅NO₂):
 20 29 µM; D-biotina: 0.82 µM; Citrato de amonio tribásico: 33 mM;
 y glucosa o sacarosa 2-30%.

El medio de crecimiento se recuperó a las 48 horas y se analizó el contenido y la calidad del ácido hialurónico. Se cargó una alícuota del medio y se pasó sobre un gel de agarosa
 25 al 0.5% y posteriormente se coloreó con "stains all" (sigma

Aldrich Número CAS 7423-31-6).

La cantidad de ácido hialurónico presente en el medio se evaluó mediante una determinación colorimétrica después del tratamiento con ácido sulfúrico concentrado y carbazol (Bitter y Muir (1962) *analytics biochemistry* 4, 330-334).

Con fines ilustrativos, el gel de agarosa obtenido después de procesar una alícuota del sobrenadante de la cepa YA5235-1 y teñirlo con "stains all" (Número CAS 7423-31-6) se proporciona en la Figura 2A. Clásicamente se introduce en el gel al lado de estándares de peso molecular (PM) de HA (de izquierda a derecha, PM de 10 kDa, 20 kDa, 50 kDa y 300 kDa). Las cantidades obtenidas con estas diferentes cepas son respectivamente:

- YA5234-1: 2.4 g.L⁻¹.
- YA5235-1: 4.5 g.L⁻¹.
- YA5302-2: 3.7 g.L⁻¹.

En comparación, una cepa de levadura nativa, como por ejemplo la cepa CC788-2D (Chérest *et al.*, (2000) *J Biol. Chem.* 275: 14056-14063), no produce ácido hialurónico.

De este experimento resulta que una cepa recombinante que comprende las modificaciones de acuerdo con la invención produce una mayor cantidad de ácido hialurónico cuando se cultiva en las mismas condiciones en comparación con otras cepas recombinantes que no comprenden todas las modificaciones genéticas de acuerdo con la invención.

Además, estas tres cepas condujeron a la producción, después de 48 horas, de ácido hialurónico que tiene un peso molecular comprendido entre 20 kDa y 50 kDa.

B. También se han obtenido otras tres cepas recombinantes:
5 YA5110-13 y YA5260-4.

Estas tres cepas son las siguientes:

YA5110-13: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1-trRPL3, pMET6-QRI1-tIDP1-HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-trRPL41B, pCUP1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-trRPL15A], leu2, lyp1::[pNUP57-HYAL-3.Hn-trRPL15A, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, pCCW12.Sba-HASB.vir-trRPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trRPL15A.Sba], sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trRPL15A, pEN02-UGP1-trRPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trRPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trRPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1-TRP1]x2
10
15

YA5260-4: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1-trRPL3-pMET6-QRI1-tIDP1-HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-trRPL41B, pCUP1-UGP1-trRPL3, pCUP1-QRI1-tIDP1, pPDC1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-trRPL15A], leu2, lyp1::[pTEF3-HYAL-31.Hn-trRPL15A, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, pCCW12.Sba-HASB.vir-trRPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trRPL15A.Sba], sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trRPL15A, pEN02-UGP1-trRPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trRPL3, pTDH3-
20
25

QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trRPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1- TRP1]x2

YA5569 : MAT- α , his3::[pSAM1-UGP1- trRPL3, pMET6-QRI1-tIDP1, HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA-1.Sz-trRPL41B, pCUP1-UGP1-trRPL3, pCUP1-QRI1-tIDP1, pPDC1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-trRPL15A], leu2, lyp1::[pCWP2-HYAL-31.Csa-trRPL15A, pCCW12.Sba-HASB.vir-trRPL3, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-trRPL41B, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trRPL15A.Sba], sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1.Ago-GFA1-trRPL15A, pEN02-UGP1-trRPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF1-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trRPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[trRPL3-HASB.Vir-pMET6, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1, TRP1]x2

HYAL-31 representa una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronidasa asociada tanto con una señal de secreción como con una señal de anclaje.

HASA-1, HASA-A, HASA2 y XHASA2 representan todos una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa. Se diferencian entre sí en que son diferentes versiones recodificadas de una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima hialuronano sintasa. HASA-1 tiene la secuencia SEC. ID NO.: 1, HASA-A tiene la secuencia SEC. ID NO.: 2, HASA2 tiene la secuencia SEC. ID NO.: 7 y XHASA2 tiene la secuencia SEC. ID NO.: 6.

HASB y HASB-A representan una secuencia de ácido nucleico

que codifica un polipéptido que tiene actividad UDP-glucosa 6-deshidrogenasa. Se diferencian entre sí en que son versiones recodificadas diferentes de una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima. HASB.At tiene la secuencia SEC. ID NO.: 12, HASB.Vir tiene la secuencia SEC. ID NO.: 13 y HASB-A.Vir tiene la secuencia SEC. ID NO.: 14.

Las cepas se inocularon en 2 litros del medio SY definido anteriormente a pH 6 en sacarosa al 2% y CuSO_4 500 μM en un biorreactor. Luego se cultivaron en lote alimentado adicionando CuSO_4 500 μM a las 7 h, 24 h, 31 h y entre 130 y 175 g.L^{-1} de sacarosa de 10 a 48 h.

Para YA5110-13, el pH se mantuvo entre 5.8 y 6.2 usando H_2SO_4 al 15% y NH_4OH al 10% desde $t=31$ h.

Para YA5260-4, el pH se mantuvo entre 5.8 y 6.2 usando H_2SO_4 al 15% y NH_4OH al 10% durante toda la fermentación.

Para YA5569, el pH se mantuvo entre 5.8 y 6.2 usando H_2SO_4 al 15% y NH_4OH al 10% durante toda la fermentación.

El medio de crecimiento se recuperó a las 48 horas y se analizó el contenido y la calidad del ácido hialurónico como se describió anteriormente.

Las cantidades de ácido hialurónico obtenidas con estas dos cepas son respectivamente:

- YA5110-13: 23 g.L^{-1} .
- YA5260-4: 16 g.L^{-1} .
- YA5569: 32 g.L^{-1} .

En comparación, una cepa nativa no produce ácido hialurónico.

De este experimento resulta que una cepa recombinante que comprende las modificaciones de acuerdo con la invención produce una mayor cantidad de ácido hialurónico cuando se cultiva en las mismas condiciones en comparación con otras cepas recombinantes que no comprenden todas las modificaciones genéticas de acuerdo con la invención.

Además, el ácido hialurónico producido por las cepas YA5110-13 y YA5260 tuvo un peso molecular de aproximadamente 20 kDa, mientras que el ácido hialurónico producido por YA5569 tuvo un peso molecular de aproximadamente 20 kDa a 50 kDa.

Se realizó exactamente el mismo experimento usando estas tres cepas recombinantes mientras se reemplazaba la sacarosa por glucosa. El ácido hialurónico obtenido tenía el mismo peso molecular de aproximadamente 20 kDa o de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 50 kDa después de 48 h.

C. Se ha obtenido otra cepa recombinante 5672-29A, como sigue:

5672-29A: MAT- α , his3::[pSAM1-UGP1-trRPL3, pMET6-QRI1-tIDP1, HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Sba, pTEF1.Sba-HASB.Vir-trRPL3.Sm, pTDH3.Sk-HASB.Vir-tTEF1.Sba, pTDH3-1.Sba-HASA-1.Vir-trRPL3.Sba, pTDH3.Sar-HASA-1.Vir-trRPL15A.Sba, pTEF1-HYAL-31.Hn-trRPL15A], leu2, sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1.Ago-GFA1-trRPL15A, pEN02-UGP1-trRPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1,

pTEF1-PCM1-trPL41B, TRP1.Sba-loxP], trp1

HYAL-31 representa una hialuronidasa asociada con una señal de anclaje.

1 HASA-1 representa una secuencia de ácido nucleico que
5 codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa. HASA-1 tiene la secuencia SEC. ID NO.: 1.

La cepa se inoculó en 25 mL del medio SY definido anteriormente a pH 5.5 amortiguado con MES 0.1 M en un Erlenmeyer con deflectores a 28°C con agitación vigorosa.

10 El medio de crecimiento se recuperó a las 48 horas y se analizó el contenido y la calidad del ácido hialurónico como se describió anteriormente.

La cantidad de ácido hialurónico obtenida con la cepa fue de 3.7 g.L⁻¹.

15 2. Producción de ácido hialurónico que tiene un peso molecular comprendido entre 50 kDa y 1000 kDa.

A. En primer lugar se obtienen tres cepas recombinantes: YA5233-1, YA5359-10 y YA5381-1.

En consecuencia, estas tres cepas son las siguientes:

20 **YA5233-1**: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1- trPL3- pMET6-QRI1-tIDP1- HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz- trPL41B, pCUP1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At- trPL15A], leu2, lyp1::[pTEF1-HYAL-3.Ts-trPL15A, pCCW12.Sk- HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, pCCW12.Sba-
25 HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba],

sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1- TRP1]x2

5 **YA5359-10**: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1- trPL3-pMET6-QRI1-tIDP1- HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-trPL41B, pCUP1-UGP1- tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-trPL15A], leu2, lyp1::[pCCW12.sba-HYAL-31.Ts-trPL15A, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, 10 pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1- TRP1]x2

15 **YA5381-1**: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1- trPL3-pMET6-QRI1-tIDP1- HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-trPL41B, pCUP1-UGP1- tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-trPL15A], leu2, lyp1::[pCCW12.Sar-HYAL2-31.Ts-trPL15A, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, 20 pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1- TRP1]x2

25 HASA-1, HASA-A, HASA2 y XHASA2 se definieron previamente.

HASB y HASB-A se definieron previamente.

Todas estas cepas se incubaron en 25 mL del medio SY definido anteriormente, amortiguado con MES 0.1 M pH 5.5 Erlenmeyer con deflectores durante 48 horas a 28°C con
5 agitación vigorosa.

El medio de crecimiento se recuperó a las 48 h y se analizó el contenido y la calidad del ácido hialurónico como se definió anteriormente.

Para fines ilustrativos, el gel de agarosa obtenido
10 después de procesar una alícuota del sobrenadante de la cepa YA5359-10, después de 31 h y después de 48 h, y teñirlo con "stains all" (Número CAS 7423-31-6) se proporciona en la Figura 2B. Se corre de manera clásica en el gel lado a lado de estándares de peso molecular (PM) de HA (de izquierda a
15 derecha, PM de 20 kDa, 50 kDa, 60-120 kDa, 300 kDa y 750 kDa). Las cantidades obtenidas con estas diferentes cepas son respectivamente:

- YA5233-1: 3.1 g.L⁻¹.
- YA5359-10: 3.4 g.L⁻¹.
- 20 - YA5381-1: 3.0 g.L⁻¹.

En comparación, una cepa nativa no produce ácido hialurónico.

De este experimento resulta que una cepa recombinante que comprende las modificaciones de acuerdo con la invención
25 produce una mayor cantidad de ácido hialurónico cuando se

cultiva en las mismas condiciones en comparación con otras cepas recombinantes que no comprenden todas las modificaciones genéticas de acuerdo con la invención.

Además, estas tres cepas condujeron a la producción,
5 después de 48 horas, de ácido hialurónico que tiene un peso molecular comprendido:

- para YA5233-1: entre 50 kDa y 500 kDa;
- para YA5359-10: entre 100 kDa y 750 kDa; y
- para YA5381-1: entre 50 kDa y 250 kDa.

10 B. También se han obtenido otras seis cepas recombinantes: YA5262-16, YA5326-3, YA5300-15, YA5358-4, YA5264-1 y YA5331-6. Estas seis cepas son las siguientes:

YA5262-16: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1- trPL3-
pMET6-QRI1-tIDP1- HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-
15 trPL41B, pCUP1-UGP1-trPL3, pCUP1-QRI1-tIDP1, pPDC1-UGP1-tTPI1,
pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-trPL15A], leu2,
lyp1::[pCCW10.ago-HYAL-31.Hn-trPL15A, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-
tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, pCCW12.Sba-HASB.vir-
trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], sam3::[LEU2.Kl,
20 pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-
GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-
QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-
tIDP1- TRP1]x2

YA5326-3: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1- trPL3-
25 pMET6-QRI1-tIDP1- HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-

trPL41B, pCUP1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-trPL15A], leu2, lyp1::[pCCW10.ago-HYAL-31.Csa-trPL15A, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba],
 5 sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1-TRP1]x2

YA5300-15: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1-trPL3-pMET6-QRI1-tIDP1-HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-trPL41B, pCUP1-UGP1-trPL3, pCUP1-QRI1-tIDP1, pPDC1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-trPL15A], leu2, lyp1::[pTDH3-HYAL-3.Ts-trPL15A, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3,
 15 pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1-TRP1]x2

YA5358-4: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1-trPL3-pMET6-QRI1-tIDP1-HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-trPL41B, pCUP1-UGP1-trPL3, pCUP1-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-trPL15A], leu2, lyp1::[pCCW12.Sar-HYAL-31.Li-trPL15A, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1,
 25 pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba],

- sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1- TRP1]x2
- 5 **YA5264-1**: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1- trPL3-pMET6-QRI1-tIDP1- HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-trPL41B, pCUP1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-trPL15A], leu2, lyp1::[pTDH3-HYAL-31.Ts-trPL15A, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, pCCW12.Sba-
- 10 HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1- TRP1]x2
- 15 **YA5331-6**: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1- trPL3-pMET6-QRI1-tIDP1- HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-trPL41B, pCUP1-UGP1-trPL3, pCUP1-QRI1-tIDP1, pPDC1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-trPL15A], leu2, lyp1::[pTEF3-HYAL-31.Li-trPL15A, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba,
- 20 pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1-
- 25 TRP1]x2

HASA-1, HASA-A, HASA2 y XHASA2 se definieron previamente.

HASB y HASB-A se definieron previamente.

Se inoculó YA5262-16 en 2 litros del medio SY definido anteriormente con un pH de 4 en glucosa al 2% en un biorreactor y el pH se mantuvo en 4 durante toda la fermentación usando H_2SO_4 al 15% y NH_4OH al 10%.

YA5326-3:

- se inoculó en 2 litros del medio SY definido anteriormente a pH 6 en glucosa al 2% en un biorreactor y el pH se mantuvo en 6 durante toda la fermentación usando H_2SO_4 al 15% y NH_4OH al 10%; o

- se inoculó en 2 litros del medio SY definido anteriormente a pH 6 en sacarosa al 2% en un biorreactor y se mantuvo el pH a 6 hasta las 34h y a pH 4 desde las 34h a las 48h con H_2SO_4 al 15% y NH_4OH al 10%.

Se inoculó YA5300-15 en 2 litros del medio SY definido anteriormente a pH 6 en sacarosa al 2% en un biorreactor y el pH se mantuvo a 6 durante toda la fermentación usando H_2SO_4 al 15% y NH_4OH al 10%.

Se inoculó YA5358-4 en 2 litros del medio SY definido anteriormente con un pH de 6 en glucosa al 2% en un biorreactor y el pH se mantuvo en 6 durante toda la fermentación usando H_2SO_4 al 15% y NH_4OH al 10%.

Se inoculó YA5264-1 en 2 litros del medio SY definido anteriormente a pH 6 en sacarosa al 2% en un biorreactor y el

pH se mantuvo a 6 durante toda la fermentación usando H_2SO_4 al 15% y NH_4OH al 10%.

Se inoculó YA5331-6 en 2 litros del medio SY definido anteriormente con un pH de 6 en glucosa al 2% en un biorreactor y el pH se mantuvo en 6 durante toda la fermentación usando H_2SO_4 al 15% y NH_4OH al 10%.

El medio de crecimiento se recuperó a las 48 horas y se analizó el contenido y la calidad del ácido hialurónico como se describió anteriormente.

Las cantidades de ácido hialurónico obtenidas con estas dos cepas son respectivamente:

- YA5262-16: 19 g.L^{-1} ;
- YA5326-3: respectivamente 13 g.L^{-1} y 15 g.L^{-1} ;
- YA5300-15: 9 g.L^{-1} ;
- YA5358-4: 14 g.L^{-1} ;
- YA5264-1: 6 g.L^{-1} ; y
- YA5331-6: 9 g.L^{-1} .

En comparación, una cepa nativa no produce ácido hialurónico.

De este experimento resulta que una cepa recombinante que comprende las modificaciones de acuerdo con la invención produce una mayor cantidad de ácido hialurónico cuando se cultiva en las mismas condiciones en comparación con otras cepas recombinantes que no comprenden todas las modificaciones genéticas de acuerdo con la invención.

Además, el ácido hialurónico producido por estas cepas al cabo de 48 horas tuvo un peso molecular:

- YA5262-16: de 50 kDa;
- YA5326-3: de 50 kDa respectivamente o comprendido entre
5 50 kDa y 250 kDa;
- YA5300-15: comprendido entre 100 kDa y 1000 kDa;
- YA5358-4: comprendido entre 100 kDa y 1000 kDa;
- YA5264-1: comprendido entre 100 kDa y 1000 kDa; y
- YA5331-6: comprendida entre 100 kDa y 1000 kDa.

10 Además, la cepa recombinante YA5235-1 descrita anteriormente se inoculó en un biorreactor a pH 6 en sacarosa al 2% y el pH se mantuvo en 6 hasta las 34 h y en 4 desde las 34 h hasta las 48 h con H_2SO_4 al 15% y NH_4OH al 10%.

Después de 48h el medio contiene 18 g.L^{-1} de ácido
15 hialurónico de 100-1000 kDa.

El mismo experimento se realizó usando YA5235-1 mientras se usaba glucosa en lugar de sacarosa. El ácido hialurónico obtenido también tiene un peso molecular comprendido entre 100 y 1000 kDa.

20 Estos resultados muestran que, en particular, la regulación del pH a lo largo del proceso de fermentación así como la producción de una hialuronidasa acoplada a una señal de secreción o una señal de secreción y una señal de anclaje influyen, o incluso permiten controlar, el tamaño del polímero
25 de ácido hialurónico producido.

3. Producción de ácido hialurónico de peso molecular superior a 1000 kDa.

Se obtienen cuatro cepas recombinantes: YA5232-1, YA5303-3, YA5374-4 y YA5382-1.

5 En consecuencia, estas cuatro cepas son las siguientes:

YA5232-1: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1- trPL3-pMET6-QRI1-tIDP1- HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-trPL41B, pCUP1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-trPL15A], leu2, lyp1::[pNUP57-HYAL-3.Ts-trPL15A, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1- TRP1]x2

10
15

YA5303-2: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1- trPL3-pMET6-QRI1-tIDP1- HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-trPL41B, pCUP1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-trPL15A], leu2, lyp1::[pNUP57-HYAL-3.Li-trPL15A, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1- TRP1]x2

20
25

YA5374-3: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1- trPL3-
 pMET6-QRI1-tIDP1- HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-
 trPL41B, pCUP1-UGP1- tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-
 trPL15A], leu2, lyp1::[pCCW12.Sar-HYAL-3.Ba-trPL15A,
 5 pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1,
 pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba],
 sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-
 UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-
 XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-
 10 trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1- TRP1]x2

YA5382-1: MAT- α , can1-100, his3::[pSAM1-UGP1- trPL3-
 pMET6-QRI1-tIDP1- HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl, pCUP1-HASA2.Sz-
 trPL41B, pCUP1-UGP1- tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-HASB.At-
 trPL15A], leu2, lyp1::[pTEF1-HYAL2-31.Ba-trPL15A, pCCW12.Sk-
 15 HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-tDIT1, pCCW12.Sba-
 HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba],
 sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1-GFA1-trPL15A, pEN02-
 UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF3-PCM1-tIDP1, pCCW12-
 XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[pMET6-HASB.Vir-
 20 trPL3, pMET25-HASA-1.Vir-tIDP1- TRP1]x2

HASA-1, HASA-A, HASA2 y XHASA2 se definieron previamente.

HASB y HASB-A se definieron previamente.

Todas estas cepas se incubaron en 25 mL del medio SY
 definido anteriormente, amortiguado con MES 0.1 M pH 5.5 en un
 25 Erlenmeyer con deflectores durante 48 horas a 28°C con

agitación vigorosa.

El medio de crecimiento se recuperó a las 48 h y se analizó el contenido y la calidad del ácido hialurónico como se definió anteriormente.

5 Las cantidades obtenidas con estas diferentes cepas son respectivamente:

- YA5232-1: 4 g.L⁻¹.
- YA5303-3: 2,7 g.L⁻¹.
- YA5374-3: 2,5 g.L⁻¹.
- 10 - YA5382-1: 3,0 g.L⁻¹.

En comparación, una cepa nativa no produce ácido hialurónico.

De este experimento resulta que una cepa recombinante que comprende las modificaciones de acuerdo con la invención
15 produce una mayor cantidad de ácido hialurónico cuando se cultiva en las mismas condiciones en comparación con otras cepas recombinantes que no comprenden todas las modificaciones genéticas de acuerdo con la invención.

Además, estas cuatro cepas condujeron a la producción,
20 después de 48 horas, de ácido hialurónico con un peso molecular:

- para YA5232-1: mayor que aproximadamente 1000 kDa;
- para YA5303-3: de aproximadamente 1000 kDa;
- para YA5374-3: mayor que aproximadamente 1000 kDa; y
- 25 - para YA5382-1: mayor que aproximadamente 1000 kDa.

Ejemplo 3: Ejemplos comparativos para la producción de ácido hialurónico

A. Se obtienen las cinco cepas recombinantes siguientes:

YA5509: MAT- α , can1-100, his3::[trPL3-UGP1-pSAM1, pMET6-QRI1-tIDP1, HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl-RS, pCUP1-HASA.Sz-trPL41B, pCUP1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-UGD1.At-trPL15A], leu2, lyp1::[pCCW10.Ago-HYAL-31.Hn-trPL15A, pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-trPL41B, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], sam3::[LEU2.Kl-RS, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1.Ago-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF1-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[trPL3-HASB.Vir-pMET6, pMET25-HASA.Vir-tIDP1, TRP1]x2, ura3::[trPL3-MHPF.Ec-pPDC1, pTDH3-GDH-21.Eca-tIDP1, URA3]x2

YA5789: MAT- α , can1-100, his3::[trPL3-UGP1-pSAM1, pMET6-QRI1-tIDP1, HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl-RS, pCUP1-HASA.Sz-trPL41B, pCUP1-UGP1-trPL3, pCUP1-QRI1-tIDP1, pPDC1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-UGD1.At-trPL15A], leu2, lyp1::[tMET3.Sba-MET3.Sba-RS-pMET3.Sba, pCCW10.Ago-HYAL-31.Hn-trPL15A, pTEF1.Ago-GLN1-tTDH3, pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-trPL41B, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], met3::, sam3::[LEU2.Kl-RS, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1.Ago-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF1-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[trPL3-HASB.Vir-pMET6, pMET25-HASA.Vir-

tIDP1, TRP1]x2, ura3::[trPL3-MHPF.Ec-pPDC1, pTDH3-GDH-21.Eca-tIDP1, URA3]x2

YA5790: MAT- α , can1-100, glt1::[MET3.Sba-RS, pCCW10.Ago-HYAL-31.Hn-trPL15A, pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-trPL41B, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba, pTEF1.Ago-GLN1-tTDH3], his3::[trPL3-UGP1-pSAM1, pMET6-QRI1-tIDP1, HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl-RS, pCUP1-HASA.Sz-trPL41B, pCUP1-UGP1-trPL3, pCUP1-QRI1-tIDP1, pPDC1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-UGD1.At-trPL15A],
 10 leu2, met3::, sam3::[LEU2.Kl-RS, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1.Ago-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF1-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1],
 trp1::[trPL3-HASB.Vir-pMET6, pMET25-HASA.Vir-tIDP1, TRP1]x2, ura3::[trPL3-MHPF.Ec-pPDC1, pTDH3-GDH-21.Eca-tIDP1, URA3]x2

YA5806: MAT- α , can1-100, glt1::[MET3.Sba-RS, pCCW10.Ago-HYAL-31.Hn-trPL15A, pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-trPL41B, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], his3::[trPL3-UGP1-pSAM1, pMET6-QRI1-tIDP1, HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl-RS, pCUP1-HASA.Sz-trPL41B, pCUP1-UGP1-trPL3, pCUP1-QRI1-tIDP1, pPDC1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-UGD1.At-trPL15A], leu2, met3::, sam3::[LEU2.Kl-RS, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1.Ago-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF1-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[trPL3-HASB.Vir-pMET6, pMET25-HASA.Vir-tIDP1, TRP1]x2, ura3::[trPL3-MHPF.Ec-

pPDC1, pTDH3-GDH-21.Eca-tIDP1, URA3]x2

YA5658: MAT- α , can1-100, his3::[trPL3-UGP1-pSAM1, pMET6-QRI1-tIDP1, HIS3]x5, jlp1::[LEU2.Kl-RS, pCUP1-HASA.Sz-trPL41B, pCUP1-UGP1-trPL3, pCUP1-QRI1-tIDP1, pPDC1-UGP1-tTPI1, pTDH3-QRI1-tMET25, pCCW12-UGD1.At-trPL15A], leu2, lyp1::[pCCW10.Ago-HYAL-31.Hn-trPL15A, pTEF1.Ago-GLN1-tTDH3, pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3, pCCW12.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pCCW12-HASA-1.Vir-trPL41B, pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], sam3::[LEU2.Kl-RS, pPDC1-PGM1-tIDP1, pTEF1.Ago-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF1-PCM1-tIDP1, pCCW12-XHASA2.Xl-trPL3, pTDH3-QRI1-tIDP1], trp1::[trPL3-HASB.Vir-pMET6, pMET25-HASA.Vir-tIDP1, TRP1]x2, ura3::[trPL3-MHPF.Ec-pPDC1, pTDH3-GDH-21.Eca-tIDP1, URA3]x2

HASA-1, HASA-A y XHASA2 se definieron previamente.

HASB y HASB-A se definieron previamente.

Todas estas cepas se incubaron en 25 mL del medio SY definido anteriormente, amortiguado con MES 0.1 M pH 5.5 en un Erlenmeyer con deflectores durante 48 horas a 28°C con agitación vigorosa.

El medio de crecimiento se recuperó a las 48 h y se analizó el contenido y la calidad del ácido hialurónico como se definió anteriormente.

Las cantidades obtenidas con estas diferentes cepas son respectivamente:

- YA5509: 3.5 g.L⁻¹.

- YA5789 (sobrexpresión de GLN1): 5 g.L⁻¹.
- YA5658 (sobrexpresión de GNL1): 4.5 g.L⁻¹.
- YA5806 (Δ GLT1): 4.5 g.L⁻¹.
- YA5790 (sobrexpresión de GNL1; Δ GLT1): 6.7 g.L⁻¹.

5 En comparación, una cepa nativa no produce ácido hialurónico.

 Como resultado de este experimento, en condiciones similares, una cepa recombinante de acuerdo con la invención produce significativamente más ácido hialurónico cuando se
10 sobreexpresa GLN1 o cuando se altera GLT1 en comparación con otras cepas recombinantes de acuerdo con la invención desprovistas de cualquiera de estas dos modificaciones (una Respecto al aumento del rendimiento de la producción en 27-32% y 27%).

15 Además, una cepa recombinante de acuerdo con la invención produce incluso más ácido hialurónico cuando tanto GLN1 está sobreexpresado como GLT1 está alterado en comparación con otras cepas recombinantes de acuerdo con la invención que comprenden sólo una de estas dos modificaciones o carecen de ambas (un
20 mayor rendimiento de producción 48% respecto al que no comprende ninguna de estas dos modificaciones).

B. Se obtienen las cuatro cepas recombinantes siguientes:

YA6178: MAT- α , glt1::[MET3.Sba, pTDH3-HYAL-31.Csa-trPL15A, pTEF1.Ago-GLN1-tTDH3, pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3,
25 pCCW12.Sm-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], his3::[pSAM1-UGP1-trPL3,

pMET6-QRI1-tIDP1, HIS3]x3, jlp1::[LEU2.Sba-loxP, pTEF1.Sba-HASB.Vir-trPL3.Sm, pTDH3.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pTDH3-1.Sba-HASA-1.Vir-trPL3.Sba, pTDH3.Sar-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], leu2, met3 Δ 1, sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1,
 5 pTEF1.Ago-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF1-PCM1-trPL41B, TRP1.Sba-loxP], trp1, ura3::[pPDC1-MHPF.Ec- trPL3, pTDH3-GDH-21.Eca-tIDP1, URA3]x2

YA6179: MAT- α , glt1::[MET3.Sba, pTDH3-HYAL-31.Csa-trPL15A, pTEF1.Ago-GLN1-tTDH3, pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3,
 10 pCCW12.Sm-HASA-2.Vir-trPL15A.Sba], his3::[pSAM1-UGP1-trPL3, pMET6-QRI1-tIDP1, HIS3]x3, jlp1::[LEU2.Sba-loxP, pTEF1.Sba-HASB.Vir-trPL3.Sm, pTDH3.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pTDH3-1.Sba-HASA-1.Vir-trPL3.Sba, pTDH3.Sar-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], leu2, met3 Δ 1, sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1,
 15 pTEF1.Ago-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF1-PCM1-trPL41B, TRP1.Sba-loxP], trp1, ura3::[pPDC1-MHPF.Ec- trPL3, pTDH3-GDH-21.Eca-tIDP1, URA3]x2

YA6180: MAT- α , glt1::[MET3.Sba, pTDH3-HYAL-31.Csa-trPL15A, pTEF1.Ago-GLN1-tTDH3, pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3,
 20 pCCW12.Sm-HASA-3.Vir-trPL15A.Sba], his3::[pSAM1-UGP1-trPL3, pMET6-QRI1-tIDP1, HIS3]x3, jlp1::[LEU2.Sba-loxP, pTEF1.Sba-HASB.Vir-trPL3.Sm, pTDH3.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pTDH3-1.Sba-HASA-1.Vir-trPL3.Sba, pTDH3.Sar-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], leu2, met3 Δ 1, sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1,
 25 pTEF1.Ago-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1,

pTEF1-PCM1-trPL41B, TRP1.Sba-loxP], trp1, ura3::[pPDC1-MHPF.Ec- trPL3, pTDH3-GDH-21.Eca-tIDP1, URA3]x2

YA6181: MAT- α , glt1::[MET3.Sba, pTDH3-HYAL-31.Csa-trPL15A, pTEF1.Ago-GLN1-tTDH3, pCCW12.Sba-HASB.vir-trPL3,
 5 pCCW12.Sm-HASA-5.Vir-trPL15A.Sba], his3::[pSAM1-UGP1-trPL3, pMET6-QRI1-tIDP1, HIS3]x3, jlp1::[LEU2.Sba-loxP, pTEF1.Sba-HASB.Vir-trPL3.Sm, pTDH3.Sk-HASB-A.Vir-tTEF1.Sba, pTDH3-1.Sba-HASA-1.Vir-trPL3.Sba, pTDH3.Sar-HASA-A.Vir-trPL15A.Sba], leu2, met3 Δ 1, sam3::[LEU2.Kl, pPDC1-PGM1-tIDP1,
 10 pTEF1.Ago-GFA1-trPL15A, pEN02-UGP1-trPL3, pCWP2-GNA1-tTPI1, pTEF1-PCM1-trPL41B, TRP1.Sba-loxP], trp1, ura3::[pPDC1-MHPF.Ec- trPL3, pTDH3-GDH-21.Eca-tIDP1, URA3]x2

HASA-1 y HASA-A se definieron previamente.

HASB y HASB-A se definieron previamente.

15 HASA-2, HASA-3 y HASA5 representan todos una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa. Se diferencian entre sí en que son diferentes versiones recodificadas de una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima hialuronano sintasa. HASA-2
 20 tiene la secuencia SEC. ID NO.: 101, HASA-3 tiene la secuencia SEC. ID NO.: 102 y HASA-5 tiene la secuencia SEC. ID NO.: 104.

Todas estas cepas se incubaron en 25 mL del medio SY definido anteriormente, amortiguado con MES 0.1 M, pH 5.5 en un Erlenmeyer con deflectores durante 48 horas a 28°C con
 25 agitación vigorosa.

El medio de crecimiento se recuperó a las 48 h y se analizó el contenido y la calidad del ácido hialurónico como se definió anteriormente.

Las cantidades obtenidas con estas diferentes cepas son
5 respectivamente:

- YA6178: 6.3 g.L⁻¹.
- YA6179: 5.9 g.L⁻¹.
- YA6180: 5.2 g.L⁻¹.
- YA6181: 6.4 g.L⁻¹.

10 En comparación, una cepa nativa no produce ácido hialurónico.

Además, estas cuatro cepas condujeron a la producción, al cabo de 48 horas, de ácido hialurónico que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

15 **Secuencias**

SEC. ID NO.: 1 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronano sintasa (HASA) que procede del virus *Chlorella PBCV-1*

ATGGGTAAGAACATCATTATTATGGTTTCTTGGTACACTATTATTACATCCAATCTCATCG
20 CAGTGGGTGGCGCCTCACTCATACTAGCCCCAGCTATTACGGGCTATGTCCTTCACTGGAA
CATTGCCCTTTCAACAATTTGGGGAGTGTCGGCCTACGGAATTTTCGTGTTTGGTTTCTTT
CTTGCCAGGTATTATTTAGTGAACCAACCGGAAAAGGCTCCGGAAGTGGATTTCCCTCC
GACCCAAAGGGTGAATGATGTTAGGTTGGCTGTAATTATTGCCGGCTACCGTGAGGACCC
GTATATGTTCCAAAAGTGTCTTGAAAGTGTGCGTGAAGTACTCAGACTATGGGAATGTAGCTAGA
25 CTAATATGCGTTATTGACGGCGATGAAGACGACGACATGAGGATGGCTGCAGTGTACAAGG

CTATCTATAACGACAACATCAAGAAACCTGAGTTTGTCTCTGTGAGAGTGACGATAAGGA
 GGGTGAGAGAATAGATAGCGATTTTCAGCCGTGATATCTGCGTGCTGCAACCGCATCGCGGA
 AAGCGTGAATGTTTGTACACAGGGTTCCAATTGGCAAAGATGGACCCCTCAGTTAATGCCG
 TCGTCCTAATCGACAGTGACACTGTGTTAGAAAAGGACGCGATTCTCGAaGTAGTATACCC
 5 GCTGGCATGCGATCCAGAAATACAGGCTGTAGCAGGCGAATGCAAAATATGGAATACTGAC
 AACTGTTGAGTTTGTGGTAGCCTGGCGATATTACAGCGCATTTTTCGCTAGAGCGTAGCG
 CCCAATCATTCTTCAGGACAGTACAATGCGTCGGAGGACCTCTCGGCGCCTACAAGATTGA
 TATAATTAAGGAAATCAAGGACCCATGGATCAGCCAACGTTTCCTTGGCCAAAAGTGCACA
 TACGGCGACGATAGACGACTCACTAATGAAATACTAATGAGGGGTAAGAAAGTAGTTTTCA
 10 CCCATTTCGCTGTTGGCTGGTCCGACAGCCCGACGAACGTCTTCCGTTACATTGTACAGCA
 AACACGGTGGTCCAAGTCGTGGTGTAGGGAGATATGGTATACACTGTTTGCAGCATGGAAG
 CATGGACTTTTCGGGCATTTGGCTCGCATTCGAGTGCTTATACCAGATTACTTATTTCTTCC
 TGGTGATTTACCTATTCTCCGTTTGGCTGTTGAGGCTGACCCACGGGCGCAAACGGCCAC
 CGTCATTGTTTCGACCACAGTTGCGCTTATTAAGTGCGGTTACTTTAGCTTCAGAGCTAAA
 15 GACATTAGGGCCTTCTATTTCTGTCTCTACACGTTTCGTTTACTTCTTCTGCATGATTCCGG
 CACGAATAACTGCGATGATGACCCTGTGGGACATAGGTTGGGGAACCAGGGGAGGAAATGA
 GAAGCCTTCCGTAGGCACCAGAGTTGCTTTGTGGGCCAAGCAATATTTGATTGCTTACATG
 TGGTGGGCCGCTGTCGTCGGTGTGGCGTGTACTCCATCGTTCATAATTGGATGTTTGACT
 GGAATTCACCTTTCCTACAGGTTTCGCACTGGTAGGCATCTGTTTCGTATATAGTTTTTCATTGT
 20 AATAGTGCTGGTAGTCTACTTTACAGGAAAGATCACGACCTGGAACCTTCACGAAGCTACAG
 AAAGAATTGATCGAGGACCGCGTACTGTACGACGCAACGACCAATGCCCAGTCGGTATAA
SEC. ID NO.: 2 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
 de hialuronano sintasa (HASA) que procede del virus de
Chlorella PBCV-1
 25 ATGGGCAAGAATATTATTATCATGGTCAGTTGGTATACCATTATTACATCAAACCTAATTG

CTGTCGGTGGAGCCTCACTAATCTTAGCTCCCGCGATTACGGGTTATGTGCTTCATTGGAA
 TATTGCTTTATCCACTATTTGGGGTGTTAGCGCTTACGGCATCTTTGTGTTCGGTTTCTTC
 TTGGCTCAGGTGTTATTCTCTGAGCTAAACAGAAAGAGACTCAGAAAGTGGATTTTCGCTGC
 GGCCGAAGGGATGGAACGATGTTTCGGTTAGCGGTGATCATTGCCGGTTATCGTGAAGATCC
 5 TTATATGTTTCAGAAAGTGTGTTGGAATCTGTTCGAGACTCAGACTACGGTAACGTTGCTAGG
 CTGATCTGCGTAATCGATGGAGACGAAGATGACGATATGAGAATGGCCGCGGTTTATAAAG
 CCATCTATAACGATAACATTAAGAAGCCAGAGTTTGTGTTTATGCGAATCGGATGACAAGGA
 GGGTGAGAGGATTGATTCTGACTTCTCGCGTGACATCTGTGTCCTGCAGCCCCACAGGGGA
 AAGCGAGAGTGCCTCTATACAGGATTCCAATTAGCTAAAATGGACCCAAGCGTTAATGCTG
 10 TCGTCCTTATCGATAGCGACACGGTGTTGGAAAAGGACGCAATATTGGAAGTAGTCTATCC
 ACTCGCTTGTGATCCAGAGATCCAGGCCGTGGCTGGCGAGTGCAAGATTTGGAATACAGAT
 ACGCTTCTGTCATTACTGGTGGCGTGGCGTTATTATTTCAGCATTCTGTGTGGAGAGGAGCG
 CACAATCGTTCTTTTCGGACTGTACAATGCGTAGGCCGGTCCACTAGGAGCATATAAAATTGA
 CATAATCAAAGAGATAAAAGATCCTTGGATTTTCGCAGAGATTCTTCGGTCAAAGGTGTACC
 15 TATGGGGACGACAGGCGGTTGACTAACGAGATTCTAATGAGAGGTAAGAAGGTGGTGTTC
 CTCCTTTTTCGGTAGGTTGGAGCGATTGCCCCACAAATGTATTTCAGATACATTGTTCAACA
 AACAAGGTGGTCGAAATCGTGGTGCCGAGAAATATGGTACACGTTGTTTCGCCGCATGGAAA
 CACGGCTTGTGCGGTATATGGCTCGCTTTTCGAGTGCCTTTATCAGATCACTTACTTCTTCC
 TGGTTATTTACTTGTTTTCAAGACTGGCAGTGGAAGCTGATCCAAGGGCTCAGACTGCTAC
 20 TGTCATCGTTTCAACAACAGTGGCGCTAATAAAGTGTGGTTACTTCAGCTTTCGCGCGAAG
 GACATAAGAGCGTTTTACTTTGTTCTTTATACCTTTGTATATTTCTTCTGTATGATCCCGG
 CCCGGATAACAGCTATGATGACATTATGGGACATTGGTTGGGGCACCAGGGGTGGGAATGA
 GAAGCCGTCCGTAGGAACGAGAGTAGCGCTGTGGGCCAAGCAGTATCTTATCGCATACATG
 TGGTGGGCAGCTGTCGTCGGGGCAGGTGTATACAGCATAGTACATAACTGGATGTTTGACT
 25 GGAAC TCACTCTCATATCGATTTCGATTGGTCGGGATCTGCTCTTACATCGTGTTTATTGT

TATAGTCTTAGTAGTATATTTCACTGGAAAGATAACAACATGGAATTTCACTAAGCTTCAA
AAGGAATTGATTGAAGACAGGGTGCTCTACGATGCGACAACTAATGCACAAAGCGTATAA

SEC. ID NO.: 3 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
de hialuronano sintasa (HASA) que procede de *Pasteurella*
5 *multocida*

ATGAACACCCTTTCCCAGGCAATTAAGGCTTATAATAGTAATGATTATCAACTAGCCCTCA
AGCTGTTGAAAAGTCGGCAGAAATCTACGGCAGAAAGATAGTTGAgTTCCAAATTACGAA
GTGCAAGGAGAACTTTCTGCGCACCCATCCGTTAACAGTGCGCATCTCTCGGTAAACAAA
GAAGAGAAGGTGAATGTTTGGCAGAGTCCATTAGACATAGCCACTCAATTATTGTTATCGA

10 ATGTGAAAAAACTCGTCCTTAGTGATAGCGAGAAAAATACACTAAAGAATAAATGGAAGTT
GTTGACTGAAAAGAAGTCTGAGAACGCAGAGGTCCGGGCCGTAGCTTTAGTTCCCAAGGAC
TTTCCGAAAGATTTAGTGCTTGCGCCGTTACCAGACCATGTGAACGATTTTACGTGGTATA
AGAAGCGGAAGAAACGCCTAGGAATCAAACCAGAACACCAACACGTTGGCCTCTCCATTAT
TGTGACAACGTTCAACCGTCCTGCCATCCTCAGCATCACCCCTGGCTTGCCTCGTCAATCAA

15 AAGACCCATTATCCTTTTGAGGTGATCGTGACCGACGATGGTTCTCAAGAGGATTTATCGC
CTATAATCCGTCAATATGAGAACAAGCTAGACATCCGTTATGTTCCGGCAAAAGGACAACGG
TTTTCAGGCATCGGCCGCACGTAATATGGGCCTACGTCTAGCCAAATATGACTTCATTGGG
CTCCTTGATTGTGATATGGCTCCCAACCCTTTGTGGGTACACTCATACGTTGCGGAACTAT
TAGAGGACGATGATTTGACCATAATAGGCCCCAGGAAGTACATTGACACGCAACACATAGA

20 TCCCAAGGATTTCTTAATAACGCCTCTCTGTTAGAGTCGTTGCCAGAGGTTAAGACCAAT
AATTCCGTGCGGGCTAAGGGCGAGGGGACCGTATCTTTAGACTGGCGTTTGGAAACAATTTG
AGAAGACCGAGAACTTGAGGCTATCCGATAGCCCTTTCCGATTCTTCGCAGCTGGGAATGT
GGCTTTGCCAAGAAGTGGCTTAACAAGTCAGGATTCTTCGACGAGGAATTCAATCACTGG
GGAGGTGAAGATGTAGAGTTCGGTTATCGTCTGTTTCGGTACGGTTCGTTCTTCAAAACTA

25 TAGACGGCATCATGGCCTATCATCAGGAACCGCCAGGTAAAGAAAACGAACTGACAGAGA

AGCGGGCAAGAACATTACCCTCGATATAATGAGGGAGAAGGTGCCTTACATCTACCGTAAA
 CTCCTGCCTATAGAAGACAGTCATATCAACCGAGTACCATTGGTATCAATTTACATCCCGG
 CCTACAACCTGTGCTAACTATATTCAAAGATGTGTTGATTGAGCTTTGAATCAAACGGTAGT
 TGATCTCGAAGTGTGCATTTGCAACGACGGTAGTACTGACAACACGCTGGAAGTTATTAAC
 5 AAGCTGTATGGTAATAATCCGCGTGTGCGTATAATGTCTAAACCCAATGGCGGCATTGCGA
 GTGCATCCAACGCAGCGGTCAGCTTCGCAAAGGGTTATTACATAGGACAGTTGGACAGCGA
 CGATTACTTAGAACCCGACGCAGTGGAGTTATGTCTCAAGGAATTTCTTAAGGATAAGACC
 CTTGCGTGCGTTTACACCACTAATCGTAACGTCAACCCAGATGGCTCTTTAATAGCCAATG
 GCTATAACTGGCCAGAGTTCAGTCGTGAGAAGTTGACTACGGCCATGATTGCTCATCACTT
 10 CCGGATGTTTACCATTTCGTGCTTGGCATCTGACGGATGGGTTCAATGAGAAGATTGAGAAC
 GCTGTTGACTACGACATGTTTCTCAAGCTCAGTGAAGTTGGTAAATTTAAGCATCTGAACA
 AAATATGTTATAATCGGGTGTTACACGGCGATAACACCTCAATCAAGAAgCTTGGCATACA
 AAAGAAGAATCATTTTCGTAGTTGTCAATCAGTCTCTAAACCGCCAAGGTATAACTTATTAT
 AACTACGATGAATTTGATGATCTCGATGAGAGTCGGAAATACATTTTCAACAAGACTGCAG
 15 AGTATCAAGAAGAGATAGATATTCTTAAAGATATTAAGATCATTCAGAACAAAGACGCCAA
 AATAGCTGTCTCCATTTTCTATCCGAACACTCTAAACGGGTTGGTGAAGAAGCTAAATAAT
 ATTATAGAGTATAATAAGAATATCTTCGTTATTGTACTTCATGTCGATAAGAATCACTTAA
 CCCCAGACATCAAGAAGGAGATATTAGCCTTCTACCATAAGCATCAGGTGAACATCTTATT
 GAACAATGACATCTCCTACTATACATCAAATCGTCTGATTAAGACAGAAGCCCATTTGAGT
 20 AACATTAACAAGCTaAGTCAATTAAATCTTAACTGCGAATACATTATATTCGACAATCACG
 ATTCCTTATTTGTGAAGAACGATTCCATGCATACATGAAGAAGTATGATGTTGGAATGAA
 CTTCTCTGCATTGACTCATGATTGGATTGAAAAGATAAACGCTCACCCGCCATTTAAGAAG
 CTgATCAAACTTACTTCAATGACAATGATCTTAAGTCGATGAATGTAAAGGGTGCCTCCC
 AGGGAATGTTTATGACATACGCATTAGCCACGAGTTATTGACGATCATCAAGGAGGTGAT
 25 AACCTCTTGTCAATCCATTGACTCCGTCCCCGAATACAACACAGAAGATATTTGGTTTCAG

TTTGCAC TTTTAATTCTGGAAAAGAAGACCGGCCACGTATTCAACAAGACAAGCACTCTCA
CGTATATGCCATGGGAACGTAAACTGCAGTGGACGAATGAACAAATAGAGTCCGCAAAGAG
GGGCGAAAACATTCCGGTAAACAAGTTCATCATTAACAGCATTACCCTTTAA

SEC. ID NO.: 4 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
5 de hialuronano sintasa (HASA) que procede de *Pasteurella*
multocida

ATGAACACCCTTTCCCAGGCAATTAAGGCTTATAATAGTAATGATTATCAACTAGCCCTCA
AGCTGTTTCGAAAAGTCGGCAGAAATCTACGGCAGAAAGATAGTTGAgTTCCAAATTACGAA
GTGCAAGGAGAAACTTTCTGCGCACCCATCCGTTAACAGTGCGCATCTCTCGGTAAACAAA
10 GAAGAGAAGGTGAATGTTTTCGACAGTCCATTAGACATAGCCACTCAATTATTGTTATCGA
ATGTGAAAAAACTCGTCCTTAGTGATAGCGAGAAAAATACACTAAAGAATAAATGGAAGTT
GTTGACTGAAAAGAAGTCTGAGAACGCAGAGGTCCGGGCCGTAGCTTTAGTTCCCAAGGAC
TTTCCGAAAGATTTAGTGCTTGCGCCGTTACCAGACCATGTGAACGATTTTACGTGGTATA
AGAAGCGGAAGAAACGCCTAGGAATCAAACCAGAACACCAACACGTTGGCCTCTCCATTAT
15 TGTGACAACGTTCAACCGTCCTGCCATCCTCAGCATCACCTGGCTTGCCTCGTCAATCAA
AAGACCCATTATCCTTTTGAGGTGATCGTGACCGACGATGGTTCTCAAGAGGATTTATCGC
CTATAATCCGTCAATATGAGAACAAGCTAGACATCCGTTATGTTTCGGCAAAGGACAACGG
TTTTTCAGGCATCGGCCGCACGTAATATGGGCCTACGTCTAGCCAAATATGACTTCATTGGG
CTCCTTGATTGTGATATGGCTCCCAACCCTTTGTGGGTACACTCATACGTTGCGGAACTAT
20 TAGAGGACGATGATTTGACCATAATAGGCCCCAGGAAGTACATTGACACGCAACACATAGA
TCCCAAGGATTTCTTAATAACGCCTCTCTGTTAGAGTCGTTGCCAGAGGTTAAGACCAAT
AATTCGTCGCGGCTAAGGGCGAGGGGACCGTATCTTTAGACTGGCGTTTGAACAATTTG
AGAAGACCGAGAACTTGAGGCTATCCGATAGCCCTTTCCGATTCTTCGCAGCTGGGAATGT
GGCTTTTCGCCAAGAAGTGGCTTAACAAGTCAGGATTCTTCGACGAGGAATTCAATCACTGG
25 GGAGGTGAAGATGTAGAGTTCGGTTATCGTCTGTTTCGGTACGGTTCGTTCTTCAAAACTA

TAGACGGCATCATGGCCTATCATCAGGAACCGCCAGGTAAAGAAAACGAACTGACAGAGA
 AGCGGGCAAGAACATTACCCTCGATATAATGAGGGAGAAGGTGCCTTACATCTACCGTAAA
 CTCCTGCCTATAGAAGACAGTCATATCAACCGAGTACCATTGGTATCAATTTACATCCCGG
 CCTACAACCTGTGCTAACTATATTCAAAGATGTGTTGATTGAGCTTTGAATCAAACGGTAGT
 5 TGATCTCGAAGTGTGCATTTGCAACGACGGTAGTACTGACAACACGCTGGAAGTTATTAAC
 AAGCTGTATGGTAATAATCCGCGTGTGCGTATAATGTCTAAACCCAATGGCGGCATTGCGA
 GTGCATCCAACGCAGCGGTCAGCTTCGCAAAGGGTTATTACATAGGACAGTTGGACAGCGA
 CGATTACTTAGAACCCGACGCAGTGGAGTTATGTCTCAAGGAATTTCTTAAGGATAAGACC
 CTTGCGTGCCTTTACACCACTAATCGTAACGTCAACCCAGATGGCTCTTTAATAGCCAATG
 10 GCTATAACTGGCCAGAGTTCAGTCGTGAGAAGTTGACTACGGCCATGATTGCTCATCACTT
 CCGGATGTTTACCATTTCGTGCTTGGCATCTGACGGATGGGTTCAATGAGAAGATTGAGAAC
 GCTGTTGACTACGACATGTTTCTCAAGCTCAGTGAAGTTGGTAAATTTAAGCATCTGAACA
 AAATATGTTATAATCGGGTGTTACACGGCGATAACACCTCAATCAAGAAgCTTGGCATACA
 AAAGAAGAATCATTTTCGTAGTTGTCAATCAGTCTCTAAACCGCCAAGGTATAACTTATTAT
 15 AACTACGATGAATTTGATGATCTCGATGAGAGTCGGAAATACATTTTCAACAAGACTGCAG
 AGTATCAAGAAGAGATAGATATTCTTAAAGATATTTAA

SEC. ID NO.: 5 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
 de hialuronano sintasa (HASA) que procede de *Pasteurella*
multocida

20 ATGAACACCCTTTCCCAGGCAATTAAGGCTTATAATAGTAATGATTATCAACTAGCCCTCA
 AGCTGTTTCGAAAAGTCGGCAGAAATCTACGGCAGAAAGATAGTTGAgTTCCAAATTACGAA
 GTGCAAGGAGAACTTTCTGCGCACCCATCCGTTAACAGTGCGCATCTCTCGGTAAACAAA
 GAAGAGAAGGTGAATGTTTTCGACAGTCCATTAGACATAGCCACTCAATTATTGTTATCGA
 ATGTGAAAAAACTCGTCCTTAGTGATAGCGAGAAAAATACACTAAAGAATAAATGGAAGTT
 25 GTTGACTGAAAAGAAGTCTGAGAACGCAGAGGTCCGGGCCGTAGCTTTAGTTCCCAAGGAC

TTTCCGAAAGATTTAGTGCTTGCGCCGTTACCAGACCATGTGAACGATTTTACGTGGTATA
 AGAAGCGGAAGAAACGCCTAGGAATCAAACCAGAACACCAACACGTTGGCCTCTCCATTAT
 TGTGACAACGTTCAACCGTCCTGCCATCCTCAGCATCACCTGGCTTGCCTCGTCAATCAA
 AAGACCCATTATCCTTTTGAGGTGATCGTGACCGACGATGGTTCTCAAGAGGATTTATCGC
 5 CTATAATCCGTCAATATGAGAACAAGCTAGACATCCGTTATGTTTCGGCAAAAGGACAACGG
 TTTTCAGGCATCGGCCGCACGTAATATGGGCCTACGTCTAGCCAAATATGACTTCATTGGG
 CTCCTTGATTGTGATATGGCTCCCAACCCTTTGTGGGTACACTCATACGTTGCGGAACTAT
 TAGAGGACGATGATTTGACCATAATAGGCCCCAGGAAGTACATTGACACGCAACACATAGA
 TCCCAAGGATTTCTTAATAACGCCTCTCTGTTAGAGTCGTTGCCAGAGGTTAAGACCAAT
 10 AATTCGTCGCGGCTAAGGGCGAGGGGACCGTATCTTTAGACTGGCGTTTGAACAATTTG
 AGAAGACCGAGAACTTGAGGCTATCCGATAGCCCTTTCCGATTCTTCGCAGCTGGGAATGT
 GGCTTTGCGCAAGAAGTGGCTTAACAAGTCAGGATTCTTCGACGAGGAATTCAATCACTGG
 GGAGGTGAAGATGTAGAGTTCGGTTATCGTCTGTTTCGGTACGGTTCGTTCTTCAAACTA
 TAGACGGCATCATGGCCTATCATCAGGAACCGCCAGGTAAAGAAAACGAACTGACAGAGA
 15 AGCGGGCAAGAACATTACCCTCGATATAATGAGGGAGAAGGTGCCTTACATCTACCGTAAA
 CTCCTGCCTATAGAAGACAGTCATATCAACCGAGTACCATTGGTATCAATTTACATCCCGG
 CCTACAACCTGTGCTAACTATATTCAAAGATGTGTTGATTGAGCTTTGAATCAAACGGTAGT
 TGATCTCGAAGTGTGCATTTGCAACGACGGTAGTACTGACAACACGCTGGAAGTTATTAAC
 AAGCTGTATGGTAATAATCCGCGTGTGCGTATAATGTCTAAACCCAATGGCGGCATTGCGA
 20 GTGCATCCAACGCAGCGGTCAGCTTCGCAAAGGGTTATTACATAGGACAGTTGGACAGCGA
 CGATTACTTAGAACCCGACGCAGTGGAGTTATGTCTCAAGGAATTTCTTAAGGATAAGACC
 CTTGCGTGCGTTTACACCACTAATCGTAACGTCAACCCAGATGGCTCTTTAATAGCCAATG
 GCTATAACTGGCCAGAGTTCAGTCGTGAGAAGTTGACTACGGCCATGATTGCTCATCACTT
 CCGGATGTTTACCATTTCGTGCTTGGCATCTGACGGATGGGTTCAATGAGAAGATTGAGAAC
 25 GCTGTTGACTACGACATGTTTCTCAAGCTCAGTGAAGTTGGTAAATTTAAGCATCTGAACA

AAATATGTTATAATCGGGTGTTACACGGCGATAACACCTCAATCAAGAAGCTTGGCATACA
 AAAGAAGAATCATTTTCGTAGTTGTCAATCAGTCTCTAAACCGCCAAGGTATAACTTATTAT
 AACTACGATGAATTTGATGATCTCGATGAGAGTCGGAAATACATTTTCAACAAGACTGCAG
 AGTATCAAGAAGAGATAGATATTCTTAAAGATATTGGATCCGCCATTTCTCAAATCACTGA
 5 CGGTCAAATCCAAGCTACTACCACTGCTACCACCGAAGCTACCACCACTGCTGCCCCATCT
 TCCACCGTTGAAACTGTTTCTCCATCCAGCACCGAACTATCTCTCAACAACTGAAAATG
 GTGCTGCTAAGGCCGCTGTCGGTATGGGTGCCGGTGCTCTAGCTGCTGCTGCTATGTTGTT
 ATAA

SEC. ID NO.: 6 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
 10 de hialuronano sintasa (HASA) que procede de *Xenopus laevis*
 ATGCACTGTGAACGATTTATTTGTATATTACGAATAATTGGTACGACTTTGTTCCGGAGTAA
 GTCTGCTACTAGGGATATCCGCCGCTTATATCGTGGGATACCAATTCATTCAGACGGATAA
 TTACTIONTTTCTTCGGTCTCTACGGTGCTATTTTAGCTTTACATTTAATCATTTCAGTCT
 CTCTTCGCATTCTGGAGCATCGTAAGATGAAGCGGTCACTTGAAACCCCTATAAAATTAA
 15 ACAAGAGCGTAGCATTGTGTATCGCTGCATACCAGGAAGACGAAGATTATCTTAGAAAATG
 TTTGCTTTCTGTGAAACGGCTCACATACCCCGGTATGAAGGTAATCATGGTGATAGATGGT
 AACTCTGATGACGATCTATACATGATGAACATATTCAGAGAGATCATGGGAAATGATAGCT
 GCGCCACCTATGTATGGAAGAATAATTTTCACATGAAGGGACCAAACGAGACCGACGAGAC
 TCACCGCGAGTCCATGCAGCATGTAACACAGATGGTGCTTTCTAACAGAAATGTCTGTATC
 20 ATGCAAAAGTGGAACGGGAAACGCGAGGTGATGTATACTGCATTCAAAGCGCTGGGTCCGT
 CGGTTGATTACGTCCAAGTGTGCGACTCAGATACAGTCCTTGATCCAGCAAGCTCGGTGGA
 GATGGTCAAGGTGTTGGAGGAAGACATTATGGTCGGAGGTGTAGGCGGAGACGTGCAGATA
 CTCAATAAGTACGACTCCTGGATCAGTTTCTTGAGTTCGGTTCGTTATTGGATGGCTTTCA
 ATATAGAACGAGCATGCCAATCATACTTTGGCTGTGTGCAGTGTATATCGGGGCCTCTGGG
 25 CATGTACAGAACTCACTCTTACATGAGTTCATTGAAGACTGGTACAATCAAGAATTCCTC

GGTTCCCAATGCTCTTTCGGTGATGATCGGCATTTGACTAATCGAGTACTATCATTGGGCT
 ATGCTACTAAATACACTGCGCGCAGTAAGTGTCTGACAGAAACCCCCACAGAATATCTTAG
 ATGGTTGAACCAACAAACCAGGTGGAGTAAGTCCTATTTCCGCGAGTGGTTGTACAACTCT
 TTGTGGTTCCACAAACACCATTTATGGATGACTTATGAAGCCGTAATTACGGGTTTCTTCC
 5 CCTTCTTCTTAATAGCGACGGTGATTCAGCTCTTCTATCGTGGTCGAATTTGGAATATCTT
 ACTCTTTCTACTCACAGTTCAATTAGTTGGTCTAATAAAGTCGTCGTTTGCAAGTGC GTTG
 CGTGGAACATCGTTATGGTCTTTATGAGTTTCTACAGTGTTTTATACATGAGTAGCTTGC
 TGCCAGCAAAGATGTTTGCAATCGCCACGATAAACAAGGCTGGATGGGGTACTAGTGGTAG
 AAAGACCATAGTTGTTAATTTTATTGGTTTAATCCCTATTACGGTATGGTTCACAATTTTA
 10 CTAGGGGGAGTATGCTACACTATATGGCGGGAAACCAAGAAGCCGTTTAGCGAGTCTGAGA
 AGATCGTTCTTGCGGTCGGTGCTATATTGTATGCTTGTTATTGGGTCATGTTGCTTACAAT
 GTATGTCAGTCTTGTCATGAAGTGCGGGCGCCGTAGGAAGGAACCACAGCACGACCTTGTT
 TTAGCATAA

SEC. ID NO.: 7 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
 15 de hialuronano sintasa (HASA) que procede de *Streptococcus*
zooepidemicus

ATGAGGACGTAAAGAATCTTATCACTGTTGTAGCGTTCAGTATATTCTGGGTTTTGCTGA
 TCTATGTAAATGTCTATCTTTTCGGTGCGAAGGGGTCTCTATCAATATATGGATTCTTGCT
 AATTGCGTATTTGCTTGTTGAAGATGAGTCTTTCATTCTTCTATAAACCATTCAAAGGTCGA
 20 GCTGGTCAGTATAAAGTCGCAGCGATTATCCCTTCATACAACGAGGATGCAGAATCGCTGT
 TGGAACCTTAAAATCTGTTCAACAACAAACCTATCCCCTTGCTGAAATTTATGTAGTTGA
 TGATGGTTCCGCAGATGAAACCGGTATCAAGCGGATCGAGGATTATGTCAGGGATACAGGC
 GACTTAAGTTCAAATGTGATTGTGCATCGATCAGAAAAGAATCAAGGCAAGAGACACGCCC
 AAGCATGGGCATTTGAAAGATCTGATGCAGATGTATTTCTAACAGTCGATAGTGATACTTA
 25 CATTTATCCGGACGCCCTTGAAGAGTTATTGAAAACCTTCAATGATCCGACAGTATTTGCC

GCAACTGGCCACTTGAACGTTTCGTAACAGGCAGACTAATCTATTGACCAGACTCACTGATA
 TAAGATACGACAATGCTTTTGGCGTCGAACGTGCTGCTCAAAGTGTAAGTGGTAATATACT
 GGTGTGTTCCGGGCCACTGTCCGTCTATCGCAGAGAAGTAGTAGTCCCGAACATTGACAGG
 TATATTAATCAGACTTTTCTGGGTATCCCCGTGTCAATTGGGGACGACCGGTGTTTAACGA
 5 ACTACGCTACTGATTTGGGCAAGACTGTATATCAGTCGACGGCTAAATGTATTACAGACGT
 CCCAGATAAGATGTCGACTTACCTTAAACAGCAGAATAGATGGAATAAGTCATTCTTTAGA
 GAATCTATCATCAGCGTGAAGAAGATCATGAATAATCCATTTCGTGGCGCTTTGGACCATT
 TGGAGGTTTCCATGTTTATGATGCTTGTCTACTCTGTCGTTGATTTCTTTGTAGGTAACGT
 TCGAGAATTTGATTGGCTCAGAGTTCTTGCTTTCTTAGTTATCATCTTCATCGTTGCGCTA
 10 TGCAGGAATATTCATTACATGCTAAAACATCCGCTTAGCTTCTTACTCAGCCCTTTCTACG
 GCGTTTTGCATCTCTTCGTTTTGCAGCCATTGAAGCTCTACTCCTTATTTACCATTGAAA
 CGCTGATTGGGGTACGCGCAAGAACTATTAtaa

SEC. ID NO.: 8 es una secuencia de aminoácido de hialuronano sintasa (HASA) que procede de *Chlorella virus PBCV-1*

15 MGKNIIIMVSWYTIITSNLIAVGGASLILAPAITGYVLHWNIALSTIWGVSAYGIFVFGFF
 LAQVLFSELNRKRLRKWISLRPKGWNVRLAVIIAGYREDPYMFQKCLESVRDSYGNVAR
 LICVIDGDEDDMRMAAVYKAIYNDNIKKPEFVLCESDDKEGERIDSDFSRDICVLQPHRG
 KRECLYTGFQLAKMDPSVNAVVLIDSDTVLEKDAILEVVYPLACDPEIQAVAGECKIWNTD
 TLLSLLVAWRYSAFCVERSAQSFFRTVQCVGGPLGAYKIDIKEIKDPWISQRFLGQKCT
 20 YGDDRRLTNEILMRGKKVVFTPFAVGWSDSPTNVFRYIVQQTRWSKSWCREIWYTLFAAWK
 HGLSGIWLAFECLYQITYFFLVIYLF SRLAVEADPRAQTATVIVSTTVALIKCGYFSFRAK
 DIRAFYFVLYTFVYFFCMIPARITAMMTLWDIGWGTRGGNEKPSVGTRVALWAKQYLIAYM
 WWAAVVGAGVYSIVHNWMDWNSLSYRFALVGICSYIVFIVIVLVVYFTGKITTWNFTKLQ
 KELIEDRVLYDATTNAQSV

25 **SEC. ID NO.: 9** es una secuencia de aminoácido de hialuronano

sintasa (HASA) que procede de *Pasteurella multocida*

MNTLSQAIKAYNSNDYQLALKLFEKSAEIYGRKIVEFQITKCKEKLSAHPSVNSAHLNVNK
 EEKVNVCDSPLDIATQLLLSNVKKLVLSNSEKNTLKNKWKLLTEKKSENAEVRVALVPKD
 FPKDLVLAPLPDHVNDFTWYKKRKKRLGIKPEHQHVGLSIIVTTFNRPAILSITLACLVNQ
 5 KTHYPFEVIVTDDGSQEDLSPIIRQYENKLDIRYVRQKDNGFQASAARNMGLRLAKYDFIG
 LLDICMAPNPLWVHSYVAELLEDDDLTIIGPRKYIDTQHIDPKDFLNNASLLESLEVKTN
 NSVAAKGEGTVSLDWRLEQFEKTENLRLSDSPFRFFAAGNVAFAKKWLNKSGFFDEEFNHW
 GGEDVEFGYRLFRYGSFFKTIDGIMAYHQEPPGKENETDREAGKNITLDIMREKVPYIYRK
 LLPIEDSHINRVPLVSIYIPAYNCANYIQRCVDSALNQTVVDLEVCICNDGSTDNLTLEVIN
 10 KLYGNNPRVRIMSKPNGGIASASNAAVSFAKGYIGQLDSDDYLEPDAVELCLKEFLKDKT
 LACVYTTNRNVNPDGSLIANGYNWPEFSREKLTTAMIAHHFRMFTIRAWHLTDGFNEKIEN
 AVDYDMFLKLSEVGKFKHLNKICYNRVLHGDNTSIKKLGIQKKNHFVVVNQSLNRQGITYY
 NYDEFDDLDESKEYIFNKTAEYQEEIDILKDIKIIQNKDAKIAVSIFYPNTLNGLVKKLNN
 IIEYNKNIFVIVLHVDKNHLTPDIKKEILAFYHKHQVNILLNNDISYYTSNRLIKTEAHL
 15 NINKLSQLNLNCEYIIFDNHDSL FVKND SYAYMKKYDVGMNFSAL THDWIEKINAHPPFKK
 LIKTYFNDNDLKSMNVKGASQGMFMTYALAHELLTIIKEVITSCQSIDSVPYNTEDIWFQ
 FALLILEKKTGHVFNKTSTLTYPWERKLQWTNEQIESAKRGENIPVNKFIINSITL

SEC. ID NO.: 10 es una secuencia de aminoácido de hialuronano
 sintasa (HASA) que procede de *Xenopus laevis*

20 MHCERFICILRIIGTTLFGVSLLLGISAAAYIVGYQFIQTDNYYFSFGLYGAILALHLIIQS
 LFAFLEHRKMKRSLETPIKLNKSVALCIAAYQEDEDYLRKCLLSVKRLTYPGMKVIMVIDG
 NSDDDL YMMNIFREIMGNDSCATYVWKNFHMKGPNETDETHRESMQHVTQMVLSNRNVCI
 MQKWNGKREVMTAFKALGRSVDYVQVCDSDTVLDPASSVEMVKVLEEDIMVGGVGGDVQI
 LNKYDSWISFLSSVRYWMAFNIERACQSYFGCVQCISGPLGMYRNSLLHEFIEDWYNQEFL
 25 GSQCSFGDDRHLTNRVLSLGYATKYTARSKCLTETPTEYLRWLNQQTRWSKSYFREWLNS

LWFHKHHLWMTYEAVITGFFPFLLIATVIQLFYRGRIWNILLFLLTVQLVGLIKSSFASAL
 RGNIVMVFMSFYSVLYMSSLLPAKMFAIATINKAGWGTSGRKTIVVNFGLIPITVWFTIL
 LGGVCYTIWRETKKPFSESEKIVLAVGAILYACYWMLLTMYVSLVMKCGRRRKEPQHDLV
 LA

- 5 **SEC. ID NO.: 11** es una secuencia de aminoácido de hialuronano sintasa (HASA) que procede de *Streptococcus zooepidemicus*

MRTLKNLITVVAFSIFWVLLIYVNVYLFgakgsLSIYGfLLIAYLLVKMSLSFFYKPFKGR
 AGQYKVAAIIPSYNEDAESLLETlKSVQQqTYPLAEIYVDDGSADETGIKRIEDYVRDTG
 DLSSNVIVHRSEKNQGRHAQAWAFERSDADVFLTVDSDTYIYPDALEELLKTFNDPTVFA
 10 ATGHLNVRNRQTNLLTRLTDIRYDNAFGVERAAQSVTGNILVCSGPLSVYRREVVVPNIDR
 YINQTFLGIPVSIgDDRCLTNYATDLGKTVYQSTAKCITDVPDKMSTYLKQQRWNKSFFR
 ESIISVKKIMNPNPFVALWTILEVSMFMMLVYSVVDFVGNVREFDWLRVLAFLVIIFIVAL
 CRNIHYMLKHPLSFLLSPFYGVLHLFVLQPLKLYSLFTIRNADWGTRKKLL

- SEC. ID NO.: 12** es una secuencia de ácido nucleico de UDP-
 15 Glucosa deshidrogenasa (HASB) que procede de *Arabidopsis thaliana*

ATGGTCAAAATATGCTGTATCGGGGCTGGATATGTCGGTGGGCCTACAATGGCCGTTATGG
 CCCTAAAGTGTCCAGAGATTGAAGTCGTGGTAGTTGATATATCGGAGCCACGAATTAACGC
 ATGGAACCTCAGACCGTCTACCAATTTATGAGCCAGGGTTAGAGGATGTCGTCAAACAGTGT
 20 AGAGGGAAGAATTTGTTCTTCTCTACAGATGTAGAGAAGCATGTATTTGAGTCAGATATAG
 TGTTTGTTCGGTAAACACTCCTACGAAAACGCAGGGTCTGGGTGCAGGTAAAGCAGCAGA
 TTTGACATATTGGGAGTCCGCTGCTCGCATGATAGCTGATGTGAGCAAATCGTCGAAAATC
 GTCGTTGAAAAGAGTACAGTACCAGTTCGTACAGCCGAGGCTATAGAAAAGATTTTAACGC
 ACAATTCTGAAGGGTATCGAATTCCAGATCTTATCAAATCCAGAATTCTTGGCCGAAGGGAC
 25 GGCGATTAAAGACTTATATAACCCTGATAGAGTTCTAATCGGTGGCAGGGACACCGCTGCG

GGACAAAAGGCCATTAAGGCGTTGCGTGACGTGTATGCCCACTGGGTTCTGTGAGCAAA
 TAATCTGTACTAATTTATGGAGTGCCGAGCTATCAAAGTTGGCTGCGAACGCATTTCTAGC
 TCAAAGGATAAGTTCAGTAAACGCAATGTCAGCGCTTTGTGAGGCAACTGGTGCTGACGTA
 ACCCAAGTCGCTCACGCCGTTGGAACCGACACTAGAATTGGACCGAAGTTTCTTAACGCAT
 5 CCGTAGGCTTCGGCGGATCTTGCTTTCAGAAAGACATCCTGAATCTTATTTACATCTGCGA
 ATGCAATGGTCTTCCAGAAGCAGCCAATTATTGGAAACAGGTAGTCAAGGTAAATGACTAC
 CAAAAGATTAGGTTTGCTAATCGAGTCGTATCTTCTATGTTCAACACCGTCTCCGGTAAGA
 AAATTGCTATTTTGGGATTTGCGTTCAAGAAGGACACCGGCGACACGCGTGAAACTCCTGC
 CATAGATGTGTGTAATCGCCTCGTGGCTGATAAAGCAAAGCTGTCGATCTATGATCCGCAA
 10 GTATTAGAAGAGCAGATCCGCCGTGATCTGTCCATGGCCCGATTTCGATTGGGACCATCCAG
 TCCCACTCCAGCAGATCAAAGCTGAAGGTATCTCCGAACAGGTTAACGTTGTGTCCGACGC
 CTACGAGGCTACGAAGGATGCTCATGGTTTATGTGTTTTAACCGAATGGGACGAATTCAAG
 TCACTTGATTTTAAGAAGATCTTTGATAATATGCAGAAACCCGCTTTCGTTTTTCGACGGAA
 GAAACGTGGTCGACGCTGTGAAATTGAGAGAAATTGGATTCATAGTATATTCCATAGGTAA
 15 ACCTCTGGATAGTTGGCTCAAGGATATGCCGGCTGTTGCATAA

SEC. ID NO.: 13 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
 de UDP-Glucosa deshidrogenasa (HASB) que procede del virus
Chlorella PBCV-1

ATGAGTAGAATTGCTGTCGTTGGATGCGGTTACGTGGGTACGGCCTGCGCCGTACTTTTGG
 20 CGCAGAAGAACGAAGTTATCGTTTTGGATATCTCGGAGGACCGGGTACAACCTGATTAAGAA
 TAAGAAGTCACCTATAGAAGATAAGGAAATCGAAGAATTCCTGGAGACGAAAGATTTGAAT
 CTAACAGCGACGACGGATAAGGTGCTCGCCTATGAGAATGCTGAATTCGTTATAATAGCTA
 CACCGACCGATTACGATGTCGTCACTAGATATTTCAACACTAAGTCTGTTGAAAATGTGAT
 AGGCGATGTCATTAAGAACACTCAGACACACCCTACTATAGTGATCAAGAGTACTATTCCA
 25 ATCGGTTTCGTGGATAAAGTTAGAGAACAGTTCGATTATCAAATATTATCTTCTCGCCGG

AATTCTTGAGAGAAGGACGAGCATTATATGATAATCTTTACCCCTCCCGTATCATCGTCGG
 TGATGACTCCCCAATTGCCTTAAAATTTCGCGAATCTCTTGGTCGAGGGTAGCAAACTCCA
 CTAGCTCCCGTATTA ACTATGGGTACGCGAGAGGCCGAAGCTGTAAACTATTTTCAAATA
 CATATTTGGCTATGAGAGTAGCATACTTCAATGAGCTAGACACATTTGCAATGTCCCATGG
 5 TATGAACGCAAAAGAGATTATCGACGGAGTCACACTAGAACCAAGGATAGGGCAGGGTTAT
 TCGAATCCTTCATTTGGGTATGGAGCCTATTGTTTCCCAAAAGATACAAAGCAATTGTTGG
 CTAATTTTGAAGGGGTTCCACAAGATATTATTGGCGCAATCGTAGAGTCTAACGAACTAG
 AAAGGAGGTTATTGTTTCTGAGGTCGAGAACAGATTTCCGACCACAGTTGGCGTATATAAG
 TTGGCTGCTAAAGCTGGTTCGGATAATTTTCAGGTCTAGTGCGATAGTCGATATCATGGAAA
 10 GGTTGGCTAATAAGGGCTACCACATCAAAATATTTGAACCTACCGTTGAACAATTTGAGAA
 TTTTGAGGTAGATAATAATCTCACAACTTTTGCAACCGAGTCTGATGTAATAATTGCGAAC
 AGAGTTCCAGTCGAACATCGCATTCTGTTTGGGAAGAAGTTAATAACACGGGATGTCTATG
 GGGATAA

SEC. ID NO.: 14 es una secuencia de ácido nucleico de UDP-
 15 Glucosa deshidrogenasa (HASB) que procede del virus *Chlorella*
PBCV-1

ATGTCACGAATCGCAGTAGTTGGCTGTGGGTACGTGGGAACCGCATGCGCTGTACTGCTGG
 CGCAAAAGAATGAGGTAATCGTTCTTGATATTAGTGAGGATAGGGTCCA ACTAATCAAGAA
 CAAGAAATCCCCGATCGAAGATAAGGAGATTGAAGAATTCTTGAAACAAAAGACCTAAAC
 20 TTAAGTGAACA ACTGACAAAGTTTTAGCCTACGAAAACGCTGAGTTTGTGATTATAGCGA
 CACCCACAGATTATGACGTAGTTACCAGATACTTTAACACGAAGTCCGTAGAGAACGTCAT
 TGGAGATGTTATAAAGAATACTCAGACTCATCCTACGATAGTAATAAAGTCAACCATTTCCC
 ATAGGTTTTCGTAGATAAGGTTAGGGAGCAATTCGATTACCAGAACATTATATTTTCGCCAG
 AATTTCTGAGAGAGGGTCGCGCCCTGTATGATAATCTATATCCATCACGGATTATAGTGGG
 25 CGATGACTCTCCGATTGCACTTAAGTTTGCTAATCTTTTAGTTGAGGGCTCCAAACTCCG

CTCGCCCCAGTACTTACGATGGGTACACGTGAGGCTGAAGCTGTCAAGCTGTTTTCAAACA
 CATACCTTGCTATGCGAGTCGCATACTTTAACGAACTAGATACCTTTGCTATGTCGCACGG
 TATGAATGCTAAAGAAATCATAGATGGCGTAACGTTGGAGCCTCGGATAGGTCAAGGATAT
 TCCAATCCATCTTTTGGCTACGGTGCGTATTGTTTTCCCAAAGGACACGAAGCAATTATTAG
 5 CTAACCTTTGAGGGTGTTCCGCAAGATATAATTGGGGCGATAGTAGAAAGCAATGAAACACG
 GAAGGAGGTAATCGTGAGTGAAGTGGAACCGATTCCCCACTACGGTCGGCGTTTACAAA
 TTAGCCGCCAAGGCTGGTTCCGACAATTTCCGATCCAGCGCAATAGTAGATATTATGGAAA
 GATTAGCTAATAAGGGATACCACATTAATAATCTTTGAACCTACTGTCGAACAGTTTCGAGAA
 CTTTCGAGGTTGATAATAACTTGACGACTTTTCGCAACGGAGAGCGATGTAATTATTGCAAAC
 10 CGCGTACCTGTGGAACATCGAATTTTGTTCGGAAAGAAGCTGATTACACGCGATGTATATG
 GCGATAACTAA

SEC. ID NO.: 15 es una secuencia de ácido nucleico de UDP-
 Glucosa deshidrogenasa (HASB) que procede de *Streptococcus*
zooepidemicus

15 ATGAAGATATCGGTAGCGGGTTCGGGGTACGTGGGGTTATCCTTGTCAATCTTGCTTGCCC
 AACATAACGATGTGACTGTTGTAGATATAATCGACGAAAAGGTACGGCTAATTAACCAGGG
 CATATCTCCGATTAAGGATGCGGACATTGAGGAATATCTGAAGAATGCACCGTTGAATCTT
 ACGGCTACACTAGACGGAGCTTCGGCTTATAGTAATGCTGATCTGATTATAATCGCAACGC
 CAACTAATTACGATTCAGAACGCAATTATTTTCGACACCAGACACGTTGAAGAAGTAATTGA
 20 GCAAGTATTGGATTTAAATGCCTCCGCTACTATAATCATCAAGAGTACCATACCCTTGGGT
 TTTATTAAACACGTAAGAGAGAAATACCAAACAGACAGAATCATCTTTTCTCCAGAGTTCT
 TAAGAGAGTCAAAGGCATTGTACGATAACTTATACCCCTCTCGTATAATAGTCAGTTATGA
 GAAGGATGACTCTCCAAGAGTTATACAAGCAGCTAAGGCGTTTCGCGGGTTTATTAAAAGAG
 GGGGCAAAGAGCAAGGATACCCAGTTCTGTTTATGGGCTCTCAAGAAGCTGAAGCTGTCA
 25 AGCTGTTTGCTAATACTTTTCTCGCCATGAGGGTCAGTTACTTCAACGAGCTTGACACTTA

TAGCGAATCAAAAGGACTAGACGCCCAAAGAGTTATAGAAGGCGTCTGCCATGATCAAAGG
 ATAGGTAATCATTACAATAATCCATCCTTCGGATATGGCGGTTATTGTTTACCCAAAGACT
 CAAAGCAACTTTTGGCTAATTATAGAGGCATACCTCAGTCTCTAATGTCTGCCATCGTTGA
 ATCGAACAAGATCCGTAAGTCGTATTTAGCTGAACAAATATTAGATAGGGCTTCTTCACAA
 5 AAGCAGGCTGGTGTACCTTTAACCATAGGATTTTACCGTTTGATTATGAAGTCCAACTCCG
 ATAACCTTTAGAGAATCAGCCATTAAAGATATTATTGACATCATTAACTGACTACGGTGTCAA
 TATTGTCATTTATGAACCTATGTTGGGAGAAGACATTGGTTATAGAGTCGTTAAAGATTTG
 GAACAGTTTAAGAACGAAAGTACAATTATTGTTAGTAACAGGTTTGAAGATGATTTAGGTG
 ATGTTATTGATAAAGTTTATACACGTGACGTCTTTGGTAG

- 10 **SEC. ID NO.: 16** es una secuencia de aminoácido de UDP-Glucosa
 deshidrogenasa (HASB) que procede de *Arabidopsis thaliana*

MVKICCIAGAGYVGGPTMAVMALKCPEIEVVVDISEPRINAWNSDRLPIYEPGLEDVVKQC
 RGKNLFFSTDVEKHVFESDIVFVSVNTPTKTQGLGAGKAADLTWESAARMIADVSKSSKI
 VVEKSTVPVRTAEAEIEKILTHNSKGIEFQILSNPEFLAEGTAIKDLYNPDRVLIIGGRDTAA
 15 GQKAIKALRDVYAHWVPVEQIICTNLWSAELSKLAANAFLAQRISSVNAMSALCEATGADV
 TQVAHAVGTDTRIGPKFLNASVGFGGSCFQKDILNLIYICECNGLPEAANYWKQVVKVNDY
 QKIRFANRVVSSMFNTVSGKKIAILGFAFKKDTGDTRETPAIDVCNRLVADKAKLSIYDPQ
 VLEEQIRRDLSMARFDWDHPVPLQQIKAEGISEQVNVVSDAYEATKDAHGLCVL TEWDEFK
 SLDFKKIFDNMQPAFVFDGRNVVDVAVKLREIGFIVYSIGKPLDSWLKDMPAVA

- 20 **SEC. ID NO.: 17** es una secuencia de aminoácido de UDP-Glucosa
 deshidrogenasa (HASB) que procede del virus *Chlorella PBCV1*

MSRIAVVGCYVGTACAVLLAQKNEVIVLDISEDVQLIKNKKSPIEDKEIEEFLETKDLN
 LTATTDKVLAYENAEFVIIATPTDYDVVTRYFNTKSVENVIGDVIKNTQTHPTIVIKSTIP
 IGFVDKVVREQFDYQNIIFSPEFLREGRALYDNLVPSRIIVGDDSPIALKFANLLVEGSKTP
 25 LAPVLTMGTRAEAVKLFSNTYLAMRVAYFNELDTFAMSHGMNAKEIIDGVTLEPRIGQGY

SNPSFGYGAYCFPKDTKQLLANFEGVPQDIIGAIVESNETRKEVIVSEVENRFPTTVGVYK
 LAAKAGSDNFRSSAIVDIMERLANKGYHIKIFEPTVEQFENFEVDNNLTTFATESDVIIAN
 RVPVEHRILFGKKLITRDVYGDN

SEC. ID NO.: 18 es una secuencia de aminoácido de UDP-Glucosa
 5 deshidrogenasa (HASB) que procede de *Streptococcus*
zooepidemicus

MKISVAGSGYVGLSLSILLAQHNDVTVDIIDEKVRLINQGISPIKDADIEEYLKNAPLNL
 TATLDGASAYSNADLIIIATPTNYDSERNYFDTRHVEEVIEQVLDLNASATIIIKSTIPLG
 FIKHVREKYQTDRIIFSPEFLRESKALYDNLPSRIIVSYEKDDSPRVIQAAKAFAGLLKE
 10 GAKSKDTPVLFMGSQAEAVKLFANTFLAMRVSYFNELDTYSESKGLDAQRVIEGVCHDQR
 IGNHYNNPSFGYGGYCLPKDSKQLLANYRGIPQSLMSAIVESNKIRKSYLAEQILDRESSQ
 KQAGVPLTIGFYRLIMKSNSDNFRESAIKDIIDIINDYGVNIVIYEPMLGEDIGYRVVKDL
 EQFKNESTIIVSNRFEDDLGDVIDKVYTRDVFGRD

SEC. ID NO.: 19 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
 15 de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Bothrops atrox* con una
 señal de secreción N-terminal

ATGCAATTTAGCACAGTCGCATCAGTAGCCTTCGTTGCCTTGGCCAACTTCGTGGCAGCAC
 CGATGTATCCGAACGAACCGTTCTTAGTCTTTTGGAACGCGCCTACAACCTCAGTGTAGACT
 TCGATATAAGGTTGACCTTGATCTGAAGACATTCCATATCGTGACAAATGCTAATGACTCG
 20 CTGTCAGGATCGGCTGTCACGATTTTCTATCCCACGCACTTAGGGGTTTACCCACATATTG
 ATGACAGGGGGCACTTCTTCAATGGCATCATACCCCAAATGAATCCCTGGTAAAGCATTT
 AAACAAATCTAAATCAGATATTAATCGAATGATTCCCTTAAGAACATTCCACGGGCTGGGA
 GTCATAGACTGGGAAAACCTGGCGGCCACAGTGGGATAGGAATTGGGGAAGTAAGAACGTTT
 ATAGGAATAGATCAATCCAATTCGCGCGTGATCTCCACCCAGAGCTTAGTGAGGACAAGAT
 25 TAAACGCTTGGCAAAACAGGAATTCGAGAAAGCTGCAAAGAGTTTTATGAGGGATACACTA

TTATTAGCCGAGGAGATGCGACCAGACGGCTACTGGGGATACTATCTGTACCCCGATTGTC
 ACAATTACAATTATAAGACTAAGCCAGATCAGTACACAGGAGAGTGCCCTGACATCGAGAT
 GTCACGTAACAATCAACTCTTGTGGCTTTGGCGGGATAGCACTGCCCTTTTCCCCAATATC
 TACTTAGAGACTATACTAAGAAGCTCTGACAATGCCCTGAAGTTTGTGCACCATAGGCTCA
 5 AGGAGGCAATGAGGATAGCCTCAATGGCTCGAAATGACTACGCGTTGCCTTTCTTTGTTTA
 TGCTCGACCATTCTATGCCTATACCTTCGAACCATTGACTCAGGAAGACCTTGTGACTACG
 GTCGGAGAGACCGCGGACATGGGCGCCGCTGGGATCGTATTTTGGGGGAGTATGCAGTACG
 CAAGCACGGTTGAATCTTGCGGCAAAGTCAAGGACTACATGAATGGCCCACTGGGGCGTTA
 CATTGTGAATGTTACAACCTGCCGCCAAAATTTGCTCACGATTCTTGTGCAAACGTCATGGT
 10 AGGTGTGTAAGAAAGCACTCAGACTCCAATGCATTCCTTCACCTATTTCCCGATTCTGTTTC
 GCATAATGGTGCACGGGAATGCAACCGAGAAGAAAGTTATAGTAAAGGGGAAGCTGGAATT
 AAAGAATCTTATATTCTTACGTAATAACTTTATGTGCCAGTGTTATCAAGGCTGGAAAGGT
 CTATATTGCGAGAAGCATTTCGATAAAGGAAATTCGGAAAATCTAA

SEC. ID NO: 20 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
 15 de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Bothrops atrox* con una
 señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal
 ATGCAATTTAGCACAGTCGCATCAGTAGCCTTCGTTGCCTTGGCCAACTTCGTGGCAGCAC
 CGATGTATCCGAACGAACCGTTCTTAGTCTTTTGGAAACGCGCCTACAACCTCAGTGTAGACT
 TCGATATAAGGTTGACCTTGATCTGAAGACATTCCATATCGTGACAAATGCTAATGACTCG
 20 CTGTCAGGATCGGCTGTCACGATTTTCTATCCCACGCACTTAGGGGTTTACCCACATATTG
 ATGACAGGGGGCACTTCTTCAATGGCATCATACCCCAAATGAATCCCTGGTAAAGCATTT
 AAACAAATCTAAATCAGATATTAATCGAATGATTCCCTTAAGAACATTCCACGGGCTGGGA
 GTCATAGACTGGGAAAACCTGGCGGCCACAGTGGGATAGGAATTGGGGAAGTAAGAACGTTT
 ATAGGAATAGATCAATCCAATTCGCGCGTGATCTCACCCAGAGCTTAGTGAGGACAAGAT
 25 TAAACGCTTGGCAAAACAGGAATTCGAGAAAGCTGCAAAGAGTTTTATGAGGGATACACTA

TTATTAGCCGAGGAGATGCGACCAGACGGCTACTGGGGATACTATCTGTACCCCGATTGTC
 ACAATTACAATTATAAGACTAAGCCAGATCAGTACACAGGAGAGTGCCCTGACATCGAGAT
 GTCACGTAACAATCAACTCTTGTGGCTTTGGCGGGATAGCACTGCCCTTTTCCCCAATATC
 TACTTAGAGACTATACTAAGAAGCTCTGACAATGCCCTGAAGTTTGTGCACCATAGGCTCA
 5 AGGAGGCAATGAGGATAGCCTCAATGGCTCGAAATGACTACGCGTTGCCTTTCTTTGTTTA
 TGCTCGACCATTCTATGCCTATACCTTCGAACCATTGACTCAGGAAGACCTTGTGACTACG
 GTCGGAGAGACCGCGGACATGGGCGCCGCTGGGATCGTATTTTGGGGGAGTATGCAGTACG
 CAAGCACGGTTGAATCTTGCGGCAAAGTCAAGGACTACATGAATGGCCCACTGGGGCGTTA
 CATTGTGAATGTTACAACCTGCCGCCAAAATTTGCTCACGATTCTTGTGCAAACGTCATGGT
 10 AGGTGTGTAAGAAAGCACTCAGACTCCAATGCATTCCTTCACCTATTTCCCGATTCGTTTC
 GCATAATGGTGCACGGGAATGCAACCGAGAAGAAAGTTATAGTAAAGGGGAAGCTGGAATT
 AAAGAATCTTATATTCTTACGTAATAACTTTATGTGCCAGTGTTATCAAGGCTGGAAAGGT
 CTATATTGCGAGAAGCATTTCGATAAAGGAAATTCGGAAAATCGGATCCGCCATTTCTCAAA
 TCACTGACGGTCAAATCCAAGCTACTACCACTGCTACCACCGAAGCTACCACCACTGCTGC
 15 CCCATCTTCCACCGTTGAAACTGTTTCTCCATCCAGCACCGAACTATCTCTCAACAACT
 GAAAATGGTGCTGCTAAGGCCGCTGTCGGTATGGGTGCCGGTGCTCTAGCTGCTGCTGCTA
 TGTTGTTATAA

SEC. ID NO.: 21 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
 de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Cupiennius salei* con
 20 una señal de secreción N-terminal

ATGCAATTCAGCACTGTTGCATCAGTTGCATTTGTCGCCCTGGCGAATTTTGTAGCCGCGT
 TCAAGATTTACTGGAACGTCCCACTTTTTCAGTGCACGCATAACTACAAAATCGATTATGT
 CAAATTGTTGTCCACTTACGGGATACAGGTCAATGATGGCGGTAAGTTTCAAGGAAACCAA
 GTGACTATCTTTTATGAAACCCAGTTGGGTTTGTATCCACGAATCCTAAAATCTGGTAAAA
 25 TGGAACCGCGGAATCCCTCAACGCGGTAACTTTGAGAAACACCTAGAAAAGGCAAGCAC

GGACCTCCAGAAAGTGATCCCTTGGAAGAGTTTAGCGGATTAGGTGTGATAGATTGGGAG
 GCTTGGAGACCCACATGGGAATTTAACTGGGAACCGTTGAGGATATATCAAACCGAATCAA
 TTAAGAGAGCTAAAGAACTACACCCTACCGCAAACGATTCCGCAGTAAAAGAAATTGCAGA
 GCGGCAATGGGAAGATTGAGCCAAGTTATACATGTTAGAAACACTGCGGCTGGCAAAGAAA
 5 CTTGACCTCAAGCGCCTTGGTGTACTACTTATTTCTGATTGCTATAATTACGTCGGAA
 AGAAACCAAAAGATTTCCAATGTAGTGCCTCGATACGTAAAGGTAACGATAAGCTAAGCTG
 GTTGTGGAAAGATTCTACGGCATTGTGTCCATCGATATACGTATATGAATCACAATTAGAC
 AGGTATTCTTTTGAACAAAGGACATGGCGCGACAATGAGAACTTCGGGAAGCGTTGCGTG
 TAGCCACGAGAACCTCTAAAATATACCCATACGTAACTATTTGATAAGGAGCTTATACC
 10 GGAGCAAGAAGTATGGAGAATGCTTGCGCAGGCAGCTGCTGTCGGTGGCAGTGGTGC GGTA
 ATTTGGGGCTCATCTGCTGCAGTTGCATCTGAAGAGTTATGTAAATCTTTAAACAGTATA
 TTATTGAAACGCTTGGGCCGGCGGCAGAGAAGGTGGCTTGGCGTAGTGACTTATGCAGCAA
 AGAAATTTGTAATAATCAGGGTCGCTGCACATTCCCGGACGATGATTATGCAAACGCATGG
 AAATTATTTACAGATGATACTGTAAAGTTTTATGCTGGTAATATTACATGTAGGTGCTCCG
 15 AGAATTATTCTGGTCGTTTCTGCGAAAAGAAGAATTAA

SEC. ID NO.: 22 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
 de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Cupiennius salei* con
 una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-
 terminal

20 ATGCAATTCAGCACTGTTGCATCAGTTGCATTTGTCGCCCTGGCGAATTTTGTAGCCGCGT
 TCAAGATTTACTGGAACGTCCCAACTTTTCAGTGCACGCATAACTACAAAATCGATTATGT
 CAAATTGTTGTCCACTTACGGGATACAGGTCAATGATGGCGGTAAGTTTCAAGGAAACCAA
 GTGACTATCTTTTATGAAACCCAGTTGGGTTTGTATCCACGAATCCTAAAATCTGGTAAAA
 TGGAAAACGGCGGAATCCCTCAACGCGGTAACTTTGAGAAACACCTAGAAAAGGCAAGCAC
 25 GGACCTCCAGAAAGTGATCCCTTGGAAGAGTTTAGCGGATTAGGTGTGATAGATTGGGAG

GCTTGGAGACCCACATGGGAATTTAACTGGGAACCGTTGAGGATATATCAAACCGAATCAA
 TTAAGAGAGCTAAAGAACTACACCCTACCGCAAACGATTCCGCAGTAAAAGAAATTGCAGA
 GCGGCAATGGGAAGATTGAGCCAAGTTATACATGTTAGAAACACTGCGGCTGGCAAAGAAA
 CTTGACCTCAAGCGCCTTGGTGTTACTACTTATTTCTGATTGCTATAATTACGTCGGAA
 5 AGAAACCAAAAGATTTCCAATGTAGTGCCTCGATACGTAAAGGTAACGATAAGCTAAGCTG
 GTTGTGGAAAGATTCTACGGCATTGTGTCCATCGATATACGTATATGAATCACAATTAGAC
 AGGTATTCTTTTGAACAAAGGACATGGCGCGACAATGAGAACTTCGGGAAGCGTTGCGTG
 TAGCCACGAGAACCTCTAAAATATACCCATACGTAACTATTTGATAAGGAGCTTATACC
 GGAGCAAGAAGTATGGAGAATGCTTGCGCAGGCAGCTGCTGTCGGTGGCAGTGGTGCGGTA
 10 ATTTGGGGCTCATCTGCTGCAGTTGCATCTGAAGAGTTATGTAAATCTTTAAACAGTATA
 TTATTGAAACGCTTGGGCCGGCGGCAGAGAAGGTGGCTTGGCGTAGTGACTTATGCAGCAA
 AGAAATTTGTAATAATCAGGGTCGCTGCACATTCCCGGACGATGATTATGCAAACGCATGG
 AAATTATTTACAGATGATACTGTAAAGTTTTATGCTGGTAATATTACATGTAGGTGCTCCG
 AGAATTATTCTGGTCGTTTCTGCGAAAAGAAGAATGGATCCGCCATTTCTCAAATCACTGA
 15 CGGTCAAATCCAAGCTACTACCACTGCTACCACCGAAGCTACCACCACTGCTGCCCCATCT
 TCCACCGTTGAAACTGTTTCTCCATCCAGCACCGAACTATCTCTCAACAACTGAAAATG
 GTGCTGCTAAGGCCGCTGTCGGTATGGGTGCCGGTGCTCTAGCTGCTGCTGCTATGTTGTT
 ATAA

SEC. ID NO.: 23 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
 20 de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Hirudo nipponia* con una
 señal de secreción N-terminal

ATGCAATTCTCTACTGTCGCTTCCGTTGCTTTCGTCGCTTTGGCTAACTTTGTTGCCGCTA
 TGAAGGAGATAGCAGTTACCATCGATGATAAGAATGTTATAGCGTCTGTCAGTGAAAGCTT
 CCATGGTGTGGCTTTCGACGCAAGCCTATTCTCACCTAAAGGGCTATGGTCGTTTGTGAC
 25 ATTACTTCACCCAAGTTATTCAAGCTTCTGGAGGGACTCTCCCCTGGTTATTTCCGTGTCG

GCGGCACATTTGCGAACTGGTTATTCTTCGACCTCGATGAAAACAACAAGTGGAAGGATTA
 CTGGGCTTTTAAGGACAAGACTCCAGAGACCGCCACGATTACCCGACGGTGGCTCTTCAGG
 AAGCAAAACAACCTCAAGAAGGAAACCTTTGATGATTTGGTAAAGCTTACAAAGGGGTCCA
 AGATGCGGCTGCTATTTGATCTAAACGCAGAGGTCCGTACAGGATATGAGATAGGCAAGAA
 5 GATGACATCAACTTGGGACTCAAGCGAGGCAGAAAAGTTGTTCAAATATTGCGTTAGCAAG
 GGATATGGAGATAATATCGATTGGGAGTTAGGCAACGAACCTGATCACACGTCAGCACACA
 ATTTGACAGAGAAGCAAGTAGGTGAAGATTTTAAGGCCCTACACAAGGTGTTGGAAAAGTA
 TCCAACACTTAATAAAGGTAGCTTGGTTGGTCCAGACGTTGGGTGGATGGGAGTGTCGTAC
 GTCAAGGGTCTGGCTGACGGGGCTGGAGATCATGTGACCGCTTTTACTCTACATCAGTATT
 10 ATTTGATGGAAATACGAGTGATGTTAGTACCTACTTGGATGCGACGTACTTTAAGAAGTT
 GCAACAGTTATTCGATAAGGTAAAAGACGTACTCAAGAATTCTCCACATAAGGACAAACCC
 TTGTGGCTAGGGGAAACCTCTTCCGGCTACAACAGTGGGACTAAAGATGTATCCGATAGAT
 ACGTGTCGGGGTTCTTGACGCTGGACAAGTTGGGGCTTTCGGCGGCAAATAACGTCAAGGT
 GGTCATCAGACAAACGATTTATAATGGTTACTATGGTTTGCTTGACAAGAATACTTTGGAG
 15 CCCAATCCGGACTACTGGCTGATGCACGTCCACAATTCCTTAGTTGGTAATACCGTTTTCA
 AGGTCGATGTCAGCGATCCCACAAACAAAGCCCGTGTTTACGCTCAGTGTACGAAGACCAA
 TAGTAAACATACCCAGTCACGTTATTATAAGGGGTCCCTAACCATTTTCGCGTTGAATGTA
 GGTGATGAAGATGTTACACTCAAGATTGATCAATACAGTGGTAAGAAAATATACTCATATA
 TTCTGACGCCTGAAGGCGGCCAGTTAACCTCTCAAAAGGTACTGCTTAACGGTAAAGAATT
 20 GAAGTTAGTGTGATCAACTTCCAGAACTTAACGCGGACGAAAGTAAACATCCTTCACA
 TTGTCTCCCAAACCTTTTGGATTCTTTGTGGTCTCGGATGCCAACGTTGAAGCTTGCAAGA
 AATAA

SEC. ID NO.: 24 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
 de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Hirudo nipponia* con una
 25 señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal

ATGCAATTCTCTACTGTCGCTTCCGTTGCTTTCGTCGCTTTGGCTAACTTTGTTGCCGCTA
 TGAAGGAGATAGCAGTTACCATCGATGATAAGAATGTTATAGCGTCTGTCAGTGAAAGCTT
 CCATGGTGTGGCTTTTCGACGCAAGCCTATTCTCACCTAAAGGGCTATGGTCGTTTGTGAC
 ATTACTTCACCCAAGTTATTCAAGCTTCTGGAGGGACTCTCCCCTGGTTATTTCCGTGTGCG
 5 GCGGCACATTTGCGAACTGGTTATTCTTCGACCTCGATGAAAACAACAAGTGGAAGGATTA
 CTGGGCTTTTAAAGGACAAGACTCCAGAGACCGCCACGATTACCCGACGGTGGCTCTTCAGG
 AAGCAAAACAACCTCAAGAAGGAAACCTTTGATGATTTGGTAAAGCTTACAAAGGGGTCCA
 AGATGCGGCTGCTATTTGATCTAAACGCAGAGGTCCGTACAGGATATGAGATAGGCAAGAA
 GATGACATCAACTTGGGACTCAAGCGAGGCAGAAAAGTTGTTCAAATATTGCGTTAGCAAG
 10 GGATATGGAGATAATATCGATTGGGAGTTAGGCAACGAACCTGATCACACGTCAGCACACA
 ATTTGACAGAGAAGCAAGTAGGTGAAGATTTTAAAGGCCCTACACAAGGTGTTGGAAAAGTA
 TCCAACACTTAATAAAGGTAGCTTGGTTGGTCCAGACGTTGGGTGGATGGGAGTGTCGTAC
 GTCAAGGGTCTGGCTGACGGGGCTGGAGATCATGTGACCGCTTTTACTCTACATCAGTATT
 ATTTGATGGAAATACGAGTGATGTTAGTACCTACTTGGATGCGACGTACTTTAAGAAGTT
 15 GCAACAGTTATTCGATAAGGTAAAAGACGTA CTCAAGAATTCTCCACATAAGGACAAACCC
 TTGTGGCTAGGGGAAACCTCTTCCGGCTACAACAGTGGGACTAAAGATGTATCCGATAGAT
 ACGTGTCGGGGTTCTTGACGCTGGACAAGTTGGGGCTTTCGGCGGCAAATAACGTCAAGGT
 GGTCATCAGACAAACGATTTATAATGGTTACTATGGTTTGCTTGACAAGAATACTTTGGAG
 CCCAATCCGGACTACTGGCTGATGCACGTCCACAATTCCTTAGTTGGTAATACCGTTTTCA
 20 AGGTCGATGTCAGCGATCCCACAAACAAAGCCCGTGTTTACGCTCAGTGTACGAAGACCAA
 TAGTAAACATAACCCAGTCACGTTATTATAAGGGGTCCCTAACCATTTTCGCGTTGAATGTA
 GGTGATGAAGATGTTACACTCAAGATTGATCAATACAGTGGTAAGAAAATATACTCATATA
 TTCTGACGCCTGAAGGCGGCCAGTTAACCTCTCAAAAGGTACTGCTTAACGGTAAAGAATT
 GAAGTTAGTGTGTCAGATCAACTTCCAGAACTTAACGCGGACGAAAGTAAACATCCTTCACA
 25 TTGTCTCCCAAACTTTTGGATTCTTTGTGGTCTCGGATGCCAACGTTGAAGCTTGCAAGA

AAGGATCCGCCATTTCTCAAATCACTGACGGTCAAATCCAAGCTACTACCACTGCTACCAC
CGAAGCTACCACCACTGCTGCCCCATCTTCCACCGTTGAAACTGTTTCTCCATCCAGCACC
GAAACTATCTCTCAACAACTGAAAATGGTGCTGCTAAGGCCGCTGTCGGTATGGGTGCCG
GTGCTCTAGCTGCTGCTGCTATGTTGTTATAA

- 5 **SEC. ID NO.: 25** es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Loxosceles intermedia* con una señal de secreción N-terminal

ATGCAGTTTTCAACCGTTGCGAGCGTCGCTTTTGTGGCTCTTGCTAATTCGTTGCCGCCT
TCGATGTCTTCTGGAATGTTCCGTCGCAGCAATGCAAGAAATATGGTATGAAATTCGTTCC
10 GCTCTTAGAGCAATACTCTATCCTAGTCAACAAAGAAGACAATTTCAAGGGCGACAAAATA
ACGATCTTTTATGAGTCACAGCTCGGGCTTTACCCACATATTGGTGCAAACGACGAGTCGT
TTAATGGCGGGATACCACAATTAGGTGACCTGAAAGCACACTTAGAAAAGTCAGCGGTTGA
TATACGACGTGATATTTTGGATAAGTCGGCGACTGGTCTAAGAATTATAGACTGGGAAGCA
TGGAGACCAATATGGGAATTCAACTGGTCTAGCCTACGAAAGTACCAAGATAAAATGAAGA
15 AAGTCGTCCGCCAGTTTAACCCGACTGCTCATGAATCCACAGTGGCCAACTAGCACATAA
TGAGTGGGAAAATAGTAGTAAGTCTTGGATGCTTTCTACATTGCAGTTGGGTAAGCAACTT
CGTCCAACTCTGTATGGTGCTATTATTTATTTCCCGACTGTTATACTATGATGGCAACT
CAGTCCAAGAATTTTCAGTGTTCTGAAGCTATCCGTAAGGGGAACGATAGGTTGAAATGGTT
GTGGGAAGAATCGACAGCTGTATGCCCATCTATCTACATAAAAGAAGGCCAACTGACCAAT
20 TATACCTTGCAAAGAGAATCTGGTTTACCAATGGGAGATTACAGGAAGCCTTGAGAGTAG
CTCAACCTAAAGCGCGTATTTATCCATACATAAATTACTCCATCAAACCCGGAATGATGGT
GCCTGAAGTTGAGTTTTGGCGGTTAATCGCTCAGATAGCCTCGCTGGGTATGGATGGAGCA
GTGATTTGGGGATCAAGTGCGAGTGTAGGCAGTAAGAATCATTGTGCGCAATTAATGAAGT
ACATTGCAGACGTATTGGGTCCTGCAACTTTGCGCATAAAAGAAAATGTAGCACGGTGCAG
25 TAAACAGGCGTGCTCTGGTAGGGGTAGATGTACCTGGCCTAAAGATACCTCTGTTATTGCT

TGGAAGTTCCTCGTTGAAAAGGAAGACTATGACTTTTATCTGGGTGATATAGAGTGTAAT
GTGTTGAAGGCTACGAAGGTAGGTACTGTGAACAAAAGACTAAGTAA

SEC. ID NO.: 26 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Loxosceles intermedia*
5 con una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje
C-terminal

ATGCAGTTTTCAACCGTTGCGAGCGTCGCTTTTGTGGCTCTTGCTAATTCGTTGCCGCCT
TCGATGTCTTCTGGAATGTTCCGTCGCAGCAATGCAAGAAATATGGTATGAAATTCGTTCC
GCTCTTAGAGCAATACTCTATCCTAGTCAACAAAGAAGACAATTTCAAGGGCGACAAAATA
10 ACGATCTTTTATGAGTCACAGCTCGGGCTTTACCCACATATTGGTGCAAACGACGAGTCGT
TTAATGGCGGGATACCACAATTAGGTGACCTGAAAGCACACTTAGAAAAGTCAGCGGTTGA
TATACGACGTGATATTTTGGATAAGTCGGCGACTGGTCTAAGAATTATAGACTGGGAAGCA
TGGAGACCAATATGGGAATTCAACTGGTCTAGCCTACGAAAGTACCAAGATAAAATGAAGA
AAGTCGTCCGCCAGTTTAACCCGACTGCTCATGAATCCACAGTGGCCAACTAGCACATAA
15 TGAGTGGGAAAATAGTAGTAAGTCTTGGATGCTTTCTACATTGCAGTTGGGTAAGCAACTT
CGTCCAACTCTGTATGGTGCTATTATTTATTTCCCGACTGTTATAACTATGATGGCAACT
CAGTCCAAGAATTTTCAGTGTTCTGAAGCTATCCGTAAGGGGAACGATAGGTTGAAATGGTT
GTGGGAAGAATCGACAGCTGTATGCCATCTATCTACATAAAAGAAGGCCAACTGACCAAT
TATACCTTGCAAAGAGAATCTGGTTTACCAATGGGAGATTACAGGAAGCCTTGAGAGTAG
20 CTCAACCTAAAGCGCGTATTTATCCATACATAAATTACTCCATCAAACCCGGAATGATGGT
GCCTGAAGTTGAGTTTTGGCGGTTAATCGCTCAGATAGCCTCGCTGGGTATGGATGGAGCA
GTGATTTGGGGATCAAGTGCGAGTGTAAGCAGTAAGAATCATTGTGCGCAATTAATGAAGT
ACATTGCAGACGTATTGGGTCCTGCAACTTTGCGCATAAAAGAAAATGTAGCACGGTGCAG
TAAACAGGCGTGCTCTGGTAGGGGTAGATGTACCTGGCCTAAAGATACCTCTGTTATTGCT
25 TGGAAGTTCCTCGTTGAAAAGGAAGACTATGACTTTTATCTGGGTGATATAGAGTGTAAT

GTGTTGAAGGCTACGAAGGTAGGTACTGTGAACAAAAGACTAAGGGATCCGCCATTTCTCA
 AATCACTGACGGTCAAATCCAAGCTACTACCACTGCTACCACCGAAGCTACCACCACTGCT
 GCCCCATCTTCCACCGTTGAACTGTTTCTCCATCCAGCACCGAACTATCTCTCAACAAA
 CTGAAAATGGTGCTGCTAAGGCCGCTGTCGGTATGGGTGCCGGTGCTCTAGCTGCTGCTGC
 5 TATGTTGTTATAA

SEC. ID NO.: 27 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Tityus serrulatus* con una señal de secreción N-terminal

ATGCAATTCTCTACTGTCGCTTCCGTTGCTTTCGTCGCTTTGGCTAACTTTGTTGCCGCTG
 10 CTGATTTTAAAGTTTACTGGGAAGTGCCTTCCTTCCTTTGTTCTAAACGTTTTAAATTA
 TGTAACGGAAGTTTTAACAAGTCACGAGATTCTTGTCAATCAGGGTGAGAGTTTCAACGGT
 GACAAGATAGTAATCTTTTACGAAAACCAATTGGGGAAGTACCCGCATATTGACTCAAACA
 ATGTGGAGATCAATGGAGGAATACTTCAAGTAGCCGATTTGGCGAAGCATTTGAAAGTAGC
 CAAGGATAATATCACTAAATTCGTCCCGAATCCTAATTTCAACGGTGTCGGAGTGATCGAC
 15 TGGGAAGCTTGGCGGCCATCATGGGAATTTAACTGGGGTAAGTTAAAAGTATATAAAGAAA
 AGAGCATTGACTTGGTCAAGTCGAAACATCCGGAGTGGCCCTCCGACAGGGTTGAAAAGGT
 TGCTAAAGAGGAGTGGGAGGAGAGTGCCAAAGAATGGATGGTGAAGACCCTGAAGTTAGCA
 CAGGAAATGCGACCGAACGCAGTTTGGTGCTATTATCTATTCCCTGACTGCTACAATTATT
 TCGGTAAGGATCAACCCTCTCAATTCAGCTGCTCGTCTCGAATTCAGAAGGAAAATTCTCG
 20 TCTTTCTTGGCTCTGGAATCAATCAACAGCCATTTGCCTAAGCATTTATATCCAGGAATCC
 CATGTTACCAAATATAATATGTCCCAGCGGACATGGTGGATCGATGCGAGATTAAGAGAAG
 CAATTCGAGTCAGCGAACACAGACCAAACATACCCATCTACCCTTACATTAATTATATTCT
 ACCTGGAATAATCAAACGTACCAGCAATGGACTTTAAAAGGACACTGGGTCAAATAGCT
 AGCCTCGGCCTAGATGGTGCTTTGTTATGGGGATCTAGCTATCATGTTTTAACAGAATCTC
 25 AATGCAAAATCACTTCTGATTATGTGAAATCAGTGATTGCTCCTACCGTGGCTACTGTCGT

TCTCAATACAAACAGATGCTCACAGATAATTTGTAAGGGTCGCGGCAACTGTGTTTGGCCT
 GAAGAACCATTAGTTCTTGGAATACTTAGTTGACCCCAAATGCCAGTGTTCAAGCCAA
 CCAACATCCACTGTAAATGTAAAGGTTACCTAGGTAGATACTGTGAGATCCCAAAGTAA

SEC. ID NO.: 28 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
 5 de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Tityus serrulatus* con
 una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-
 terminal

ATGCAATTCTCTACTGTCGCTTCCGTTGCTTTCGTCGCTTTGGCTAACTTTGTTGCCGCTG
 CTGATTTTAAAGTTTACTGGGAAGTGCCTTCCTTCCTTTGTTCTAAACGTTTTAAATTA
 10 TGTAACGGAAGTTTTAACAAGTCACGAGATTCTTGTCATCAGGGTGAGAGTTTCAACGGT
 GACAAGATAGTAATCTTTTACGAAAACCAATTGGGGAAGTACCCGCATATTGACTCAAACA
 ATGTGGAGATCAATGGAGGAATACTTCAAGTAGCCGATTTGGCGAAGCATTTGAAAGTAGC
 CAAGGATAATATCACTAAATTCGTCCCGAATCCTAATTTCAACGGTGTCGGAGTGATCGAC
 TGGGAAGCTTGGCGGCCATCATGGGAATTTAACTGGGGTAAGTTAAAAGTATATAAAGAAA
 15 AGAGCATTGACTTGGTCAAGTCGAAACATCCGGAGTGGCCCTCCGACAGGGTTGAAAAGGT
 TGCTAAAGAGGAGTGGGAGGAGAGTGCCAAAGAATGGATGGTGAAGACCCTGAAGTTAGCA
 CAGGAAATGCGACCGAACGCAGTTTGGTGCTATTATCTATTCCCTGACTGCTACAATTATT
 TCGGTAAGGATCAACCCTCTCAATTCAGCTGCTCGTCTCGAATTCAGAAGGAAAATTCTCG
 TCTTTCTTGGCTCTGGAATCAATCAACAGCCATTTGCCTAAGCATTTATATCCAGGAATCC
 20 CATGTTACCAAATATAATATGTCCCAGCGGACATGGTGGATCGATGCGAGATTAAGAGAAG
 CAATTCGAGTCAGCGAACACAGACCAAACATACCCATCTACCCTTACATTAATTATATTCT
 ACCTGGAATAATCAAACGTACCAGCAATGGACTTTAAAAGGACACTGGGTCAAATAGCT
 AGCCTCGGCCTAGATGGTGCTTTGTTATGGGGATCTAGCTATCATGTTTTAACAGAATCTC
 AATGCAAAATCACTTCTGATTATGTGAAATCAGTGATTGCTCCTACCGTGGCTACTGTCGT
 25 TCTCAATACAAACAGATGCTCACAGATAATTTGTAAGGGTCGCGGCAACTGTGTTTGGCCT

GAAGAACCATTTAGTTCTTGGAATACTTAGTTGACCCCAAATGCCAGTGTTCAAGCCAA
 CCAACATCCACTGTAAATGTAAAGGTTACCTAGGTAGATACTGTGAGATCCCAAAGGGATC
 CGCCATTTCTCAAATCACTGACGGTCAAATCCAAGCTACTACCACTGCTACCACCGAAGCT
 ACCACCACTGCTGCCCCATCTTCCACCGTTGAAACTGTTTCTCCATCCAGCACCGAAACTA
 5 TCTCTCAACAAACTGAAAATGGTGCTGCTAAGGCCGCTGTCGGTATGGGTGCCGGTGCTCT
 AGCTGCTGCTGCTATGTTGTTATAA

SEC. ID NO.: 29 es una secuencia de ácido nucleico recodificada de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Vespa magnifica* con una señal de secreción N-terminal

10 ATGCAATTTTCTACAGTGGCAAGTGTTGCATTTCGTTGCACTAGCCAACTTTGTGGCGGCAG
 ATAGCTGTGGGTCAAACCTGCGAAAAGAGTGAGAGACCGAAAAGGGTCTTCAACATTTACTG
 GAACGTACCTACATTCATGTGTCACCAGTACGGACTATACTTTGACGAGGTCACGAATTTT
 AATATAAAGCACAACAGCAAAGACAATTTTCAAGGGGACAAGATCGCGATCTTTTATGACC
 CCGGGGAGTTTCCCGCTCTGCTGCCACTAACTATGGTAAGTACAAGATCAGGAATGGTG
 15 TGTTCCACAAGAGGGTAACATCACCATCCATCTGCAGAGATTCATAGAGTACCTAGATAAG
 ACCTATCCGAACCGTAACTTTTCAGGCATCGGTGTGATCGATTTTCGAGAGGTGGAGACCAA
 TTTTCAGACAGAATTGGGGTAATATGAAGATTTACAAGAACTTCTCCATCGATCTTGTGCG
 TAAAGAGCATCCTTTCTGGAATAAGAAAATGATCGAGTTGGAAGCTTCTAAAAGATTTCGAG
 AAATACGCCCCGTCTGTTTCATGGAAGAAACATTAAAGTTGGCTAAGAAAACCTAGAAAACAGG
 20 CCGATTGGGGCTACTACGGTTACCCCTATTGCTTCAACATGTCTCCTACTAATTTTCGTTCC
 TGACTGCGATGTCACAGCTAGGGATGAGAACAACGAGATGTCTTGGTTGTTTAACAACCAG
 AATGTCCTATTACCAAGTGTATACATTAGGAGAGAGCTAACTCCTGACCAGAGGATTGGGC
 TTGTACAGGGGAGAGTGAAGGAAGCTGTGAGAATTTCAAATAAACTGAAGCACTCACCTAA
 AGTCTTCAGCTATTGGTGGTATGTTTACCAAGACGAGACCAACACCTTCTTAACGGAGACC
 25 GACGTCAAGAAGACGTTTCAGGAGATTGTGATCAACGGTGGAGATGGGATTATAATCTGGG

GTTCGTCCTCTGATGTAAACAGCTTGTCCAAGTGTACGAGGTTAAGGGAGTACCTATTGAC
AGTCTTGGGACCAATTGCTGTTAACGTGACTGAAGCAGTAAACTAA

SEC. ID NO.: 30 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Vespa magnifica* con una
5 señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal
ATGCAATTTTCTACAGTGGCAAGTGTTCATTTCGTTGCACTAGCCAACTTTGTGGCGGCAG
ATAGCTGTGGGTCAAACCTGCGAAAAGAGTGAGAGACCGAAAAGGGTCTTCAACATTTACTG
GAACGTACCTACATTCATGTGTCAACAGTACGGACTATACTTTGACGAGGTCACGAATTTT
AATATAAAGCACAAACAGCAAAGACAATTTTCAAGGGGACAAGATCGCGATCTTTTATGACC
10 CCGGGGAGTTTCCCGCTCTGCTGCCACTAACTATGGTAAGTACAAGATCAGGAATGGTGG
TGTTCCACAAGAGGGTAACATCACCATCCATCTGCAGAGATTCATAGAGTACCTAGATAAG
ACCTATCCGAACCGTAACTTTTCAGGCATCGGTGTGATCGATTTTCGAGAGGTGGAGACCAA
TTTTTCAGACAGAATTGGGGTAATATGAAGATTTACAAGAACTTCTCCATCGATCTTGTGCG
TAAAGAGCATCCTTTCTGGAATAAGAAAATGATCGAGTTGGAAGCTTCTAAAAGATTTCGAG
15 AAATACGCCCGTCTGTTTCATGGAAGAAACATTAAAGTTGGCTAAGAAAACCTAGAAAACAGG
CCGATTGGGGCTACTACGGTTACCCCTATTGCTTCAACATGTCTCCTACTAATTTTCGTTCC
TGACTGCGATGTACAGCTAGGGATGAGAACAACGAGATGTCTTGTTGTTTAAACAACCAG
AATGTCCTATTACCAAGTGTATACATTAGGAGAGAGCTAACTCCTGACCAGAGGATTGGGC
TTGTACAGGGGAGAGTGAAGGAAGCTGTGAGAATTTCAAATAAACTGAAGCACTCACCTAA
20 AGTCTTCAGCTATTGGTGGTATGTTTACCAAGACGAGACCAACACCTTCTTAACGGAGACC
GACGTCAAGAAGACGTTTCAGGAGATTGTGATCAACGGTGGAGATGGGATTATAATCTGGG
GTTCGTCCTCTGATGTAAACAGCTTGTCCAAGTGTACGAGGTTAAGGGAGTACCTATTGAC
AGTCTTGGGACCAATTGCTGTTAACGTGACTGAAGCAGTAAACGGATCCGCCATTTCTCAA
ATCACTGACGGTCAAATCCAAGCTACTACCACTGCTACCACCGAAGCTACCACCACTGCTG
25 CCCCATCTTCCACCGTTGAACTGTTTCTCCATCCAGCACCGAACTATCTCTCAACAAAC

TGAAAATGGTGCTGCTAAGGCCGCTGTCGGTATGGGTGCCGGTGCTCTAGCTGCTGCTGCT
ATGTTGTTATAA

SEC. ID NO.: 31 es una secuencia de aminoácido de hialuronidasa
(HYAL) que procede de *Bothrops atrox* con una señal de secreción
5 N-terminal

MQFSTVASVAFVALANFVAAPMYPNEPFLVFWNAPTTQCRLRYKVDLDLKTFFHIVTNANDS
LSGSAVTIFYPTHLGVYPHIDDRGHFFNGIIPQNESLVKHLNKS KSDINRMIPLRTFHGLG
VIDWENWRPQWDRNWGSKNVYRNRSIQFARDLHPELSEDKIKRLAKQEF EKA AKSFMRDTL
LLAEEMRPDGYWGYLYPDCHNYNYKTKPDQYTGECPDIEMSRNNQLLWLWRDSTALFPNI
10 YLETILRSSDNALKFVHHRLKEAMRIASMARNDYALPFFVYARPFYAYTFEPLTQEDLVTT
VGETADMGAAGIVFWGSMQYASTVESCGKVKDYMNGLGRYIVNVTTAAKICSRFLCKRHG
RCVRKHSDSNAFLHLFPDSFRIMVHGNATEKKVIVKGKLELKNLIFLRNNFMCQCYQGWK
LYCEKHSIKEIRKI

SEC. ID NO.: 32 es una secuencia de aminoácido de hialuronidasa
15 (HYAL) que procede de *Bothrops atrox* con una señal de secreción
N-terminal y una señal de anclaje C-terminal

MQFSTVASVAFVALANFVAAPMYPNEPFLVFWNAPTTQCRLRYKVDLDLKTFFHIVTNANDS
LSGSAVTIFYPTHLGVYPHIDDRGHFFNGIIPQNESLVKHLNKS KSDINRMIPLRTFHGLG
VIDWENWRPQWDRNWGSKNVYRNRSIQFARDLHPELSEDKIKRLAKQEF EKA AKSFMRDTL
20 LLAEEMRPDGYWGYLYPDCHNYNYKTKPDQYTGECPDIEMSRNNQLLWLWRDSTALFPNI
YLETILRSSDNALKFVHHRLKEAMRIASMARNDYALPFFVYARPFYAYTFEPLTQEDLVTT
VGETADMGAAGIVFWGSMQYASTVESCGKVKDYMNGLGRYIVNVTTAAKICSRFLCKRHG
RCVRKHSDSNAFLHLFPDSFRIMVHGNATEKKVIVKGKLELKNLIFLRNNFMCQCYQGWK
LYCEKHSIKEIRKIGSAISQITDGQIQATTTATTEATTTAAPSSTVETVSPSSTETISQQT

25 ENGAAKAAVGMGAGALAAAAML

SEC. ID NO.: 33 es una secuencia de aminoácido de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Cupiennius salei* con una señal de secreción N-terminal

MQFSTVASVAFVALANFVAAFKIYWNVPTFQCTHNYKIDYVKLLSTYGIQVNDGGKFQGNQ
 5 VTIFYETQLGLYPRILKSGKMENGIPQRGNFEXHLEKASTDLQKVIPWKEFSGLGVIDWE
 AWRPTWEFNWEPLRIYQTESI KRAKELHPTANDSAVKEIAERQWEDSAKLYMLET LRLAKK
 LRPQAPWCYYLFPDCYNYVGKKPKDFQCSASIRKGN DKLSWLWKDSTALCPSIYVYESQLD
 RYSFEQRTWRDNEKLREALRVATRTSKIYPYVNYFDKELIPEQEVWRMLAQAAAVGGSGAV
 IWGSSAAVASEELCKSLKQYIIETLGPAAEKVAWRSD LCSKEICNNQGRCTFPDDDYANAW
 10 KLFTDDTVK FYAGNITCRCSENYSGRFCEKKN

SEC. ID NO.: 34 es una secuencia de aminoácido de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Cupiennius salei* con una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal

MQFSTVASVAFVALANFVAAFKIYWNVPTFQCTHNYKIDYVKLLSTYGIQVNDGGKFQGNQ
 15 VTIFYETQLGLYPRILKSGKMENGIPQRGNFEXHLEKASTDLQKVIPWKEFSGLGVIDWE
 AWRPTWEFNWEPLRIYQTESI KRAKELHPTANDSAVKEIAERQWEDSAKLYMLET LRLAKK
 LRPQAPWCYYLFPDCYNYVGKKPKDFQCSASIRKGN DKLSWLWKDSTALCPSIYVYESQLD
 RYSFEQRTWRDNEKLREALRVATRTSKIYPYVNYFDKELIPEQEVWRMLAQAAAVGGSGAV
 IWGSSAAVASEELCKSLKQYIIETLGPAAEKVAWRSD LCSKEICNNQGRCTFPDDDYANAW
 20 KLFTDDTVK FYAGNITCRCSENYSGRFCEKKN GSAISQITDGQIQATTTATTEATTTAAPS
 STVETVSPSSTETISQQTENGA AKA AVGMGAGALAAAAMLL

SEC. ID NO.: 35 es una secuencia de aminoácido de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Hirudo nipponia* con una señal de secreción N-terminal

25 MQFSTVASVAFVALANFVAA~MKEIAVTIDDKNVIASVSESFHGVAFDASLFSPKGLWSFV

DITSPKLFKLLEGLSPGYFRVGGTFANWLFFDLDENNKWKDYWAFKDKTPETATITRRWLF
 RKQNNLKKETFDDLVLTKGSKMRLFLDLNAEVRTGYEIGKKMTSTWDSSEAEKLFKYCVS
 KGYGDNIDWELGNEPDHTSAHNLTEKQVGEDFKALHKVLEKYPTLNKGSLVGPDVGMGVS
 YVKGLADGAGDHVTAFTLHQYYFDGNTSDVSTYLDATYFKKLQQLFDKVKDVLKNSPHKDK
 5 PLWLGETSSGYNSGTKDVSDRYVSGFLTLDKLGLSAANNVKVIRQTIYNGYYGLLDKNTL
 EPNPDYWLMHVHNSLVGNTVFKVDVSDPTNKARVYAQCTKTNSKHTQSRYYKGSALTIFALN
 VGDEDVTLKIDQYSGKKIYSYILTPEGGQLTSQKVLLNGKELKLVSDQLPELNADESKTSF
 TLSPKTFGFFVSDANVEACKKGSAISQITDGGIQAATTTATTEATTTAAPSSTVETVSPSS
 TETISQQTENGAAKAAVGMGAGALAAAAMLL

10 **SEC. ID NO.: 36** es una secuencia de aminoácido de hialuronidasa
 (HYAL) que procede de *Hirudo nipponia* con una señal de
 secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal

MQFSTVASVAFVALANFVAA~MKEIAVTIDDKNVIASVSESFHGVAFDASLFSPKGLWSFV
 DITSPKLFKLLEGLSPGYFRVGGTFANWLFFDLDENNKWKDYWAFKDKTPETATITRRWLF
 15 RKQNNLKKETFDDLVLTKGSKMRLFLDLNAEVRTGYEIGKKMTSTWDSSEAEKLFKYCVS
 KGYGDNIDWELGNEPDHTSAHNLTEKQVGEDFKALHKVLEKYPTLNKGSLVGPDVGMGVS
 YVKGLADGAGDHVTAFTLHQYYFDGNTSDVSTYLDATYFKKLQQLFDKVKDVLKNSPHKDK
 PLWLGETSSGYNSGTKDVSDRYVSGFLTLDKLGLSAANNVKVIRQTIYNGYYGLLDKNTL
 EPNPDYWLMHVHNSLVGNTVFKVDVSDPTNKARVYAQCTKTNSKHTQSRYYKGSALTIFALN
 20 VGDEDVTLKIDQYSGKKIYSYILTPEGGQLTSQKVLLNGKELKLVSDQLPELNADESKTSF
 TLSPKTFGFFVSDANVEACKK

SEC. ID NO.: 37 es una secuencia de aminoácido de hialuronidasa
 (HYAL) que procede de *Loxosceles intermedia* con una señal de
 secreción N-terminal

25 MQFSTVASVAFVALANFVAAFDVFWNVPSQQCKKYGMKFVPLLEQYSILVNKEDNFKGDKI

TIFYESQLGLYPHIGANDESFNGGIPQLGDLKAHLEKSAVDIRRDILDKSATGLRIIDWEA
 WRPIWEFNWSSLRKYQDKMKKVVRQFNPTAHVESTVAKLAHNEWENSSKSWMLSTLQLGKQL
 RPNSVWCYYLFPDCYNYDGNSVQEFQCSEAIRKGNDRLLKWLWEESTAVCPsiYIkeGQLTN
 YTLQKRIWFTNGRLQEALRVAQPKARIYPYINYSIKPGMMVPEVEFWRLIAQIASLGMDGA
 5 VIWGSSASVGSKNHCAQLMKYIADVLGPATLRIKENVARCSKQACSGRGRCTWPKDTSVIA
 WKFLVEKEDYDFYLGDIKCKVEGYEGRYCEQKTK

SEC. ID NO.: 38 es una secuencia de aminoácido de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Loxosceles intermedia* con una señal de secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal

10 MQFSTVASVAFVALANFVAAFDVFWNVPSQQCKKYGMKFVPLLEQYSILVNKEDNFKGDKI
 TIFYESQLGLYPHIGANDESFNGGIPQLGDLKAHLEKSAVDIRRDILDKSATGLRIIDWEA
 WRPIWEFNWSSLRKYQDKMKKVVRQFNPTAHVESTVAKLAHNEWENSSKSWMLSTLQLGKQL
 RPNSVWCYYLFPDCYNYDGNSVQEFQCSEAIRKGNDRLLKWLWEESTAVCPsiYIkeGQLTN
 YTLQKRIWFTNGRLQEALRVAQPKARIYPYINYSIKPGMMVPEVEFWRLIAQIASLGMDGA
 15 VIWGSSASVGSKNHCAQLMKYIADVLGPATLRIKENVARCSKQACSGRGRCTWPKDTSVIA
 WKFLVEKEDYDFYLGDIKCKVEGYEGRYCEQKTKGSAISQITDGQIQATTTATTEATTTA
 APSSTVETVSPSSTETISQQTENGAAKAAVGMGAGALAAAAMLL

SEC. ID NO.: 39 es una secuencia de aminoácido de hialuronidasa (HYAL) que procede de *Tityus serrulatus* con una señal de
 20 secreción N-terminal

MQFSTVASVAFVALANFVAAADFKVYWEVPSFLCSKRFKINVTEVLTSHEILVNQGESFNG
 DKIVIFYENQLGKYPHIDSNNVEINGGILQVADLAKHLKVAKNITKFVPNPNFNGVGVID
 WEAWRPSWEFNWGKLKVYKEKSIDLKSKHPEWPSDRVEKVAKEEWEESAKEWMVKTLKLA
 QEMRPNAVWCYYLFPDCYNYFGKDQPSQFSCSSRIQKENSRLSWLWNQSTAICLSIYIQES
 25 HVTKYNMSQRTWWIDARLREAIRVSEHRPNIPYINYLPGTNQTPAMDFKRTLQIA

SLGLDGALLWGSSYHVLTESQCKITSDYVKSVIAPTVATVVLNTNRCSQIICKGRGNCVWP
EFPFSSWKYLVDPKMPVFKPTNIHCKCKGYLGRYCEIPK

SEC. ID NO.: 40 es una secuencia de aminoácido de hialuronidasa
(HYAL) que procede de *Tityus serrulatus* con una señal de
5 secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal

MQFSTVASVAFVALANFVAAADFKVYWEVPSFLCSKRFKINVTEVLTSHEILVNQGESFNG
DKIVIFYENQLGKYPHIDSNNVEINGGILQVADLAKHLKVAKDNIKFPNPNFNGVGVID
WEAWRPSWEFNWGKLKVYKEKSIDLKSKHPEWPSDRVEKVAKEEWEESAKEWMVKTLKLA
QEMRPNAVWCYYLFPDCYNYFGKDQPSQFSCSSRIQKENSRLSWLWNQSTAICLSIYIQES
10 HVTKYNMSQRTWWIDARLREAIRVSEHRPNIPYINYILPGTNQTVPAMDFKRTLQIA
SLGLDGALLWGSSYHVLTESQCKITSDYVKSVIAPTVATVVLNTNRCSQIICKGRGNCVWP
EFPFSSWKYLVDPKMPVFKPTNIHCKCKGYLGRYCEIPKGSAISQITDGQIQATTTATTEA
TTTAAPSSTVETVSPSSTETISQQTENGAAKAAVGMGAGALAAAAMLL

SEC. ID NO.: 41 es una secuencia de aminoácido de hialuronidasa
15 (HYAL) que procede de *Vespa magnifica* con una señal de
secreción N-terminal

MQFSTVASVAFVALANFVAADSCGSNCEKSERPKRVFNINYWNVPTFMCHQYGLYFDEVNTF
NIKHNSKDNFQGDKIAIFYDPGEFPALLPLNYGKYKIRNGGVPQEGNITIHQRFIEYLDK
TYPNRNFSGIGVIDFERWRPIFRQNWGNMKIYKNFSIDLVRKEHPFWNKKMIELEASKRFE
20 KYARLFMEETLKLAKKTRKQADWGYGYPCFNMSPTNFVPDCDVTARDENNEMSWLFNNQ
NVLLPSVYIRRELTPDQRIGLVQGRVKEAVRISNKLKHSPKVFSYWWYVYQDETNTFLTET
DVKKTFQEIVINGGDGIIIWGSSSDVNSLSKCTRLREYLLTVLGPIAVNVTEAVN

SEC. ID NO.: 42 es una secuencia de aminoácido de hialuronidasa
(HYAL) que procede de *Vespa magnifica* con una señal de
25 secreción N-terminal y una señal de anclaje C-terminal

MQFSTVASVAFVALANFVAADSCGSNCEKSERPKRVFNINYWNVPTFMCHQYGLYFDEVTNF
 NIKHNSKDNFQGDKIAIFYDPGEFPALLPLNYGKYKIRNGGVPQEGNITIHQRFIEYLDK
 TYPNRNFSGIGVIDFERWRPIFRQNWGNMKIYKNFSIDLVRKEHPFWNKKMIELEASKRFE
 KYARLFMEETLKLAKKTRKQADWGYGYYPYCFNMSPTNFVPDCDVTARDENNEMSWLFNNQ
 5 NVLLPSVYIRRELTDPQRIGLVQGRVKEAVRISNKLKHSPKVFSYWYVYQDETNTFLTET
 DVKKTFQEIVINGGDGIIIWGSSSDVNSLSKCTRLREYLLTVLGPIAVNVTEAVNAISQIT
 DGQIQATTTATTEATTTAAPSSTVETVSPSSTETISQQTENGAAKAAVGMGAGALAAAAML
 L

SEC. ID NO.: 43 es una secuencia ácido nucleico de la secuencia
 10 de secreción adicionada en 5'

ATGCAATTTAGCACAGTCGCATCAGTAGCCTTCGTTGCCTTGGCCAACTTCGTGGCAGCA

SEC. ID NO.: 44 es una secuencia de aminoácido de la secuencia
 de secreción adicionada en N-ter

MQFSTVASVAFVALANFVAA

15 **SEC. ID NO.: 45** es una secuencia de ácido nucleico de la
 secuencia de anclaje adicionada en 3'

GGATCCGCCATTTCTCAAATCACTGACGGTCAAATCCAAGCTACTACCACTGCTACCACCG
 AAGCTACCACCACTGCTGCCCCATCTTCCACCGTTGAACTGTTTCTCCATCCAGCACCGA
 AACTATCTCTCAACAACTGAAAATGGTGCTGCTAAGGCCGCTGTCGGTATGGGTGCCGGT
 20 GCTCTAGCTGCTGCTGCTATGTTGTTATAA

SEC. ID NO.: 46 es una secuencia de aminoácido de la secuencia
 de anclaje adicionada en C-ter

AISQITDGQIQATTTATTEATTTAAPSSTVETVSPSSTETISQQTENGAAKAAVGMGAGAL
 AAAAMLL

25 **SEC. ID NO.: 47** es una secuencia de ácido nucleico de glutamina-

fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA1) que procede de
Saccharomyces cerevisiae

ATGTGTGGTATCTTTGGTTACTGCAATTATCTAGTGGAAAGATCCAGAGGAGAAATTATCG
 ACACCTTAGTGGATGGTTTACAAAGATTAGAATATAGAGGCTATGATTCCACCGGTATTGC
 5 TATCGATGGTGACGAAGCTGATTCTACTTTTCATCTATAAGCAAATCGGTAAAGTGAGTGCT
 TTGAAAGAGGAGATTACTAAGCAAAATCCGAACAGAGACGTTACTTTTGTCTCTCATTGTG
 GTATTGCGCATACTAGATGGGCTACTCACGGTCGACCAGAACAAGTTAACTGTCACCCTCA
 AAGATCTGACCCAGAAGACCAATTTGTGGTCGTTTCATAATGGTATCATCACAATTTTAGA
 GAACTGAAGACTCTTTTAATTAACAAAGGTTATAAATTCGAAAGTGATACCGATACCGAGT
 10 GTATTGCTAAACTATATTTGCATTTATACAATACAAATTTACAAAATGGGCATGACTTAGA
 TTTCCACGAATTAACCAAGCTAGTTCTTTTAGAACTAGAAGGTTTCATACGGGTTATTATGT
 AAATCTTGTCACTATCCTAATGAGGTTATCGCCACTAGAAAAGGGTCCCCTTTACTGATTG
 GTGTCAAATCTGAAAAAAAAACTAAAAGTCGACTTCGTGGATGTGGAATTTCCCGAAGAAAA
 CGCTGGTCAACCGGAAATTCCATTGAAATCTAACAACAAATCATTGGCTTGGGCCCAAAG
 15 AAAGCTCGTGAATTTGAAGCTGGTTCCCAAATGCCAATTTACTACCAATTGCCGCCAATG
 AATTTAACTTGAGACATTCTCAATCCAGGGCTTTCCTATCAGAAGATGGATCTCCAACACC
 GGTGGAATTTTTTTGTTTCTTCGGATGCGGCATCTGTTGTTAAACATACCAAGAAGGTGCTA
 TTTTGTAGAAGATGACGATTTGGCTCATATTTACGATGGTGAGTTACATATTCATAGATCTA
 GAAGAGAAGTAGGCGCATCAATGACAAGGTCCATTCAAACCTTTAGAGATGGAGTTAGCTCA
 20 GATCATGAAGGGCCCTTACGACCATTTTATGCAAAGGAAATCTATGAGCAACCAGAATCT
 ACTTTCAATACTATGAGAGGTAGAATCGACTATGAAAATAATAAAGTGATATTGGGTGGTT
 TAAAGGCATGGTTACCAGTTGTCAGAAGAGCACGGAGACTGATCATGATCGCATGCGGTAC
 TTCTTATCATTCATGTTTGGCTACTCGTGCTATCTTCGAAGAATTATCAGATATCCCAGTT
 AGTGTGGAATTAGCGTCTGACTTTCTGGACAGAAAATGCCCTGTCTTCAGAGACGATGTAT
 25 GCGTGTTTGTTCACAAAGTGGTGAAACTGCGGATACCATGCTGGCTCTAAATTATTGTTT

AGAAAGAGGAGCCTTAACGTGTCGGAATTGTAAACAGTGTTGGTTCTTCTATCTCTCGTGTC
 ACCCACTGTGGTGTTTCATATTAACGCTGGTCCTGAAATTGGTGTTGCCTCTACAAAAGCTT
 ATACTTCCCAGTATATTGCCTTAGTGATGTTTGCTCTATCGCTGTCAGATGACCGTGTATC
 GAAAATAGACAGAAGAATTGAAATCATTCAAGGCTTGAAGTTAATCCCGGGCCAAATTAAG
 5 CAGGTATTAAAGCTGGAACCAAGAATAAAAAAGCTCTGTGCGACTGAATTAAAGGATCAAA
 AATCTCTATTGTTATTGGGTAGAGGTTACCAATTTGCTGCTGCTCTGGAAGGTGCTTTGAA
 GATCAAAGAAATTTCTTATATGCATTCTGAAGGTGTTTTGGCAGGTGAGTTGAAGCACGGT
 GTCTTGGCCTTGGTGGACGAAAACCTTGCCAATCATTGCTTTTGGTACCAGAGACTCTCTAT
 TCCCTAAAGTAGTTTCCTCTATTGAGCAAGTTACTGTAAGAAAGGGCCATCCAATTATTAT
 10 TTGTAACGAAAATGATGAAGTGTGGGCGCAAAAATCTAAATCAATCGACCTGCAAACCTTA
 GAAGTTCCACAACTGTTGATTGTTTACAAGGTCTAATTAATATTATTCCATTACAATAA
 TGTCATATTGGTTGGCTGTTAATAAAGGGATTGATGTTGATTTTCCAAGAACTTGGCTAA
 ATCTGTTACCGTCGAATAA

SEC. ID NO.: 48 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
 15 de glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA1) que
 procede del virus *Chlorella 1* (PBCV-1)

ATGTGCGGGATCTTCGGTGCTGTGTGCGAACAATAATAGCATAGAAGTTTCCATCAAGGGTA
 TACAGAAGCTAGAGTACCGCGGGTACGATTCGTGTGGAATAGCCTATACAGACGGAGGCGC
 CATTGAACGGATCAGGTCAATAGATGGGATCGACGACTTAAGGAAGAAAACAATAACAGAG
 20 TCTTCCCCGGTAGCTATCGCTCATTCAAGGTGGAGTACCACTGGGATTCCAAGTGTTGTGA
 ACGCCCACCCGCACATCTCTCGGGGCACGTCTGGATGCGAGTCGCGCATTGCAGTCGTACA
 CAATGGCATTATTGAAAATTACCAGCAGATCCGCAAGTACTTGATAAATCTTGGGTATACT
 TTCGATTCACAGACCGACACGGAAGTCATTGCTCATCTAATAGACTCGCAGTATAACGGGA
 ACATCCTGCACACCGTCCAAATGGCAGTTAAGCACCTCAAAGGAAGCTACGCCATAGCAGT
 25 CATGTGCCATAAGGAGTCCGGGAAGATCGTGGTGGCAAAACAGAAGAGTCCGTTGGTATTG

GGTATAGGAAGCGACGGAGCTTATTATATCGCATCGGACGTATTGGCTCTTCCCACTAACA
 AAGTGGTCTACATAAGTGACGGATTCTCTGCTGAGTTAAGTCCTGGATCGATGACTATCTA
 TGATCTGGATGGCAATAAGGTAGAATACGAGGTGGAAGACGTTGAAATGGAGCAGACGTCG
 ATGTCCTTTAGATAACTTTGATCACTACATGATCAAAGAGATCAATGAACAGCCGATATCAA
 5 TTCTCAATACTATTAAGAACAAAGGATTCTATGCAGAGATATTTGGTGATCTAGCACATGA
 AATATTTCAGAAGATCGACAATATATTGATTCTAGCCTGCGGAAC TTCGATCATGCAGGT
 CTCGTCGGGAAGCAATGGATAGAGACCATCTCACGCATCCCGGTGGATGTTTCATATTGCAA
 GCGAGTATGAGCCGACAATTCCACGAGCCAATACACTTGTGATAACGATTAGTCAAAGCGG
 CGGAGACTGCGGATACAATCGCAGCCCTTCAACGAGCGCAAAACGCAGGAATGATATACACT
 10 TTGTGTATCTGCAACAGCCCCAAGTCAACTCTAGTGCGCGAGTCGATAATGAAATACATAA
 CCAAATGCGGTTTCAGAAGTTTCTGTTGCCAGTACTAAAGCATTTACGTCGCAACTTGTGGT
 GTTGTATATGCTTGCGAACGTTCTTGCGAACAAAACGATGATCTGCTAGGGGATCTTCCT
 CAAGCTATCGAGAGAGTAATCTGTCTTACTAATGACGAAATGAAGCGTTGGGCGGATGAAA
 TTTGTACTGCCAAAAGTGCCATCTTCTTAGGGAGAGGACTGAACGCACCTGTAGCATTTGA
 15 GGGCGCGCTAAAGTTGAAGGAAATCTCATATATCCATGCCGAGGGTTTCCTCGGTGGAGAG
 TTGAAGCATGGGCCGCTGGCTTTGTTGGACGATAAGATCCCTGTAATCGTGACTGTTGCTG
 ACCACGCTTATTTGGATCACATTAAGGCTAACATCGACGAGGTATTGGCACGAAACGTTAC
 CGTATACGCGATCGTCGATCAGTATGTTAATATTGAACCACAGGAGCGACTGCATGTAGTA
 AAAGTGCCGTTTGTGAGTAAAGAGTTTTCTCCCATCATCCACACAATTCCGATGCAATTGT
 20 TATCGTATTATGTCGCGATCAAGCTGGGCAAGAACGTTGACAAGCCACGTAACCTGGCGAA
 AAGTGTTACAACATTCTaa

SEC. ID NO.: 49 es una secuencia de ácido nucleico recodificada
 de glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA1) que
 procede del virus *Chlorella 1* (PBCV-1)

25 ATGTGTGGCATCTTTGGAGCAGTGTCAAACAACAACTCTATCGAGGTGTCAATCAAGGGTA

TTCAGAAGCTAGAATATCGTGGGTATGATTCGTGCGGTATTGCGTATACAGATGGGGGTGC
 GATTGAGCGTATACGTTCTATTGACGGCATTGACGATCTGCGTAAGAAAACAATCACAGAA
 TCATCACCAGTGGCCATTGCTCACTCGCGGTGGAGCACCCTGGAATTCCATCAGTGGTGA
 ACGCACATCCTCATATTTCTCGCGGAACCAGTGGGTGTGAGTCTCGTATCGCGGTAGTCCA
 5 CAACGGTATCATTGAAAACATCAGCAGATCCGAAAATATCTCATCAATCTTGGTTATACG
 TTTGATAGTCAAACGGACACAGAGGTCATTGCGCATTTGATTGATTCTCAGTACAATGGGA
 ATATCTTGCACACCGTCCAAATGGCTGTCAAGCACCTGAAGGGCTCTTATGCCATTGCAGT
 TATGTGTCATAAAGAGTCTGGTAAAATAGTCGTGGCGAAACAGAAGTCACCCCTCGTACTT
 GGAATCGGCTCAGATGGTGCTTACTACATCGCTTCGGACGTGCTGGCGCTGCCGACAAATA
 10 AAGTTGTTTATATTTTCAGACGGTTTCTCCGCAGAACTATCTCCAGGGAGTATGACCATTTA
 CGATCTTGATGGAAATAAAGTAGAATATGAAGTAGAGGACGTTGAAATGGAACAACTAGT
 ATGTCTCTCGATAACTTTGATCATTACATGATTAAGGAAATTAATGAGCAACCAATCAGTA
 TTCTAAACACTATAAAAAATAAAGGGTTCTATGCAGAAATATTCGGTGATTTGGCTCATGA
 AATCTTCCAAAAAATAGACAACATCCTGATACTGGCTTGTGGTACAAGTTATCACGCCGGT
 15 CTTGTAGGAAAACAGTGGATAGAGACCATCTCTAGAATCCCCGTGGATGTTACATCGCGA
 GTGAATACGAACCTACTATTCCGAGAGCGAACACATTGGTAATCACTATTTACAGTCGGG
 TGAAACTGCGGACACGATAGCGGCTTTGCAACGGGCCCCAAAACGCCGGGATGATTTATACA
 TTGTGTATTTGCAATTCACCAAAGAGCACTCTTGTTCTGTGAGAGCATTATGAAGTACATCA
 CGAAATGTGGTTCTGAGGTGTCAGTGGCATCAACGAAGGCGTTTACTTCTCAGCTCGTAGT
 20 ACTGTACATGCTGGCAAACGTATTGGCAAATAAAACCGATGATTTGCTGGGAGACCTCCCA
 CAGGCAATAGAACGGGTAAATTTGTTTGACAAATGACGAAATGAAACGATGGGCCGACGAAA
 TTTGCACTGCGAAATCCGCGATCTTCCTGGGAAGAGGACTAAACGCACCAGTTGCCTTTGA
 GGGAGCGTTGAAGCTCAAAGAAATCTCTTACATTCATGCAGAGGGCTTCCTGGGAGGTGAG
 TTGAAACACGGCCCCCTCGCACTCCTTGATGACAAGATTCCTGTTATCGTAACCGTAGCAG
 25 ATCATGCTTATTTGGACCATATCAAAGCAAATATCGACGAAGTGCTTGCGAGGAACGTTAC

GGTATACGCCATAGTAGACCAGTATGTGAACATCGAGCCCCAGGAACGCCTTCACGTCGTC
 AAGGTTCCGTTTGTATCCAAAGAATTTTCTCCGATAATTCACACTATCCCGATGCAACTGC
 TTTCGTATTACGTGGCAATTAAGCTTGGAAAGAACGTTGACAAACCAAGGAATCTTGCAAA
 ATCCGTGACTACCTTTTAA

- 5 **SEC. ID NO.: 50** es una secuencia de aminoácido de glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA1) que procede de *Saccharomyces cerevisiae*

MCGIFGYCNYLVERSRGEIIDTLVDGLQRLEYRGYDSTGIAIDGDEADSTFIYKQIGKVSA
 LKEEITKQNPNRDVT FVSHCGIAHTRWATHGRPEQVNCHPQRSDPEDQFVVHNGIITNFR
 10 ELKTL LINKGYKFESDTECIAKLYLHLYNTNLQNGHDLDFHELTKLV LLELEGSYGLLC
 KSCHYPNEVIATRKGSP LLIGVKSEKKLVDFVDVEFPEENAGQPEIPLKSNNKSFGLGPK
 KAREFEAGSQNANLLPIAANEFNLRHSQSRAFLSEDGSPTPVEFFVSSDAASVVKHTKKVL
 FLEDDDLAHIYDGELHIHRSRREVGASMTRSIQTLEMELAQIMKGPYDHFMQKEIYEQPES
 TFNTMRGRIDYENNKVILGGLKAWLPVVRARRRLIMIACGTSYHSCLATRAIFEELSDIPV
 15 SVELASDFLDRKCPVFRDDVCVFVSQSGETADTMLALNYCLERGALTVGIVNSVGSSISR
 THCGVHINAGPEIGVASTKAYTSQYIALVMFALSLSDDRVS KIDRRIEIIQGLKLIPGQIK
 QVLKLEPRIKKLCATELKDQKSL LLLGRGYQFAAALEGALKIKEISYMHSEGVLAGELKHG
 VLALVDENLP IIAFGTRDSLFPKVVSSIEQVTARKGHPIIICNENDEVWAQKSKSIDLQTL
 EVPQTVDC LQGLINIIP LQLMSYWLAVNKGIDVDFPRNLAKSVTVE

- 20 **SEC. ID NO.: 51** es una secuencia de aminoácido de glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA1) que procede del virus *Chlorella 1* (PBCV-1)

MCGIFGAVSNNSIEVSIKGIQKLEYRGYDSCGIAYTDGGAIERIRSIDGIDDLRKKTITE
 SSPVAIAHSRWSTTGIPSVVNAHPHISRGTSGCESRIAVVHNGI IENYQQIRKYLINLGYT
 25 FDSQTDTEVIAHLIDSQYNGNILHTVQMAVKHLKGSYAIAMCHKESGKIVVAKQKSPLVL

GIGSDGAYYIASDVLALPTNKVVYISDGFSAELSPGSMTIYDL DGNKVEYEVEDVEMEQT
 MSLDNFDHYMIKEINEQPISILNTIKNKGFYAEIFGDLAHEIFQKIDNILILACGTSYHAG
 LVGKQWIETISRIPVDVHIASEYEPTIPRANTLVITISQSGETADTIAALQRAQNAGMIYT
 LCICNSPKSTLVRESIMKYITKCGSEVSVASTKAFTSQLVVL YMLANVLANKTDDLLGDLP
 5 QAIERVICLTNDEMKRWADEICTAKSAIFLGRGLNAPVAFEGALKLKEISYIHAEGFLGGE
 LKHGPLALLDDKIPVIVTVADHAYLDHIKANIDEVLARNVTVYAIVDQYVNI EPQERLHV
 KVPFVSKEFSPIIHTIPMQLLSYYVAIKLGKNVDKPRNLAKSVTTF

SEC. ID NO.: 52 es una secuencia de ácido nucleico de UDP-N-
 acetilglucosamina pirofosforilasa (QRI1) que procede de
 10 *Saccharomyces cerevisiae*

ATGACTGACACAAAACAGCTATTCATTGAAGCCGGACAAAGTCAACTTTTCCACAATTGGG
 AAAGCTTGTCTCGCAAAGACCAAGAAGAATTGCTTTCAAACCTGGAGCAAATATCTTCCAA
 GAGGTCCCCTGCAAACTACTGGAAGACTGTCAAATGCTATTAAATTCTCACTAGCTAAC
 TCTTCTAAGGATACTGGCGTCGAAATTTACCATTGCCCCCTACTTCGTACGAGTCGCTTA
 15 TTGGCAACAGTAAGAAAGAAAATGAATACTGGCGTTTAGGCCTTGAAGCTATTGGCAAGGG
 TGAAGTCGCAGTGATTTTAATGGCTGGCGGACAAGGTACGCGGTTAGGATCCTCTCAACCA
 AAGGGCTGTTACGACATTGGATTGCCTTCTAAGAAATCTCTTTTTCAAATTCAAGCTGAAA
 AGTTGATCAGGTTGCAAGATATGGTAAAGGACAAAAAGGTAGAAATTCCTTGGTATATTAT
 GACATCAGGCCCCACTAGAGCGGCTACTGAGGCATACTTTCAAGAACACAATTATTTTGGC
 20 TTGAATAAAGAACAAATTACGTTCTTCAACCAGGGAACCCTGCCTGCCTTTGATTTAACCG
 GGAAGCATTTCTTAATGAAAGACCCAGTAAACCTATCTCAATCACCAGATGGAAATGGTGG
 ACTCTACCGTGCCATCAAGGAAAACAAGTTGAACGAAGACTTTGATAGGAGAGGAATCAAG
 CATGTTTACATGTACTGTGTCGATAATGTCCTATCTAAAATCGCAGACCCTGTATTTATTG
 GTTTTGCCATCAAGCATGGCTTCGAACTGGCCACCAAAGCCGTTAGAAAGAGAGATGCGCA
 25 TGAATCAGTTGGGTTAATTGCTACTAAAACGAGAAACCATGTGTCATAGAATATTCTGAA

ATTTCCAATGAATTGGCTGAAGCAAAGGATAAAGATGGCTTATTTAAACTACGCGCAGGCA
 ACATTGTAAATCATTATTACCTAGTGGATTTACTAAAACGTGATTTGGATCAGTGGTGTGA
 GAATATGCCATATCACATTGCGAAGAAGAAAATTCCAGCTTATGATAGTGTTACCGGCAAG
 TACACTAAGCCTACCGAACCAAACGGTATAAAATTAGAGCAATTCATATTTGATGTCTTTG
 5 AACTGTACCACTGAACAAGTTTGGGTGCTTAGAAGTAGATAGATGCAAAGAATTTTCACC
 TTTAAAAAACGGTCCTGGTTCTAAGAACGATAATCCTGAGACCAGCAGACTAGCATATTTG
 AACTAGGAACCTCGTGGTTGGAAGATGCAGGCGCTATTGTAAAAGATGGGGTACTAGTCG
 AAGTTTCCAGCAAATTGAGTTATGCAGGTGAAAATCTATCCCAGTTCAAAGGTAAAGTCTT
 TGACAGAAGTGGTATAGTATTAGAAAAATAA

10 **SEC. ID NO.: 53** es una secuencia de aminoácido de UDP-N-
 acetilglucosamina pirofosforilasa (QRI1) que procede de
Saccharomyces cerevisiae

MTDTKQLFIEAGQSQLFHNWESLSRKDQEELLSNLEQISSKRSPAKLLEDQCQNAIKFSLAN
 SSKDTGVEISPLPPTSYESLIGNSKKENEYWRLGLEAIGKGEVAVILMAGGQGTRLGSSQP
 15 KGCYDIGLPSKKSLEFQIQAEKLIRLQDMVKDKKVEIPWYIMTSGPTRAATEAYFQEHNYFG
 LNKEQITFFNQGTLPFDLTGKHFLMKDPVNLSQSPDGNGGLYRAIKENKLNEDFDRRGIK
 HVYMYCVDNVLSKIADPVFIGFAIKHGFELATKAVRKRDHESVGLIATKNEKPCVIEYSE
 ISNELAEAKDKDGLLKL RAGNIVNHYYLVDLLKRDLDQWCENMPYHIAKKKIPAYDSVTGK
 YTKPTEPNGIKLEQFIFDVFDTVPLNKFGCLEVDRCKEFSPLKNGPGSKNDNPETSRLAYL
 20 KLGTSWLEDAGAIKDGVLVEVSSKLSYAGENLSQFKGKVFDRSGIVLEK

SEC. ID NO.: 54 es una secuencia de ácido nucleico de
 fosfoglucomutasa-1 (PGM1) que procede *Saccharomyces*
cerevisiae

ATGTCACCTTCTAATAGATTCTGTACCAACAGTTGCTTATAAGGACCAAAAACCGGGTACT
 25 TCAGGTTTACGTAAGAAGACCAAGGTTTTTCATGGATGAGCCTCATTATACTGAGAACTTC

ATTCAAGCAACAATGCAATCTATCCCTAATGGCTCAGAGGGAACCACTTTAGTTGTTGGA
 GGAGATGGTCGTTTCTACAACGATGTTATCATGAACAAGATTGCCGCAGTAGGTGCTGCA
 AACGGTGTCAGAAAGTTAGTCATTGGTCAAGGCGGTTTACTTTCAACACCAGCTGCTTCT
 CATATAATTAGAACATACGAGGAAAAGTGTACCGGTGGTGGTATCATATTAAGTGCCTCA
 5 CACAACCCAGGCGGTCCAGAGAATGATTTAGGTATCAAGTATAATTTACCTAATGGTGGG
 CCAGCTCCAGAGAGTGTCCTAACGCTATCTGGGAAGCGTCTAAAAAATTAAGTCACTAT
 AAAATTATAAAGAACTTCCCCAAGTTGAATTTGAACAAGCTTGGTAAAAACCAAAAATAT
 GGCCCATTTGTTAGTGGACATAATTGATCCTGCCAAAGCATACGTTCAATTTCTGAAGGAA
 ATTTTTGATTTTGACTTAATTAAGCTTCTTAGCGAAACAGCGCAAAGACAAAGGGTGG
 10 AAGTTGTTGTTTGACTCCTTAAATGGTATTACAGGACCATATGGTAAGGCTATATTTGTT
 GATGAATTTGGTTTACCGGCAGAGGAAGTTCTTCAAATTGGCACCTTTACCTGATTTT
 GGCGGTTTACATCCCGATCCGAATCTAACCTATGCACGAACTCTTGTTGACAGGGTTGAC
 CGCGAAAAAATTGCCTTTGGAGCAGCCTCCGATGGTGATGGTGATAGGAATATGATTTAC
 GGTATGGCCCTGCTTTGTTTTGCCAGGTGATTCTGTTGCCATTATTGCCGAATATGCA
 15 CCCGAAATTCCATACTTCGCCAAACAAGGTATTTATGGCTTGGCACGTTCAATTCCTACA
 TCCTCAGCCATTGATCGTGTTGCAGCAAAAAAGGGATTAAGATGTTACGAAGTTCCAACC
 GGCTGGAAATTCTTCTGTGCCTTATTTGATGCTAAAAAGCTATCAATCTGTGGTGAAGAA
 TCCTTCGGTACAGGTTCCAATCATATCAGAGAAAAGGACGGTCTATGGGCCATTATTGCT
 TGGTTAAATATCTTGGCTATCTACCATAGGCGTAACCCTGAAAAGGAAGCTTCGATCAAA
 20 ACTATTCAGGACGAATTTTGAACGAGTATGGCCGTACTTTCTTCACAAGATACGATTAC
 GAACATATCGAATGCGAGCAGGCCGAAAAAGTTGTAGCTCTTTTGAGTGAATTTGTATCA
 AGGCCAAACGTTTGTGGCTCCCACTTCCCAGCTGATGAGTCTTTAACCGTTATCGATTGT
 GGTGATTTTTCGTATAGAGATCTAGATGGCTCCATCTCTGAAAATCAAGGCCTTTTCGTA
 AAGTTTTCGAATGGGACTAAATTTGTTTTGAGGTTATCCGGCACAGGCAGTTCTGGTGCA
 25 ACAATAAGATTATACGTAGAAAAGTATACTGATAAAAAGGAGAACTATGGCCAAACAGCT

GACGTCTTCTTGAAACCCGTCATCAACTCCATTGTAAAATTCTTAAGATTTAAAGAAATT
TTAGGAACAGACGAACCAACAGTCCGCACATAG

SEC. ID NO.: 55 es una secuencia de aminoácido
fosfoglucomutasa-1 (PGM1) que procede de *Saccharomyces*
5 *cerevisiae*

MSLLIDSVPTVAYKDQKPGTSGLRKKTVMDEPHYTENFIQATMQSIPNGSEGTTLVVGG
DGRFYNDVIMNKIAAVGAANGVRKLVIGQGGLLSTPAASHIIRTYEEKCTGGGIILTASHN
PGGPENDLGIKYNLPNGGPAPESVTNAIWEASKKLTHYKIIKNFPKLNLNKLGKNQKYGPL
LVDIIDPAKAYVQFLKEIFDFDLIKSFLAKQRKDKGWKLLFDSLNGITGPYGKAI FVDEFG
10 LPAAEVLQNWHLPLPDFGGLHPDPNLTYARTLVDRVDREKIAFGAASDGDGDRNMIYGYGPA
FVSPGDSVAIIAEYAPEIPYFAKQGIYGLARSFPTSSAIDRVAACKGLRCYEVPTGWKFFC
ALFDAKKLSICGEESFGTGSNHIREKDGLWAI IAWLNILAIYHRRNPEKEASIKTIQDEFW
NEYGRFFTRYDYEHEICEQA EKVVALLSEFVSRPNVCGSHFPADESLTVIDCGDFS YRDL
DGSISENQGLFVKFSNGTKFVLR LSGTGSSGATIRLYVEKYTDKKENYGQTADVFLKPVIN
15 SIVKFLRFKEILGTDEPTVRT

SEC. ID NO.: 56 es una secuencia de ácido nucleico de UTP--
glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (UGP1) que procede de
Saccharomyces cerevisiae

ATGTCCACTAAGAAGCACACCAAAACACATTCCACTTATGCATTCGAGAGCAACACAAACA
20 GCGTTGCTGCCTCACAAATGAGAAACGCCTTAAACAAGTTGGCGGACTCTAGTAAACTTGA
CGATGCTGCTCGCGCTAAGTTTGAGAACGA ACTGGATTTCGTTTTTACGCTTTTTCAGGAGA
TATTTGGTAGAGAAGTCTTCTAGAACCACTTGGAATGGGACAAGATCAAGTCTCCCAACC
CGGATGAAGTGGTTAAGTATGAAATTATTTCTCAGCAGCCCGAGAATGTCTCAAACCTTTC
CAAATTGGCTGTTTTGAAGTTGAACGGTGGGCTGGGTACCTCCATGGGCTGCGTTGGCCCT
25 AAATCTGTTATTGAAGTGAGAGAGGGAAACACCTTTTTGGATTTGTCTGTTCGTCAAATTG

AATACTTGAACAGACAGTACGATAGCGACGTGCCATTGTTATTGATGAATTCTTTCAACAC
 TGACAAGGATACGGAACACTTGATTAAGAAGTATTCCGCTAACAGAATCAGAATCAGATCT
 TTCAATCAATCCAGGTTCCCAAGAGTCTACAAGGATTCTTTATTGCCTGTCCCCACCGAAT
 ACGATTCTCCACTGGATGCTTGGTATCCACCAGGTCACGGTGATTTGTTTGAATCTTTACA
 5 CGTATCTGGTGAACCTGGATGCCTTAATTGCCCAAGGAAGAGAAATATTATTTGTTTCTAAC
 GGTGACAACCTTGGGTGCTACCGTCGACTTAAAAATTTTAAACCACATGATCGAGACTGGTG
 CCGAATATATAATGGAATTGACTGATAAGACCAGAGCCGATGTTAAAGGTGGTACTTTGAT
 TTCTTACGATGGTCAAGTCCGTTTATTGGAAGTCGCCCAAGTTCCAAAAGAACACATTGAC
 GAATTCAAAAATATCAGAAAGTTTACCAACTTCAACACGAATAACTTATGGATCAATCTGA
 10 AAGCAGTAAAGAGGTTGATCGAATCGAGCAATTTGGAGATGGAAATCATTCCAAACCAAAA
 AACTATAACAAGAGACGGTCATGAAATTAATGTCTTACAATTAGAAACCGCTTGTGGTGCT
 GCTATCAGGCATTTTGTATGGTGCTCACGGTGTTGTCGTTCCAAGATCAAGATTCTTGCCTG
 TCAAGACCTGTTCCGATTTGTTGCTGGTTAAATCAGATCTATTCCGTCTGGAACACGGTTC
 TTTGAAGTTAGACCCATCCCGTTTTTGGTCCAAACCCATTAATCAAGTTGGGCTCGCATTTTC
 15 AAAAAGGTTTCTGGTTTTAACGCAAGAATCCCTCACATCCCAAAAATCGTCGAGCTAGATC
 ATTTGACCATCACTGGTAACGTCTTTTTAGGTAAAGATGTCACTTTGAGGGGTACTGTCAT
 CATCGTTTGCTCCGACGGTCATAAAATCGATATTCCAAACGGCTCCATATTGGAAAATGTT
 GTCGTTACTGGTAATTTGCAAATCTTGGAACATTGA

SEC. ID NO.: 57 es una secuencia de aminoácido de UTP--glucosa-
 20 1-fosfato uridililtransferasa (UGP1) que procede de
Saccharomyces cerevisiae

MSTKKHTKTHSTYAFESNTNSVAASQMRNALNKLADSSKLDDAARAKFENELDSFFTLFRR
 YLVEKSSRTTLEWDKIKSPNPDEVVKYEIISQPENVSNLSKLAVLKLNGGLGTSMGCVGP
 KSVIEVREGNTFLDLSVRQIEYLNRYDSDVPLLLMNSFNTEKDKTEHLIKKYSANRIRIRS
 25 FNQSRFPRVYKDSLLPVPTEYDSPLDAWYPPGHGDLFESLHVSGELDALIAQGREILFVSN

GDNLGATVDLKILNHMIETGAEYIMELTDKTRADVKGGLISYDGQVRLLEVAQVPKEHID
 EFKNIRKFTNFNTNNLWINLKAVKRLIESSNLEMEIIPNQKTITRDGHEINVLQLETACGA
 AIRHFDGAHG VVVPRSRFLPVKTCSDLLL VKSDLFRLEHGS LKLDPSRFGPNPLIKLGSHF
 KKVSGFNARIPHIPKIVELDHLTITGNVFLGKDVTLRGTVIIVCSDGHKIDIPNGSILENV
 5 VVTGNLQILEH

SEC. ID NO.: 58 es una secuencia de ácido nucleico de Glucosamina 6-fosfato N-acetiltransferasa (GNA1) que procede de *Saccharomyces cerevisiae*

ATGAGCTTACCCGATGGATTTTATATAAGGCGAATGGAAGAGGGGGATTTGGAACAGGTCA
 10 CTGAGACGCTAAAGGTTTTGACCACCGTGGGCACTATTACCCCGAATCCTTCAGCAA
 CATAAAATACTGGAATGAAGCCACAGTATGGAATGATAACGAAGATAAAAAATAATGCAA
 TATAACCCCATGGTGATTGTGGACAAGCGCACCGAGACGGTTGCCGCTACGGGGAATATCA
 TCATCGAAAGAAAGATCATTCATGAACTGGGGCTATGTGGCCACATCGAGGACATTGCAGT
 AAACCTCCAAGTATCAGGGCCAAGGTTTGGGCAAGCTCTTGATTGATCAATTGGTAACTATC
 15 GGCTTTGACTACGGTTGTTATAAGATTATTTTAGATTGCGATGAGAAAAATGTCAAATTCT
 ATGAAAAATGTGGGTTTAGCAACGCAGGCGTGGAATGCAAATTAGAAAAATAG

SEC. ID NO.: 59 es una secuencia de aminoácido de Glucosamina 6-fosfato N-acetiltransferasa (GNA1) que procede de *Saccharomyces cerevisiae*

20 MSLPDGFYIRRMEEGDLEQVTETLKVLTTVGTITPESFSKLIKWNEATVWNDNEDKKIMQ
 YNPMVIVDKRTETVAATGNIIIERKIIHELGLCGHIEDIAVNSKYQGQGLGKLLIDQLVTI
 GFDYGCYKIILDCDEKNVKFYEKCGFSNAGVEMQIRK

SEC. ID NO.: 60 es una secuencia de ácido nucleico de fosfoacetilglucosamina mutasa (PCM1) que procede de
 25 *Saccharomyces cerevisiae*

ATGAAGGTTGATTACGAGCAATTGTGCAAACCTCTACGATGACACGTGCCGCACAAAGAATG
TGCAGTTCAGTTACGGTACGGCCGGATTTCAGAACGCTGGCCAAGAATTTGGATACGGTGAT
GTTTCAGTACTGGTATACTGGCGGTTCTCAGGTCGCTGAAGCTTCAGGGTCAGTATGTGGGG
GTGATGATCACGGCGTCGCACAACCCATACCAGGACAACGGGGTCAAGATCGTGGAACCAG
5 ACGGATCGATGCTTTTGGCCACATGGGAGCCATATGCCATGCAGTTGGCCAATGCGGCCTC
TTTTGCCACTAATTTTGAAGAATTTCTGTGTTGAGTTGGCCAAGCTGATTGAACACGAAAAG
ATTGATTTGAATACAACCGTCGTGCCTCACATCGTGGTTGGGAGAGACTCTAGGGAAAGTA
GTCCATACTTGCTGCGCTGCTTGACTTCCTCCATGGCCAGCGTCTTCCACGCGCAAGTTTT
GGACCTAGGCTGTGTCACTACGCCTCAATTGCATTACATTACTGATTTGTCCAACAGGCGG
10 AAAGTGAAGGAGACACAGCGCCAGTTGCCACAGAACAGGACTACTATTCGTTCTTTATAG
GAGCCTTCAACGAGCTCTTCGCCACGTATCAGCTGGAGAAGAGGCTGTCTGTCCCAAAT
GTTTCATAGACACAGCCAATGGTATCGGTGGTCCACAGTTGAAAAAACTACTGGCCTCCGAA
GATTGGGACGTGCCAGCGGAGCAAGTTGAGGTAATCAACGACAGGTCCGATGTTCCAGAAC
TGTTGAATTTTGAATGCGGTGCGGATTATGTGAAGACTAACCAGAGATTACCCAAGGGTCT
15 TTCTCCATCCTCGTTTGATTGCTATATTGCTCCTTTGATGGTGACGCAGACAGGGTTGTG
TTCTACTATGTCGACTCAGGATCAAAATTTCAATTTGTTGGATGGTGACAAAATTTCCACTT
TGTTTGCAAAGTTCTTGTCTAAACAACTAGAATTGGCACACCTAGAACATTCTTTGAAGAT
TGGTGTTGTGCAAACCTGCCTATGCAAACGGCAGTTCCACCGCTTACATAAAAAATACGTTG
CACTGTCCCGTGTCTTGCACTAAGACAGGTGTTAAACACTTGCATCATGAAGCTGCCACTC
20 AGTACGATATTGGCATTATTTTCGAAGCAAATGGACATGGTACGATTATATTCAGCGAAAA
ATTTTCATCGAACTATCAAATCTGAATTATCCAAGTCCAAGTTAAATGGTGATACGTTAGCT
TTGAGAACTTTGAAGTGTTTCTCTGAATTGATTAATCAGACCGTGGGAGATGCTATTTAG
ACATGCTTGCTGTCTTGCTACTTTGGCGATTTTGAAAATGTCGCCAATGGATTGGGATGA
AGAGTATACTGATTTGCCCAACAAGCTGGTTAAGTGCATCGTTCCTGATAGGTCAATTTTC
25 CAAACCACGGACCAGGAAAGAAAATTGCTCAATCCAGTGGGGTTGCAAGACAAGATAGATC

TTGTGGTAGCCAAGTATCCCATGGGAAGAAGCTTTGTCAGAGCCAGTGGTACGGAGGATGC
GGTGAGGGTTTATGCGGAATGTAAGGACTCCTCTAAGTTAGGTCAATTTTGTGACGAAGTG
GTGGAGCACGTTAAGGCATCTGCTTGA

SEC. ID NO.: 61 es una secuencia de aminoácido de
5 fosfoacetilglucosamina mutasa (PCM1) que procede de
Saccharomyces cerevisiae

MKVDYEQ LCKLYDDTCRTKNVQFSYGTAGFRTLAKNLDTVMFSTGILAVLRSLKLQGQYVG
VMITASHNPYQDNGVKIVEPDGSMLLATWEPYAMQLANAASFATNFEEFRVELAKLIEHEK
IDLNTTVVPHIVVGRDSRESSPYLLRCLTSSMASVFHAQVLDLGCVTTPQLHYITDLSNRR
10 KLEGDTAPVATEQDYYSFFIGAFNELFATYQLEKRLSVPKLFIDTANGIGGPQLKKLLASE
DWDVPAEQVEVINDRSDVPELLNFECGADYVKTNQRLPKGLSPSSFDSLYCSFDGDADRVV
FYYVDSGSKFHLLDGDKISTLFAKFLSKQLELAHLEHSLKIGVVQTAYANGSSTAYIKNTL
HCPVSCTKTGVKHLHHEAATQYDIGIYFEANGHGTTIIFSEKFHRTIKSELSKSKLNGDTLA
LRTLKCFSELINQTVGDAISDMLAVLATLAILKMSPMDWDEEYTDLPNKLVKCIVPDRSIF
15 QTTDQERKLLNPVGLQDKIDLVVAKYPMGRSFVRASGTEDAVRVYAECKDSSKLGQFCDEV
VEHVKASA

SEC. ID NO.: 62 es una secuencia de ácido nucleico de promotor
pTDH3

CTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATATAACATCGTA
20 GGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCTTGGCATCCACTAAATATAATGGAGCCCGCTTTTTTAA
GCTGGCATCCAGAAAAAAAAAAGAATCCCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTCACCAACCATC
AGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAA
CGGGCACAACTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATT
GACCCACGCATGTATCTATCTCATTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTCTGAT
25 TTGGAAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTGAAATTATTCCCCTACTTGACT

AATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTGTAAATCTATTTCTTAACTTC
 TTAAATTCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTTAAAACACCAAGAACTTAGTTTC
 GAATAAACACACATAAACAAACAAA

SEC. ID NO.: 63 es una secuencia de ácido nucleico de promotor

5 pTDH3.Sk

CAATTCATCGGCCCTTTTAGCGGCTACCCGCGCCATCTAAATGATAGGGCGGGTGACACTA
 TGGTAAATCCCATAATTAGGTGTCTGGGTGAGTGGTTCTGATGCCGGCATCCACTAAATAT
 ATTGGAGCCCATTTTTTACGCGGGCTTCCAGAAAAAAGAGAATCCCAGCACCAAAAAGGTG
 GTTCTCTTCACCAACCATCAGATCATAGGTCCACAACCACACATAACAGGGGCACAAAAAG
 10 GCAAAAAACGGACATAACCTCAATGGAGTGATGCAAATTGACTGGAGCAAAAAGCTGACACA
 AGGCATTGATTGACCTACGCATGTATCTGTATTCTTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTA
 ACTCTTTGGGTTGGAAAAAACTGAAAAAAAAGGTTGGGACCTGGTTCCCCCAAGTTGTCCC
 CCTACTTGGTTATTAAATATATAAAGACAGCAAGTGTTGATTATAATCTTGTAATCTATA
 GTTCTTAATCTATACTTCTATTTATATTTTAAATTAGTCTTTTTATTTCCAAGTCCCCAAG
 15 AACTTAGTTTCGAATAAACACACACAAATAAACACA

SEC. ID NO.: 64 es una secuencia de ácido nucleico de promotor

pTDH3-1.sba

GCAGCGCTTCTTCCGCTCTAGTTTTTATAGTTATTATTACTACCACCTTAAAAATACGTAA
 ATACTCAAAATAGTAGTGATATTCCCAACCTTATTCATCCAAGGCACATCATCATCAG
 20 CCATTCATCTTTCACCTGCCATTAGTAACCCGTCTTCTCATTGAGCGGGTTACGGCAGCCA
 CAGGCCACATTCCGAATGTCTGGGTGAGCGGTCCCTTTTCCAGCATCCACTAAATATCTCC
 GATCCCGCTTTTTAATCTGGCTTCCTGAAAAAAGAGAATCCCAGCACCAAAAAATGGCTC
 TCTTCACCAACCATCAGATCATAGGTCCCATTCTCTTACCGCAACCGTACAGAACAGGGGA
 AAACGGGTACAACCTCAATGGAGTGATGCAAATGACTGGAGCAAAAAGCTGACACAAGGC
 25 AATCGACCTACGTGTCTGTCTATTTTCTCACACCTTCTATTACCTTCTAACTCTCTGGGTT

GGAAAAAACTGAAAAAAGGTTGAGACCAGTTTCCACAAATCATCCCCCTGTTTGATTAAT
 AAATATATAAAGACGACAACCTATCGATCATAAACTCATAAACTATAACTCCTTTACACTT
 CTTATTTTATAGTTATTCTATTTTAATTCTTATTGATTTTAAAACCCCAAGAACTTAGTTT
 CGAAAACACACACACACAAACAATTAAAA

- 5 **SEC. ID NO.: 65** es una secuencia de ácido nucleico de promotor
 pTDH3.Sar

GAGCTAAATATCAGCCCTTCGGGTCCTGCCTGCTACCCGGTCCTGTTTGAATAAAAACGC
 GGGTAACACGACCCAGTAACACCTGTCGTTGGGTGTCTGGGTCAGAAGTTCTGATACCGG
 CTTCCACTAAATAGATTGGGTTCCGCTCTTTACGCTGGCTTCCTGAAAAAAGAGATTCCG
 10 GGCACCAAAAAATTGGTCTCTTTGCCAACCATCAGATCATAGGTCCATTCTCTTACCATA
 ACCACACAGGATAGGGGCACCACAGGCGAAAATGGGCACAAAATCTCAATGGAGTGATGC
 AAATTAGCTGGAACAAAAGCTGACACAAGGCAATTAACCTGCGCATGTATCCATCTCCTT
 TTCTTACACCTTCTCTTACGTTCTAACTGTTTGGGTTGGAAAAATTAAAAAAAAGGTT
 GAGACCAGTTTCCCCAAATCGTCCCCCTACTTGATTTCATAAATATATAAAGACGACAAC
 15 ATTGATTATAATCTTGTAATCTATAACTCTTTACTTTCTCCTATTTATAATTTAACTTA
 ATCTTTTTTAGATTTAAAACCCCAAGAACTTAGTTTCGAACAAACACACACAAATAAACAA
 AA

- SEC. ID NO.: 66** es una secuencia de ácido nucleico de promotor
 pEN02

20 CGCTCAGCATCTGCTTCTTCCCAAAGATGAACGCGGCGTTATGTCACTAACGACGTGCACC
 AACTTGCGGAAAGTGGAATCCCGTTCCAAAACCTGGCATCCACTAATTGATACATCTACACA
 CCGCACGCCTTTTTTCTGAAGCCCACTTTCGTGGACTTTGCCATATGCAAAATTCATGAAG
 TGTGATACCAAGTCAGCATAACCTCACTAGGGTAGTTTCTTTGGTTGTATTGATCATTTG
 GTTCATCGTGGTTCATTAATTTTTTTCTCCATTGCTTTCTGGCTTTGATCTTACTATCAT
 25 TTGGATTTTTGTGCAAGGTTGTAGAATTGTATGTGACAAGTGGCACCAAGCATATATAAAA

AAAAAAGCATTATCTTCCTACCAGAGTTGATTGTAAAAACGTATTTATAGCAAACGCAA
 TTGTAATTAATTCTTATTTTGTATCTTTTCTTCCCTTGTCTCAATCTTTTATTTTATTTT
 ATTTTCTTTTCTTAGTTTCTTTCATAACACCAAGCAACTAATACTATAACATACAATAAT
 A

- 5 **SEC. ID NO.: 67** es una secuencia de ácido nucleico de promotor
 pTEF3

GGCTGATAATAGCGTATAACAATGCATACTTTGTACGTTCAAAATACAATGCAGTAGATA
 TATTTATGCATATTACATATAATACATATCACATAGGAAGCAACAGGCGCGTTGGACTTTT
 AATTTTCGAGGACCGCGAATCCTTACATCACACCCAATCCCCACAAGTGATCCCCACAC
 10 ACCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTTTTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGCG
 CATCGCCGTACCACTTCAAAACACCCAAGCACAGCATACTAAATTTCCCCTCTTTCTTCCT
 CTAGGGTGTGTTAATTACCCGTACTAAAGGTTTGGAAAAGAAAAAGAGACCGCCTCGTT
 TCTTTTTCTTCGTGAAAAAGGCAATAAAAATTTTTATCACGTTTCTTTTTCTTGAAAATT
 TTTTTTTTTGATTTTTTTCTCTTTTCGATGACCTCCCATTGATATTTAAGTTAATAAACGGT
 15 CTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTTCTATTACAACTTTTTTTACTTCTT
 GCTCATTAGAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTTTAATTACAAA

- SEC. ID NO.: 68** es una secuencia de ácido nucleico de promotor
 pTEF1

GTTTAGCTTGCCTCGTCCCCGCCGGGTCACCCGGCCAGCGACATGGAGGCCCAGAATACCC
 20 TCCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCTCAGGGGCATGATGTGACTGTCGCCGTACATTTA
 GCCCATACATCCCCATGTATAATCATTTGCATCCATACATTTTGATGGCCGCACGGCGCGA
 AGCAAAAATTACGGCTCCTCGCTGCAGACCTGCGAGCAGGGAAACGCTCCCCTCACAGACG
 CGTTGAATTGTCCCACGCCGCGCCCCTGTAGAGAAATATAAAAGGTTAGGATTTGCCACT
 GAGGTTCTTCTTTTCATATACTTCCTTTTAAAATCTTGCTACGATACAGTTCTCACATCACA
 25 TCCGAACATAAACAACC

SEC. ID NO.: 69 es una secuencia de ácido nucleico de promotor pTEF1.ago

GTTTAGCTTGCCTCGTCCCCGCCGGGTCACCCGGCCAGCGACATGGAGGCCCAGAATACCC
 TCCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCTCAGGGGCATGATGTGACTGTCGCCCCGTACATTTA
 5 GCCCATACATCCCCATGTATAATCATTTCATCCATACATTTTGATGGCCGCACGGCGCGA
 AGCAAAAATTACGGCTCCTCGCTGCAGACCTGCGAGCAGGGAAACGCTCCCCTCACAGACG
 CGTTGAATTGTCCCCACGCCGCGCCCCTGTAGAGAAATATAAAAGGTTAGGATTTGCCACT
 GAGGTTCTTCTTTTCATATACTTCCTTTTAAAATCTTGCTACGATACAGTTCTCACATCACA
 TCCGAACATAAACAACC

10 **SEC. ID NO.: 70** es una secuencia de ácido nucleico de promotor pTEF1.Sba

CGCCAACAAACCTTCGAACACTTTAATTTTCGAGGACCGCAGATCCTCACATCACACCCAC
 ACCCAAGACTGCTTCCCCCACACACCCTGCATCTGTACACTTTCTTCTGCTCTGTTTTTCT
 CTCCGGCGTTCTCTCGGGTCGCCCGCATCGCCGCGCCGGCTGGAACCGCCACGCACCGCA
 15 TATTGCAAATCGCCTGCCCCCTTTGCTCCTTTTTGAGGGCGCGCCGTTACCCGCGCCCAG
 GGTCCGGAAGAAACAAGGCTCTACCGCGTTTCTTTTTCCTTGTCGAAAAAGGCAAAAA
 TGAAAATTTTTATCACGTTTCTTTTTTTTTGAAAAATTTTTTTTTTGGTTTTTTTTCTTTC
 GATGGCCTCCCATTTGATATTTAAGTTAATAAATGGTTTTTCAGTTTTCAAGTTTCAGTTTGT
 GTTCTTCTTTGCTAACTTTCACTTACACCTCGAAAGAAAGTATAGCAATCTAATCTTAGTT
 20 TTAATTACAA

SEC. ID NO.: 71 es una secuencia de ácido nucleico de promotor pPDC1

TTATTTACCTATCTCTAACTTCAACACCTTATATCATAACTAATATTTCTTGAGATAAGC
 AACTGCACCCATACCTTCCTTAAAAACGTAGCTTCCAGTTTTTGGTGGTTCCGGCTTCCT
 25 TCCCGATTCCGCCCGCTAAACGCATATTTTTGTTGCCTGGTGGCATTGCAAAATGCATAA

CCTATGCATTTAAAAGATTATGTATGCTCTTCTGACTTTTCGTGTGATGAGGCTCGTGGAA
 AAAATGAATAATTTATGAATTTGAGAACAAATTTGTGTTGTTACGGTATTTTACTATGGAA
 TAATCAATCAATTGAGGATTTTATGCAAATATCGTTTGAATATTTTTCCGACCCTTTGAGT
 ACTTTTCTTCATAATTGCATAATATTGTCCGCTGCCCCTTTTTCTGTTAGACGGTGTCTTG
 5 ATCTACTTGCTATCGTTCAACACCACCTTATTTTCTAACTATTTTTTTTTTAGCTCATTG
 AATCAGCTTATGGTGATGGCACATTTTTGCATAAACCTAGCTGTCCTCGTTGAACATAGGA
 AAAAAAATATATAACAAGGCTCTTTCCTCTCCTTGCAATCAGATTTGGGTTTGTTCCT
 TTTATTTTCATATTTCTTGTCATATTCCTTTCTCAATTATTATTTTCTACTCATAACCTCA
 CGCAAATAACACAGTCAAATCAATCAAA

10 **SEC. ID NO.: 72** es una secuencia de ácido nucleico de promotor
 pCCW12

aaccagggcaaagcaaaataaaaagAACTTAATACGTTATGCCGTAATGAAGGGCTACCAA
 AAACGATAATCTCAACTGTAAACAGGTACAATGCGGACCCTTTTGCCACAAAACATACATC
 ATTCATTGCCGAAAAAGAAAGAAGTGAAGACAGCAGTGCAGCCAGCCATGTTGCGCCAAT
 15 CTAATTATAGATGCTGGTGCCCTGAGGATGTATCTGGAGCCAGCCATGGCATCATGCGCTA
 CCGCCGGATGTAAATCCGACACGCAAAAGAAAACCTTCGAGGTTGCGCACTTCGCCCACC
 CATGAACCACACGGTTAGTCCAAAAGGGGCAGTTCAGATTCCAGATGCGGGAATTAGCTTG
 CTGCCACCCTCACCTCACTAACGCTGCGGTGTGCGGATACTTCATGCTATTTATAGACGCG
 CGTGTCGGAATCAGCACGCGCAAGAACCAAATGGGAAAATCGGAATGGGTCCAGAACTGCT
 20 TTGAGTGCTGGCTATTGGCGTCTGATTTCCGTTTTGGGAATCCTTTGCCGCGCGCCCCTCT
 CAAAACCTCCGCACAAGTCCCAGAAAGCGGGAAAGAAATAAAACGCCACCAAAAAAAAAAAT
 AAAAGCCAATCCTCGAAGCGTGGGTGGTAGGCCCTGGATTATCCCGTACAAGTATTTCTCA
 GGAGTAAAAAACCGTTTGTGTTTGAATTCCCATTTTCGCGGCCACCTACGCCGCTATCTT
 TGCAACAACCTATCTGCGATAACTCAGCAAATTTTGCATATTCGTGTTGCAGTATTGCGATA
 25 ATGGGAGTCTTACTTCCAACATAACGGCAGAAAGAAATGTGAGAAAATTTTGCATCCTTTG

CCTCCGTTCAAGTATATAAAGTCGGCATGCTTGATAATCTTTCTTTCCATCCTACATTGTT
 CTAATTATTCTTATTCTCCTTTATTCTTTCTAACATACCAAGAAATTAATCTTctgtcat
 tcgcttaaacactatatcaata

SEC. ID NO.: 73 es una secuencia de ácido nucleico de promotor

5 pCCW12.Sm

CGTTGTGCTGTAGTGAAGGAAGACTAAAAAGGATAATCACAGTTGTAAAGAGGTATAATGC
 GGACCCTTTTGCCACAAAACACACATCTTTCGTTTCCAAAATAAGAAAGAAGAAAGCAAAA
 AGATTAGCAGCCACGTTGCTGCGATCTAATTATAGACGGTGGCGTCATCATTCTCACCCAA
 GATTGTGTCTTGAACCTGCCACGGGTCTGCGTTATCGCCGGATGTAAACTAGACATGCA
 10 AAAAAAGGACCTTCCAGGTAGCGTGCTCCACACCACCCATGACCACCACAGTTAGTCCAAA
 AGAGGCAGCACCACTTCCCGATGGGGGAATTAGATTGCTGCCACCCTCACCTACTAATGC
 TGCGGTGTGCGGATATGCCCTGCTATATATAGCTCCGCGTTTTTTGAACCAGCACAGCGCGA
 GCACCAAAAAGGAAAATCGCATAGGCCCAGAACTGATTTTCAGCACGGGCTATTGGCGTTGG
 GTTTCCGTTCTGGGAAACCTTCGCCGCGTCCCCCTCACAAACCTCCGCACAAGTTCGAGCA
 15 AGCGGGAAAAAACGAAAAACGCCATTAATACTAAATAAAGCAAATCCTCGAAGCGTGGGTG
 GCAAGCCCCTGGATTTTTCCGCACAAGTACTCTTCTCAGGAGTAAAAAACCCGTTTGTTT
 TGGAATTCCTTCGCGGCCATCTACGCCGGTATCTTCGCAATATCTATCAGCGATAAC
 TCAGCAATTTTAATATTCGTGTTGCAGTGCTGCGATAGCGGGAGTCTTGTTTGTAACATAA
 CGGCAGAAAGGAATGAGAGAAAATTTTCCATTCTTTGGCCTCCGTTCAAGTATATAAAGCC
 20 GGCATGCTTGGTAATCTTTCTCTCTCTTCTGTATTGTTTCTATAATACTTTTATCTTCTAA
 TTATTTTCTGAAAAACCAAGAAATTAATCTTCTGTCATTCGCTTAAACACTATATCAATA

SEC. ID NO.: 74 es una secuencia de ácido nucleico de promotor

pCCW12.Sk

TGTAAAATCCTACACGCAAAAAACCTCTTGGGTTGCGCGTTTTCCACCACCCACGACCCGC
 25 ACAATCAATCCAAAAGGGGCAACGCCAGTTCCCAATGCGGGAATTAGCTCCTCACCCCCCT

CACCCGCTAACGCTGCGGTGTGCGGACACGCAGCAGTATTTATAGATCCTCGTGTTGGAAC
 CAGCCCGCGTGAGCACCAAATTGGAAAGTCGCAATGGGCCAGAACCGCTTTCAGTACTGG
 GCCATTGGCGTCTAGTTTCCGTTTTGAGCGTCCTTCGCCGCGTCTCTCTGTGAAATCCCCG
 CACAAGTCTGAGCAGGCAAAAAAAAAAACGCCACCAAAAATAAATAAAGCCAATCCTCGA
 5 AGGATGAGTAGGAAAGGAAGCCCCTGGTTTTTTCCCGCACGAATATTTTTCAGGAGTGAAA
 AAATCCGTTTGTGTTTGAATTCCCCATTTGCGGCTCACCTACGCCGGTATCTTTGGAACAA
 CTATCAGCGATAACTCAGCAAAATTTGCATATCCGTGCTGCAATAGTGCGATAGTGGGATT
 GGGAGTCTTGTTGCATCATAACGGCAGAAAGGAATGAATAAAAATTTTCCGTTCTTTGTCT
 CCGTTCAAGTATATAAAGTCGGCATGCTTGATTATCTTTTCTTCTTCTACTACATTTCT
 10 ATTTCACTTTCTACTCTATTCTTCCCTGAAAAACCCAAGAAAATAATCTTCTGTCATTTCG
 TTAAACAATATATCAAAA

SEC. ID NO.: 75 es una secuencia de ácido nucleico de promotor
pCCw12.Sba

ACCATGCCACGGTGCTGGCCCCACTTCCACCCACGACCCGCACGGTTGGCCCGAAAGGGGC
 15 AACACCAGTTCCCAATACGGAAATTAGTCCGCCACCACCCTCACCTCGCTAGAGCTGCGGT
 GTGCGGGCGTGTCATCGCTATTTATAGACATGCCTGCTGGCGTCACCGCGCGCGAGCACCAA
 ACAGGAAAATCGCACTGGGCCCAGAACCACGCTATGCGCTGGGCCGATGGCGTCCGGTTTC
 CCTTTGGGAGCCCCCTGCCACGTTTCGCCTAACAAATCCCCGCACCGGCTTGAGAAAAAAGC
 GAAAAGCGAAAAAAAAAAAAATCAACGCCACCAAAATTAAGAGCCATCCTCGAAGG
 20 GTGAATAGTAGCCCTGACTTTTCCCGCACAGACAGACACCTTTCAGGAGTGAACAAAAAA
 GCAGTTTGTGTTTGAATTCCCCATTTGCGGGTGGCCTGCGCAGGTATCTCTGCGTCAACT
 ATCAGCGATAACTCAGCAAAATTTGCATATTCGTGTTGCGATACTACGATAATGGGAGTCT
 GTCGCCTAATAACGGCAACAAGGAATGAGAGAGAAAAATTTTCTTCATTCTCCAGCTCCCG
 TTCAAGTATATAAGGTCGGCATGGTCGATTGTCTTTCCTTCTCTTCAGTTACGTCTCTCTA
 25 TTTACATTATTCTTATTTTTATTTAATAAAAACCCAAGAAATTAATCTTCTGTCATTTCG

TTAAACACTATATCAAAA

SEC. ID NO.: 76 es una secuencia de ácido nucleico de promotor
pCCW12.Sar

AAAAACAACCTTCTGCCAACCTGCGTGCTTCTCACCACCCATGACCCACACAATTGACCC
5 GAATGGGGCAACTCCAGTTCCCAATACGGGAATTAAGTCCGCCACCATATTTACCGCGTTGA
AGCTGTGGTGTGCGGACACTCCGTACTATTTATAGACCCACGCGGTGGAACCAGCACGCGC
GCGCACTAAACAGGAAAATCGCATTGAGTCCAGAACCGCCACCAGCACTTGGCCATTGGCG
TCTAATTTCCGTTTTTCGGCGCCCCCTCACCAGCGTCCTTCTAACAAGCGCGCACAAGCTTGA
GCAAGTGAAGAGAAAATTAAAAATAAAAAACCGCCACCAAAAACAAATAAAGCAATCTTCGA
10 AGTGTGGGTGTTGGTGGGAAGCCCCTGGCTTTTCCCGCACCAAGTCGTTTTTCAGGAGTAAAAAA
ATACCCGTTTGTGTTTGAATTCCCATTTTCGCGGCGACCTGCGCCGGTATCTTTGCAACAA
CTATTTGCGATAACTCAGCAAAATTTGCATATTCGTGTTGGGATATTGCGATAGTGGGAGT
CTTGTTGCATAATAACGGTAAAAAGAAGTGAAGGAAAAAATTTGCATCCTTTAGTCTCAG
TTCAAGTATATAAAGTCGGGATATTCAATTATCTTTCTTTCTTGTCTCAAAGGTTTCTAT
15 ATTTTTTTTATAGTATTTCTTTTGTATATAAAATACCAAGAAATTAATCTTCTGTCAATTCGC
TTAAATACTACATCAATA

SEC. ID NO.: 77 es una secuencia de ácido nucleico de promotor
pNUP57

TCATCTGCGCAATGACTATCAAGACCTTCTGCAAGAATTTCAAATCTCACTGAAAATCTTG
20 ACCGAAAAGTGTCTTGAAAACCCATCAAGCCTGCAAAACCTATCTTTGACATTAGTCTCCA
TTATAAAACGGCATAGTTGGGAGAAAACCTTCCATACTTCAATTGTGGACTGATATAAGT
ATTTTAGTTTTGCCCAGATGATCATCCACATGGCTACAGCAGTTCTCTCATAGGAAAATA
GTACAATAGCTACGTGATATAATCTAAATAATTGTTGCCAATGTGTAATTATATCATTTTTG
AACGTACGCGAAATGGATTATTTTCAAAAATTTTGTCTTGAATGAGTAAAAGCAAAAG
25 TCCAACCTCTCCAAGTCGATGTAAACAACCTTTTGGCAAAGGGACTGAAAGACTAAATCGAG

GATTATCCCGTTCAAACCTATTCCAGAAACGCTCGTTAGTAACAAAAGACATACCTTGTTGA
CCAATTGATCAC

SEC. ID NO.: 78 es una secuencia de ácido nucleico de promotor
pCCW10.ago

5 GGTACCACGGCAACCTCGTTCGCTGTTTCATCCCCTTCGTCACACAGGACGTTGGATGCCGT
AAGCAGCGTTGCTTTTGATCCTCagGATCGGCCGGGTAACCCGCGGGtGCTTCTATTTAG
TATTCATATCTCAAGCACATCCATTCCGGCCGTTTGGGGGCGCCGCCGCACTCGTGTCCAT
TCCTACCGTGGCACTTAGGGCTATCCTGTCGGAGCGCCCCGCCGACCGCCTTATCGGCACC
AAAAGTAGAAGCCCCGGCCCCGCGTGCTCAGACTCACCATCGGTGCTATTTACTTTTCGA
10 TCAGATCGCGGCGCGCGGTGGCCGGCATTTCGGAAGCGGCCACGGAGCAGAGGTGGCGCA
TTCGAATCGCATACGTCTTCGCCACGCCGGAATAATTTTCGGCTATATAAGGAGAGGC
GGCCGTCTTGCTGCAGGCAGTTTCACTTTCTCTAAAACCAAAGAACATCGATTTCTTTAGT
CACTCGCTTCCTTACACCGAACTCGAGGCGGCCGC

SEC. ID NO.: 79 es una secuencia de ácido nucleico de promotor

15 pCWP2
CTAGCCTCCCCTTTTTATTTTGTGCGGTCACCGCAAGGGACAAAGCTTTTCTTAGAAAACC
GTCTGAGAAGCATAACGTACGCCATCCCCTAGACATATTAATAATGCTACAGATACTATGC
TGCTCGTCTTTTTTTGACGACCCTTTTATTGCAATGTGCAACTAATGGCAAACAACCACAT
AGTATCACAGTATTACATTGCCTCCACCGATGCGGATGTTAGGGCGCCAAGTCTGTCATGA
20 AGCATGTTCTGTGTCATAATCTTGTATGCAAAATACCGCGTTCTGCGCCACTGATATGCTAG
GCAGCAGCAACCTATGCAGAAGATTGCTTTTCCCACGCCTGTTTTACGTCTCCAGGGCACT
TGAAACAATGCAGCGATCGCCGCCACAACACGCCAAAGAGAAGCGAAAGTGGGCCTGGGCG
GCCTCAGTTTCGGCAGAGGTAAACAACACGAACTGAACTGCCTTAGCTCCGAAGGGCAATT
CCACAGGCACTCCGCGGGGCCCCGGCCAAGGCCAAAAGGCGTGGAATATGCGCGTTTTGGG
25 GCCATAACACCCAGTACCACGGCCGGAACGGGCCATATAATAAGTTTTTCACTCTCAAGAA

TGGTAAACGTAAATAGGAACATCCCACTACCCTAGAAATTGCGGAAATTTTCGCGCTTATCA
 TTAGAAAATCTGGAACCGTCCTTTTTCTCTTTCTTGCAATTTCCCTTTCCGTATTATTGCC
 ATTCTTTAACTGCATTTGGGGAACCGTAGACCAAAAGCCAAACAGAGAAATGTAACGTTCT
 AAAAAAAAAACAACGAAAAAATTGAAAAATAAGATACAATAATCGTATATAAATCAGGCTT
 5 CTTGTTTCATCATTTTCAATTCTCTTCTTGCCATCCCTTTTCCTATCTTTGTTCTTTTCTTC
 TCATAATCAAGAATAAATAACTTCATCA

SEC. ID NO.: 80 es una secuencia de ácido nucleico de promotor
 pRPLA1

TCAAGTTGGATACTGATCTGATCTCTCCGCCCTACTACCAGGGACCCTCATGATTACCGCT
 10 CGAATGCGACGTTTTCCTGCCTCATAAACTGGCTTGAAAATATTTATTCGCTGAACAGTAG
 CCTAGCTTATAAAAATTTCAATTAATTAATGTAATATGAAAACACATGCCTTCTGTTTC
 TAAAATTGTCACAGCAAGAAATAACATTACCATACGTGATCTTATTAACTCTAGTATCTT
 GTCTAATACTTCATTTAAAAGAAGCCTTAACCCTGTAGCCTCATCTATGTCTGCTACATAT
 CGTGAGGTACGAATATCGTAAGATGATACCACGCAACTTTGTAATGATTTTTTTTTTTTCA
 15 TTTTTTAAAGAATGCCTTTACATGGTATTTGAAAAAATATCTTTATAAAGTTTGCGATCT
 CTTCTGTTCTGAATAATTTTTAGTAAAAGAAATCAAAGAATAAAGAATAGTCCGCTTTG
 TCCAATACAACAGCTTAAACCGATTATCTCTAAAATAACAAGAAGAA

SEC. ID NO.: 81 es una secuencia de ácido nucleico de promotor
 pCUP1

CGGCAAACTTCAACGATTTCTATGATGCATTTTATAATTAGTAAGCCGATCCCATTACCGA
 20 CATTTGGGCGCTATACGTGCATATGTTTCATGTATGTATCTGTATTTAAACACTTTTGTAT
 TATTTTTCTCATATATGTGTATAGGTTTATACGGATGATTTAATTATTACTTCACCACCC
 TTTATTTTCAGGCTGATATCTTAGCCTTGTTACTAGTTAGAAAAAGACATTTTTGCTGTCAG
 TCACTGTCAAGAGATTCTTTTGCTGGCATTCTTCTAGAAGCAAAAAGAGCGATGCGTCTT
 25 TTCCGCTGAACCGTTCCAGCAAAAAGACTACCAACGCAATATGGATTGTCAGAATCATAT

AAAAGAGAAGCAAATAACTCCTTGTCTTGTATCAATTGCATTATAATATCTTCTTGTTAGT
GCAATATCATATAGAAGTCATCGAAATAGATATTAAGAAAAACAACTGTACAATCAATCA
ATCAATCATCACATAAA

SEC. ID NO.: 82 es una secuencia de ácido nucleico de promotor

5 pMET6

CCACAGGAAATATTTACGTGACTTACAAACAGAGTCGTACGTCAGGACCGGAGTCAGGTG
AAAAAATGTGGGCCGGTAAAGGGAAAAAACAGAAACGGGACTACTATCGAACTCGTTTAG
TCGCGAACGTGCAAAAGGCCAATATTTTTCGCTAGAGTCATCGCAGTCATGGCAGCTCTTT
CGCTCTATCTCCCGGTCGCAAACTGTGGTAGTCATAGCTCGTTCTGCTCAATTGAGAACT
10 GTGAATGTGAATATGGAACAAATGCGATAGATGCACTAATTTAAGGGAAGCTAGCTAGTTT
TCCCAACTGCGAAAGAAAAAAGGAAAGAAAAAATTCTATATAAGTGATAGATATTTT
CATCTTTACTAGCATTAGTTTCTCTTTTACGTATTCAATATTTTTGTAACTCTTCCTTT
ATCATAAAAAAGCAAGCATCTAAGAGCATTGACAACACTCTAAGAAACAAAATACCAATAT
AATTTCAAAGTACATATCAAAA

15 **SEC. ID NO.: 83** es una secuencia de ácido nucleico de promotor
pMET25

TTACATTATCAATCCTTGCGTTTCAGCTTCCACTAATTTAGATGACTATTTCTCATCATTT
GCGTCATCTTCTAACACCGTATATGATAATATACTAGTAACGTAAATACTAGTTAGTAGAT
GATAGTTGATTTTTATTCCAACACTAAGAAATAATTTGCGCATTTCTTGAATGTATTTAAA
20 GATATTTAATGCTATAATAGACATTTAAATCCAATTCTTCCAACATACAATGGGAGTTTGG
CCGAGTGGTTTAAGGCGTCAGATTTAGGTGGATTTAACCTCTAAAATCTCTGATATCTTCG
GATGCAAGGGTTTGAATCCCTTAGCTCTCATTATTTTTTGCTTTTTCTCTTGAGGTCACAT
GATCGCAAAATGGCAAATGGCACGTGAAGCTGTCGATATTGGGGAAGTGTGGTGGTTGGCA
AATGACTAATTAAGTTAGTCAAGGCGCCATCCTCATGAAAAGTGTGTAACATAATAACCGA
25 AGTGTGCAAAAGGTGGCACCTTGTCCAATTGAACACGCTCGATGAAAAAATAAGATATAT

ATAAGGTTAAGTAAAGCGTCTGTTAGAAAGGAAGTTTTTCCTTTTTCTTGCTCTCTTGTCT
 TTTCATCTACTATTTTCCTTCGTGTAATACAGGGTCGTCAGATACATAGATACAATTCTATT
 ACCCCCATCCATACA

SEC. ID NO.: 84 es una secuencia de ácido nucleico de promotor
 5 pSAM1

GAAACGGACGTAAGACGGAAATAGAATTTGAAGATAAAGTTATATATCACTACACACGAAT
 ACTTTCTTTTTTTTTTTTTCACAGGAAACTGTGGTGGCGCCCTTGCCTACTAGTGCATTTT
 TTTTTTCGGGTTCTTGTCTCGAcGAAATTTTAGCCTCATCGTAGTTTTTCACTCTGGTATC
 GATGAAAAAGGGAAGAGTAAAAAGTTTTCCGTTTAGTACTTAATGGGATTGGTTTGGGACG
 10 TATATATCGACTGGTGTGTCTGTTATTCATCGTTGTTTTTCGGTTAGCTTCGAAAAAAAA
 ATAGAGTAAAAACCAGGAATTTACCCTAAAAACAAGAAAAATAAGATAAACGAAAAAT

SEC. ID NO.: 85 es una secuencia de ácido nucleico de terminador
 tTPI1

GATTAATATAATTATATAAAAAATATTATCTTCTTTTCTTTATATCTAGTGTTATGTAAAT
 15 AAATTGATGACTACGGAAAGCTTTTTTATATTGTTTCTTTTTCATTCTGAGCCACTTAAAT
 TTCGTGAATGTTCTTGTAAGGGACGGTAGATTTACAAGTGATACAACAAAAAGCAAGGCGC
 TTTTTCTAATAAAAAAGAAGAAAAGCATTTAACAATTGAACACCTCTATATCAACGAAGAAT
 ATTACTTTGTCTCTAAATCCTTGTAATGTGTACGATCTCTATATGGGTTACTCA

SEC. ID NO.: 86 es una secuencia de ácido nucleico de terminador
 20 tMET25

GTGTGCGTAATGAGTTGTAAAATTATGTATAAACCTACTTTCTCTCACAAGTACTATACTT
 TTATAAACGAACCTTTATTGAAATGAATATCCTTTTTTTCCCTTGTTACATGTCGTGACTC
 GTACTTTGAACCTAAATTGTTCTAACATCAAAGAACAGTGTTAATTCGCAGTCGAGAAGAA
 AAATATGGTGAACAAGACTCATCTACTTCATGAGACTACTTTACGCCTCCTATAAAGCTGT
 25 CACACTGGATAAATTTATTGTAGGACCAAGTTACAAAAGAGGATGATGGAGGTTT

SEC. ID NO.: 87 es una secuencia de ácido nucleico de terminador
tDIT1

TAAAGTAAGAGCGCTACATTGGTCTACCTTTTTGTTCTTTTACTTAAACATTAGTTAGTTC
GTTTTCTTTTTCTCATTTTTTTATGTTTCCCCCCAAAGTTCTGATTTTATAATATTTTAT
5 TTCACACAATTCCATTTAACAGAGGGGGAATAGATTCTTTAGCTTAGAAAATTAGTGATCA
ATATATATTTGCCTTTCTTTTCATCTTTTCAGTGATATTAATGGTTTCGAGACACTGCAAT
GGCCCTAGTTGTCTAAGAGGATAGATGTTACTGTCAAAGATGATATTTTGAATTTT

SEC. ID NO.: 88 es una secuencia de ácido nucleico de terminador
tRPL3

10 GAAGTTTTGTTAGAAAATAAATCATTTTTTAATTGAGCATTCTTATTCCTATTTTATTTAA
ATAGTTTTATGTATTGTTAGCTACATACAACAGTTTAAATCAAATTTTCTTTTTCCCAAGT
CCAAAATGGAGGTTTATTTTGATGACCCGCATGCGATTATGTTTTGAAAGTATAAGACTAC
ATACATGTACATATATTTAAACATGTAAACCCGTCCATTATATTGCTTACTTTCTTCTTTT
TTGCCGTTTTGACTTGGACCTCTGGTTTGCTATTTCTTACAATCTTTGCTACAAT

15 **SEC. ID NO.: 89** es una secuencia de ácido nucleico de terminador
tRPL3.sm

GAAGTTTTTAAAGCATTTTTTAGACACTTCTCATTTTTCTAAGTTTTTTTAAAATAGTTTT
ATGTATTTACTACGTATCACAATTTGAAATAATTCATCTTCCCAAAAACTAAGATTTTTTA
TCCTTGTCACGATCCGTAACCAGTTTATAATATTTTAGAGCTTATACACGTACGTATACAC
20 ACGTGTCGGTACATGAGAATTACGTTCAAATTATTCACCTTTTTTTTTCTCTGCCGTTTTA
CTTTTGAACCTCTGTCTCGCTATTTCTTACAATCTTCGCTACAATACCACTTGCCCTTGG

SEC. ID NO.: 90 es una secuencia de ácido nucleico de terminador
tRPL3.sba

GAAGTTTTCTGACAAAAACATAACGTTTTTCCAATCATTTCTTATTTTTCCGGTTTATTT
25 AAATAGTTTTTATGTACTATTATACGTATGACTATTTAACTTAAATTCTTCCTCCCAAGAA

ATCTCCCAAGTTTTTCATTATCATGGCATACACCACTATCAGTTACAAAATGGTAGCTCAA
CCATATATATATCTCTATATACACATATAAATGCAAACAGGTCCAAGTCACCGCTCACTGC
AGTTTCTTTTGCCGTTTTGACTTCGATCTCTGCTTGGCTATTTTCTCACAATCCT

SEC. ID NO.: 91 es una secuencia de ácido nucleico de terminador
5 tRPL41B

GCGGATTGAGAGCAAATCGTTAAGTTCAGGTCAAGTAAAAATTGATTTGAAAATAATTT
CTCTTATACAATCCTTTGATTGGACCGTCATCCTTTCGAATATAAGATTTTGTGAAGAATA
TTTGTAGACAGAGATCTACTTTATATTTAATATCTAGATATTACATAATTTCTCTCTAATA
AAATATCATTAAATAAAATAAAAAATGAAGCGATTTGATTTTGTGTTGTCAACTTAGTTTGCC
10 GCTATGCCTCTTGGGTAATGCTATTATTGAATCGAAGGGCTTTATTATATTACCCT

SEC. ID NO.: 92 es una secuencia de ácido nucleico de terminador
tRPL15A

GCTGGTTGATGGAAAATATAATTTTATTGGGCAAACCTTTTGTTTATCTGATGTGTTTTATA
CTATTATCTTTTTTAATTAATGATTCTATATACAAACCTGTATATTTTTTCTTTAACCAATT
15 TTTTTTTTTATAGACCTAGAGCTGTACTTTTATTCTGCTATCAAGCAAACCCCTACCCCT
CTTCTCAATCCTCCCCTCAGGCAGAACTTATCTACCTGTATCAAGGAGCGGACGAGGGAGT
CCTAATTGTTCTACGTATACCAATGCTAGCAGCTTACATAGGTGGTGGCACTACCA

SEC. ID NO.: 93 es una secuencia de ácido nucleico de terminador
tRPL15A.sba

20 GCTGGCTGATGAAAAATATAGTTCTGTTGGGCAAGCATTTGTTTACCTAGCATCTCTTTTA
TACTATTATTATCTTTATATTTGATGATTTTATATACAAGTTGTATACCTTTTCTTTAACC
AATTTTTTTTTTTCTAATGGTGCACCTAGAAGTACATTTTTTCTCACCAATAGATAGTCAA
GATACTCCCAGCCTCTATGGCGTTACCACGGAGCCGACAAGGGAAAGCTGCTTATCTTACA
TATGCAGATGCCAAGGCCCGTTACAGGCCGCCTTATTGATGTTTAGAAATAGCTTC

25 **SEC. ID NO.: 94** es una secuencia de ácido nucleico de terminador

tIDP1

TCGAATTTACGTAGCCCAATCTACCACTTTTTTTTTTTCATTTTTTAAAGTGTTATACTTAG
 TTATGCTCTAGGATAATGAACTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACTGTTATCATAAATATAT
 ATACCTTATTGTTGTTTGCAACCGTCGGTTAATTCCTTATCAAGGTTCCCCAAGTTCGGAT
 5 CATTACCATCAATTTCCAACATTTTCATGAGTTCTTCTTCTTCATTACCGTGTTTTAGGGG
 GCTGTTGCGCACTTCTAATAGGGCTATCACCAAGCTGTTCTAATTCGTCCAAAAGTT

SEC. ID NO.: 95 es una secuencia de ácido nucleico de terminador
 tTEF1.sba

GGAGATTGATAGGACTTTTCTAGTTGCATATCTTTTATTTTTAAATCTTATCTATTAGTTA
 10 ATTTTTTGTAATTTATCCTTATATATATAGTTTGGTTATTCTAAAACATCATTTTCAGTATC
 TAAACCTCTCTTATTCATTACCTTTTTATTTAATGGTTTTTGCTACAGGC AAAAATTTAA
 TGGTTTTTGCTACAGGC AAAAATCCCGCCGTGGACTTATTCCACGTAACTCGGTTACAGG
 GTCATGAACCATTTTGTCAATTATCGAAATAACTTCTTCAAAGTCCCTCTTACTT

SEC. ID NO.: 96 es una secuencia de ácido nucleico de Glutamina
 15 sintetasa (GLN1) que procede de *Saccharomyces cerevisiae*

ATGGCTGAAGCAAGCATCGAAAAGACTCAAATTTTACAAAAATATCTAGAACTGGACCAAA
 GAGGTAGAATAATTGCCGAATACGTTTGGATCGATGGTACTGGTAACTTACGTTCCAAAGG
 TAGAACTTTGAAGAAGAGAATCACATCCATTGACCAATTGCCAGAATGGAACCTTCGACGGT
 TCTTCTACCAACCAAGCGCCAGGCCACGACTCTGACATCTATTTGAAACCCGTTGCTTACT
 20 ACCCAGATCCCTTCAGGAGAGGTGACAACATTGTTGTCTTGGCCGCATGTTACAACAATGA
 CGGTACTCCAAACAAGTTCAACCACAGACACGAAGCTGCCAAGCTATTTGCTGCTCATAAG
 GATGAAGAAATCTGGTTTGGTCTAGAACAAAGAATACTCTATTTGACATGTATGACGATG
 TTTACGGATGGCCAAAGGGTGGGTACCCAGCTCCACAAGGTCCTTACTACTGTGGTGTTGG
 TGCCGGTAAGGTTTATGCCAGAGACATGATCGAAGCTCACTACAGAGCTTGTTTGTATGCC
 25 GGATTAGAAATTTCTGGTATTAACGCTGAAGTCATGCCATCTCAATGGGAATTCCAAGTCG

GTCCATGTACCGGTATTGACATGGGTGACCAATTATGGATGGCCAGATACTTTTTGCACAG
 AGTGGCAGAAGAGTTTGGTATCAAGATCTCATTCCATCCAAAGCCATTGAAGGGTGACTGG
 AACGGTGCCGGTTGTCACACTAACGTTTCCACCAAGGAAATGAGACAACCAGGTGGTATGA
 AATACATCGAACAAGCCATCGAGAAGTTATCCAAGAGACACGCTGAACACATTAAGTTGTA
 5 CGGTAGCGATAACGACATGAGATTAAGTGGTAGACATGAAACCGCTTCCATGACTGCCTTT
 TCTTCTGGTGTCGCCAACAGAGGTAGCTCAATTAGAATCCCAAGATCCGTCGCCAAGGAAG
 GTTACGGTTACTTTGAAGACCGTAGACCAGCTTCCAACATCGACCCATACTTGGTTACAGG
 TATCATGTGTGAAACTGTTTGCGGTGCTATTGACAATGCTGACATGACGAAGGAATTTGAA
 AGAGAATCTTCATAA

10 **SEC. ID NO.: 97** es una secuencia de aminoácido de Glutamina
 sintetasa (GLN1) que procede de *Saccharomyces cerevisiae*

MAEASIEKTQILQKYLELDQRGRIIAEYVWIDGTGNLRSKGRTLKKRITSIDQLPEWNFDG
 SSTNQAPGHDSDIYLPVAYYPDPFRRGDNIVVLAACYNNDGTPNKFNRHEAAKLFAAHK
 DEEIWFGLQEYTLFDMYDDVYGWPKGGYPAPQGPYYCGVGAGKVYARDMIEAHYRACLYA
 15 GLEISGINAEVMPSQWEFQVGPCTGIDMGDQLWMARYFLHRVAEEFGIKISFHPKPLKGDW
 NGAGCHTNVSTKEMRQPGGMKYIEQAIEKLSKRHAHEIKLYGSDNDMRLTGRHETASMTAF
 SSGVANRGSSIRIPRSVAKEGYGYFEDRRPASNIDPYLVTGIMCETVCGAIDNADMTKEFE
 RESS

SEC. ID NO.: 98 es una secuencia de ácido nucleico de Glutamato
 20 sintasa (GLT1) que procede de *Saccharomyces cerevisiae*

ATGCCAGTGTGAAATCAGACAATTTTCGATCCATTGGAAGAAGCTTACGAAGGTGGGACAA
 TTCAAACTATAACGATGAACACCATCTTCATAAATCTTGGGCAAATGTGATTCCGGACAA
 ACGAGGACTTTACGACCCTGATTATGAACATGACGCTTGTGGTGTCGGTTTCGTAGCAAAT
 AAGCATGGTGAACAGTCTCACAAGATTGTTACTGACGCTAGATATCTTTTAGTGAATATGA
 25 CACATCGTGGTGCCGTCTCATCTGATGGGAACGGTGACGGTGCCGGTATTCTGCTAGGTAT

TCCTCACGAATTTATGAAAAGAGAATTCAAGTTAGATCTTGATCTAGACATACCTGAGATG
GGCAAATACGCCGTAGGTAACGTCTTCTTCAAGAAGAACGAAAAAATAACAAGAAAAATT
TAATTAAGTGTCAGAAGATTTTCGAGGATTTAGCTGCATCCTTCAACTTATCCGTATTAGG
TTGGAGAAACGTCCCCGTAGATTCTACTATTTTAGGAGACGTTGCATTATCTCGTGAACCT
5 ACTATTCTACAGCCATTATTGGTTCCATTGTATGATGAAAAACAACCGGAGTTTAATGAAA
CTAAATTTAGAACTCAATTGTATCTTTTAAGGAAGGAGGCCTCTCTTCAAATAGGACTGGA
AAACTGGTTCTATGTTTGTTCCCTAAACAATACCACCATTGTTTACAAGGGTCAATTGACG
CCAGCTCAAGTGTATAACTACTATCCCGACTTGACTAATGCGCATTTCAAATCCCACATGG
CGTTGGTCCATTCAAGATTTTCCACTAATACTTTCCCTCTTGGGATAGAGCTCAACCTTT
10 ACGTTGGCTAGCTCATAATGGTGAAATTAACACCTTAAGAGGTAACAAGAATTGGATGCGC
TCCAGAGAAGGTGTGATGAATTCAGCAACTTTCAAAGATGAGTTAGACAACTATACCCAA
TTATCGAAGAAGGTGGTTCTGATTGAGCTGCATTGGATAACGTTTTAGAACTATTGACTAT
TAATGGCACATTATCTCTACCTGAAGCTGTTATGATGATGGTTCCTGAAGCGTATCATAAG
GATATGGATTCTGACCTAAAAGCATGGTACGACTGGGCTGCATGTCTGATGGAACCTTGGG
15 ATGGTCCAGCTTTGTAACTTTCACTGATGGACGTTACTGTGGTGCTATATTGGATAGAAA
TGGTTTAAGACCTTGTCGTTATTACATCACTAGTGATGACAGAGTTATCTGTGCTTCAGAG
GTAGGTGTCATTCCATCGAAAATTCATTGGTTGTTCAAAAAGGTAACTGAAGCCAGGTG
ATTTATTCCTAGTGGATACTCAATTGGGTGAAATGGTCGATACTAAAAAGTTAAATCTCA
AATCTCAAAAAGACAAGATTTTAAGTCTTGGTTATCCAAAGTCATCAAGTTAGACGACTTG
20 TTATCAAAAACCGCTAATTTGGTTCCTAAAGAATTTATATCACAGGATTCATTGTCTTTGA
AAGTTCAAAGTGACCCACGTCTATTGGCCAATGGTTATACCTTCGAACAAGTCACATTTCT
GTTAACTCCAATGGCTTTAACAGGTAAAGAAGCTTTAGGTTCGATGGGTAACGATGCGCCA
CTGGCTTGTTTAAATGAAAATCCTGTCTTACTTTATGATTATTTAGACAATTGTTTGCTC
AAGTGACCAATCCTCCAATTGACCCAATTCGTGAAGCAAATGTTATGTCGTTAGAATGTTA
25 TGTCGGACCTCAAGGCAACCTTTTGGAAATGCATTCATCTCAATGTGATCGTTTATTATTG

AAATCTCCTATTTTGCATTGGAATGAGTTCCAAGCTTTGAAAAACATTGAAGCTGCTTACC
 CATCATGGTCTGTAGCAGAAATTGATATCACATTTCGACAAGAGTGAGGGTCTATTGGGCTA
 TACCGACACAATTGATAAAATCACTAAGTTAGCGAGCGAAGCAATTGATGATGGTAAAAAG
 ATCTTAATAATTACTGACAGGAAAATGGGTGCCAACCGTGTTTCCATCTCCTCTTTGATTG
 5 CAATTTTCATGTATTCATCATCACCTAATCAGAAACAAGCAGCGTTCCCAAGTTGCTTTGAT
 TTTGGAAACAGGTGAAGCCAGAGAAATTCACCATTTCTGTGTCCTACTAGGTTATGGTTGT
 GATGGTGTGTTATCCATACTTAGCCATGGAACTTTGGTCAGAATGAATAGAGAAGGTCTAC
 TTCGTAATGTCAACAATGACAATGATACACTTGAGGAAGGGCAAATACTAGAAAATTACAA
 GCACGCTATTGATGCAGGTATCTTGAAGGTTATGTCTAAAATGGGTATCTCCACTCTAGCA
 10 TCCTACAAAGGTGCTCAAATTTTTGAAGCCCTAGGTTTAGATAACTCTATTGTTGATTTGT
 GTTTCACAGGTACTTCTTCCAGAATTAGAGGTGTAACTTTCGAGTATTTGGCTCAAGATGC
 CTTTTCTTTACATGAGCGTGGTTATCCATCCAGACAAACCATTAGTAAATCTGTAACTTA
 CCAGAAAGTGGTGAATACCACTTTAGGGATGGTGGTTACAAACACGTCAACGAACCAACCG
 CAATTGCTTCGTTACAAGATACTGTCAGAAACAAAAATGATGTCTCTTGGCAATTATATGT
 15 AAAGAAGGAAATGGAAGCAATTAGAGACTGTACACTAAGAGGACTGTTAGAATTAGATTTT
 GAAAATTCTGTCAGTATCCCTCTAGAACAAGTTGAACCATGGACTGAAATTGCCAGAAGAT
 TTGCGTCAGGTGCAATGTCTTATGGTTCTATTTCTATGGAAGCTCACTCTACATTGGCTAT
 TGCCATGAATCGTTTAGGGGCCAAATCCAATTGTGGTGAAGGTGGTGAAGACGCAGAACGT
 TCTGCTGTTCAAGAAAACGGTGATACTATGAGATCTGCTATCAAACAAGTTGCTTCCGCTA
 20 GATTCGGTGTAACCTTCATACTACTTGTGAGATGCTGATGAAATCCAAATTAAGATTGCTCA
 GGGTGCTAAGCCGGGTGAAGGTGGTGAACCTACCAGCCCACAAAGTGTCTAAGGATATCGCA
 AAAACCAGGCACTCCACCCCTAATGTTGGGTAAATCTCTCCTCCTCATCACGATATTT
 ATTCCATTGAAGATTTGAAACAACCTGATTTATGATTTGAAATGTGCTAATCCAAGAGCGGG
 AATTTCTGTAAAGTTGGTTTCCGAAGTTGGTGTGTTGATTGTTGCCTCTGGTGTAGCTAAG
 25 GCTAAAGCCGATCATATCTTAGTTTCTGGTCATGATGGTGGTACAGGTGCTGCAAGATGGA

CGAGTGTCAAATATGCGGGTTTGCCATGGGAATTAGGTCTAGCTGAAACTCACCAGACTTT
 AGTCTTGAATGATTTAAGACGTAATGTTGTTGTCCAAACCGATGGTCAATTGAGAACTGGG
 TTTGATATTGCTGTTGCAGTTTTATTAGGGGCAGAATCTTTTACCTTGGCAACAGTTCCAT
 TAATTGCTATGGGTTGTGTTATGTTAAGAAGATGTCACTTGAACCTTGTGCTGTTGGTAT
 5 TGCCACACAAGATCCATATTTGAGAAGTAAGTTTAAGGGTCAGCCCGAACATGTTATCAAC
 TTCTTCTATTACTTGATCCAAGATTTAAGACAAATCATGGCCAAGTTAGGATTCCGTACCA
 TTGACGAAATGGTGGGTCAATTCTGAAAAATTAAGAAAAGGGACGACGTAAATGCCAAAGC
 CATAAATATCGATTTATCTCCTATTTTGACCCCAGCACATGTTATTCGTCCAGGTGTTCCA
 ACCAAGTTCACTAAGAAACAAGACCACAAACTCCACACCCGTCTAGATAATAAGTTAATCG
 10 ATGAGGCTGAAGTTACTTTGGATCGTGGCTTACCAGTGAATATTGACGCCTCTATAATCAA
 TACTGATCGTGCACTCGGTTCTACTTTATCTTACAGAGTCTCGAAGAAATTTGGTGAAGAT
 GGTTTGCCAAAGGACACCGTTGTCGTTAACATAGAAGGTTCAAGCGGGTCAATCTTTTGGTG
 CTTTCCTAGCTTCTGGTATCACTTTTATCTTGAATGGTGATGCTAATGATTATGTTGGTAA
 AGGTTTATCCGGTGGTATTATTGTCATTAAACCACCAAAGGATTCTAAATTCAAGAGTGAT
 15 GAAAATGTAATTGTTGGTAACACTTGTTTCTATGGTGCTACTTCTGGTACTGCATTCATTT
 CAGGTAGTGCCGGTGAGCGTTTCGGTGTCAGAACTCTGGTGCCACCATCGTTGTTGAGAG
 AATTAAGGGTAACAATGCCTTTGAGTATATGACTGGTGGTCGTGCCATTGTCTTATCACAA
 ATGGAATCCCTAAACGCCTTCTCTGGTGCTACTGGTGGTATTGCATACTGTTTAACTTCCG
 ATTACGACGATTTTGTGGAAGATTAACAAAGATACTGTTGAGTTAGAATCATTATGTGA
 20 CCCGGTCGAGATTGCGTTTGTTAAGAATTTGATCCAGGAGCATTGGAACCTACACACAATCT
 GATCTAGCAGCCAGGATTCTCGGTAATTTCAACCATTATTTGAAAGATTTGTTAAAGTCA
 TTCCAACCTGATTATAAGAAAGTTTTGTTGAAGGAGAAAGCAGAAGCTGCCAAGGCAAAGGC
 TAAGGCAACTTCAGAATACTTAAAGAAGTTTAGATCGAACCAAGAAGTTGATGACGAAGTC
 AATACTCTATTGATTGCTAATCAAAAAGCTAAAGAGCAAGAAAAAAGAAGAGTATTACTA
 25 TTTCAAATAAGGCCACTTTGAAGGAGCCTAAGGTTGTTGATTTAGAAGATGCAGTTCCAGA

TTCCAAACAGCTAGAGAAGAATAGCGAAAGGATTGAAAAACACGTGGTTTTATGATCCAC
AAACGTCGTCATGAGACACACAGAGATCCAAGAACCAGAGTTAATGACTGGAAAGAATTTA
CTAACCTATTACCAAGAAGGATGCCAAATATCAAACCTGCGAGATGTATGGATTGTGGTAC
ACCATTCTGTTTATCTGATACCGGTTGTCCCCTATCTAACATTATCCCCAAGTTTAATGAA
5 TTGTTATTCAAGAACCAATGGAAGTTGGCACTGGACAAATTGCTAGAGACAAACAATTTCC
CAGAATTCAGTGAAGAGTATGTCCAGCACCTGTGAGGGAGCTTGTACACTAGGTATTAT
TGAAGACCCAGTCGGCATAAAATCGGTTGAAAGAATTATCATTGACAATGCTTTCAAGGAA
GGATGGATTAAGCCTTGTCCACCAAGTACACGCACTGGCTTTACAGTGGGTGTCATTGGTT
CTGGTCCAGCAGGTTTAGCGTGTGCTGATATGTTGAACCGTGCCGGACATACGGTCACTGT
10 TTATGAAAGATCCGACCGTTGTGGTGGGTTATTGATGTATGGTATTCCAAACATGAAGTTG
GATAAGGCTATAGTGCAACGTCGTATTGATCTATTGAGTGCCGAAGGTATTGACTTTGTTA
CCAACACCGAAATTGGTAAAACCATAAGCATGGATGAGCTAAAGAACAAGCACAATGCAGT
AGTGTATGCTATCGGTTCTACCATTCCACGTGACTTACCTATTAAGGGTCGTGAATTGAAG
AATATTGATTTTGCCATGCAGTTGTTGGAATCTAACACAAAAGCTTTATTGAACAAAGATC
15 TGGAAATCATTCGTGAAAAGATCCAAGGTAAGAAAGTAATTGTTGTCGGTGGTGGTGACAC
AGGTAACGATTGTTTAGGTACATCTGTAAGACACGGTGCAGCATCAGTTTTGAATTCGAA
TTGTTGCCTGAGCCACCAGTGGAAACGTGCCAAAGACAATCCATGGCCTCAATGGCCGCGTG
TCATGAGAGTGGACTACGGTCATGCTGAAGTGAAAGAGCATTATGGTAGAGACCCTCGTGA
ATACTGCATCTTGTCCAAGGAATTTATCGGTAACGATGAGGGTGAAGTCACTGCCATCAGA
20 ACTGTGCGCGTAGAATGGAAGAAGTCACAAAGTGGCGTATGGCAAATGGTAGAAATTCCCA
ACAGTGAAGAGATCTTTGAAGCCGATATCATTTTGTGTCTATGGGTTTCGTGGGTCCTGA
ATTGATCAATGGCAACGATAACGAAGTTAAGAAGACAAGACGTGGTACGATTGCCCACTC
GACGACTCCTCATACTCTATTGATGGAGGAAAGACTTTTGCATGTGGTGACTGTAGAAGAG
GGCAATCTTTGATTGTCTGGGCCATCCAAGAAGGTAGAAAATGTGCTGCCTCTGTCGATAA
25 GTTCCTAATGGACGGCACTACGTATCTACCAAGTAATGGTGGTATCGTTCAACGTGATTAC

AAACTATTGAAAGAATTAGCTAGTCAAGTCTAA

SEC. ID NO.: 99 es una secuencia de aminoácido de Glutamato sintasa (GLT1) que procede de *Saccharomyces cerevisiae*

MPVLKSDNFDPLEEAYEGGTIQNYNDEHHLHKSWANVIPDKRGLYDPDYEHDACGVGFVAN
 5 KHGEQSHKIVTDARYLLVNMTHRGAVSSDGNGDGAGILLGIPHEFMKREFKLDLDLDIPEM
 GKYAVGNVFFKKNEKNNKKNLIKQKIFEDLAASFNL SVLGWRNVPVDSTILGDVALSREP
 TILQPLLVPDYDEKQPEFNETKFRTQLYLLRKEASLQIGLENWFYVCSLNNTTIVYKGQLT
 PAQVYNYYPDLTNAHFKSHMALVHSRSTNTFPSWDRAQPLRWLAHNGEINTLRGNKNWMR
 SREGVMNSATFKDELDKLYPIIEEGGSDSAALDNVLELLTINGTSLPEAVMMMVP EAYHK
 10 DMDSDLKAWYDWAACLM EPWDGPALLTFTDGRYCGAILDRNGLRPCRYYYITSDDR VICASE
 VGVIP IENSLVVQKGK LKPGDLFLVDTQLGEMVDTKKLKSQISK RQDFKSWLSKVIK LDDL
 LSKTANLVPKEFISQDSL SLKVQSDPRLLANGYTFEQVTFLLTPMALTGKEALGSMGNDAP
 LACLNENPVLLYDYFRQLFAQVTNPPIDPIREANVMSLECYVGPQGNLLEMHSSQCDRLLL
 KSPILHWNEFQALKNIEAAYPSWSVAEIDITFDKSEGLLGYTDTIDKITKLASEAIDDGKK
 15 ILIITDRKMGANRVSISSLIAISCIHHHLIRNKQRSQVALIETGEAREIHHFCVLLGYGC
 DGVYPYLAMETLVRMNREGLLRNVNNDNDTLEEGQILENYKHAIDAGILKVMSKMGISTLA
 SYKGAQIFEALGLDNSIVDLCFTGTSSRIRGVTFEYLAQDAFSLHERGYPSRQTISKSVNL
 PESGEYHFRDGGYKHVNEPTAIASLQD TVRNKNDVSWQLYVKKEMEAI RDCTLRGLLELDF
 ENSVSIPLEQVEPWTEIARRFASGAMSYGSISMEAHSTLAIAMNRLGAKSNCGEGGEDAER
 20 SAVQENGDTMRSAIKQVASARFGVTSYYLSDADEIQIKIAQGA KPGE GELPAHKVSKDIA
 KTRHSTPNVGLISPPPHDIYSIEDLKQLIYDLKCANPRAGISVKLVSEVGVGIVASGVAK
 AKADHILVSGHDGGTGAARWTSVKYAGLPWELGLAETHQTLVLNDLRRNVVQTDGQLRTG
 FDI AVAVLLGAESFTLATVPLIAMGCVMLRRCHLN SCAVGIATQDPYLRSKFKGQPEHVIN
 FFYYLIQDLRQIMAKLGFRTIDEMVGHSEKLKKRDDVNAKAINIDLSPILTPAHVIRPGVP
 25 TKFTKKQDHLHTRLDNKLIDEAEVTLDRGLPVNIDASIINTDRALGSTLSYRVSKKFGED

GLPKDTVVVNIEGSAGQSFGAFLASGITFILNGDANDYVGKGLSGGIIVIKPPKDSKFKSD
 ENVIVGNTCFYGATSGTAFISGSAGERFGVRNSGATIVVERIKGNNAFEYMTGGRAIVLSQ
 MESLNAFSGATGGIAYCLTSDYDDFVGKINKDTVELESLCDPVEIAFVKNLIQEHWNYTQS
 DLAARILGNFNHYLKDFVKVIPTDYKKVLLKEKAEAAKAKAKATSEYLKKFRSNQEVDDEV
 5 NTLLIANQKAKEQEKKKSITISNKATLKEPKVVDLEDAVPDSKQLEKNSERIEKTRGFMIH
 KRRHETHRDPRTVRVNDWKEFTNPITKKDAKYQTARCMDCGTPFCLSDTGCPLSNIIPKFNE
 LLFKNQWKLALDKLLETNNFPEFTGRVCPAPCEGACTLGIIEDPVGIKSVERIIIDNAFKE
 GWIKPCPPSTRTGFTVGVIGSGPAGLACADMLNRAGHTVTVYERSDRCGLLMYGIPNMKL
 DKAIVQRRIDLLSAEGIDFVTNTEIGKTISMDELKNKHNAVVAIGSTIPRDLPIKGRELK
 10 NIDFAMQLLESNTKALLNKDLEIIREKIQGKKVIVVGGGDTGNDCLGTSVRHGAASVLNFE
 LLPEPPVERAKDNPWPQWPRVMRVDYGHAEVKEHYGRDPREYCILSKEFIGNDEGEVTAIR
 TVRVEWKKSQSGVWQMVEIPNSEEIFEADIILLSMGFVGPELINGNDNEVKKTRRGTIATL
 DDSSYSIDGGKTFACGDCRRGQSLIVWAIQEGRKCAASVDKFLMDGTTYLPSNGGIVQRDY
 KLLKELASQV

15 **SEC. ID NO.: 100** es una secuencia de ácido nucleico de
 terminador tTDH3

GTGAATTTACTTTAAATCTTGCATTTAAATAAATTTTCTTTTTATAGCTTTATGACTTAGT
 TTCAATTTATATACTATTTTAATGACATTTTCGATTCATTGATTGAAAGCTTTGTGTTTTT
 TCTTGATGCGCTATTGCATTGTTCTTGTCTTTTTTCGCCACATGTAATATCTGTAGTAGATA
 20 CCTGATACATTGTGGATGCTGAGTGAAATTTTAGTTAATAATGGAGGCGCTCTTAATAATT
 TTGGGGATATTGGCTTTTTTTTTTAAAGTTTACAAATGAATTTTTTCCGCCAGGAT

SEC. ID NO.: 101 es una secuencia de ácido nucleico
 recodificada de hialuronano sintasa (HASA) que procede de virus
Chlorella CviKI

25 ATGCTTTTCAGTTGTTTGTCTTCGTGATCTGCCATCTTAGTTTTATTTTGC GTTATTACA

AGAGGCTTCTAAAAGTGACGATGGGAAAGAACATTATAATAATGGTGAGTTGGTACACAAT
AATAACTTCCAACATCATCGCCGTCGGTGGGGCGTCTCTGATTTTGGCCCCAGCCATCACT
GGATACATCTTGCACTGGAACATCGCCTTGTCAACCATCTGGGGAGTTTCCGCTTATGGGA
TATTCGTGTTTCGGATTCTTCCTGGCTCAGGTTTTATTTAGTGAGCTAAATCGTAAAAGACT
5 AAGAAAGTGGATTTCTCTAAGACCAAAGGGTTGGAACGACGTACGTCTGGCTGTCATCATA
GCTGGTTACAGGGAAGACCCGTACATGTTTCAGAAATGCCTTGAGTCAGTAAGGGACTCTG
ACTATGGTAATGTCGCTCGTCTTATCTGTGTAATTGACGGAGATGAGGACGACGACATGAA
GATGGCAGCCGTTTATAAGGCGATATATAATGACAATATCAAGAAGCCAGAGTTTGTGTTA
TGTGAGAGCGATGATAAGGAAGGCGAGAGAATTGACTCAGATTTTAGCAGGGACATCTGCG
10 TCTTACAACCACACCGTGGCAAAAGGGAGTGCTTGTATACCGGCTTTCAGCTGGCCAAAAT
GGACCCGTCGGTAAACGCCGTTGTTCTTATTGACTCTGACACGGTCTTGAAAAGGACGCA
ATCTTGGAAGTCGTGTATCCATTGGCCTGTGACCCGGAATTCAAGCTGTCGCAGGAGAGT
GCAAAATATGGAACACAGATACACTTTTGTGCTTGTGGTGGCTTGGAGATATTATTCAGC
CTTTTGCCTGGAGAGATCCGCCCAATCATTCTTTAGGACAGTCCAGTGTGTAGGTGGACCC
15 TTGGGCGCCTACAAGATAGATATCATCAAAGAGATCAAAGATCCCTGGATCTCCCAACGTT
TCTTAGGTCAGAAGTGACCTACGGTGACGACCGTAGGTTAACAAATGAAATCTTAATGAG
GGGTAAGAAGGTCGTCTTCACTCCTTTTCGCAGTTGGCTGGAGTGACTCACCAACCAACGTG
TTCAGGTACATCGTACAACAGACTAGGTGGAGTAAATCATGGTGCCGTGAGATATGGTACA
CTTTGTTTGTGCTGCGTGGAAGCACGGACTAAGCGGAATTTGGTTGGCATTGAGTGCCTTTA
20 TCAGATTACGTACTTCTTCCTAGTCATATATTTATTTTCGAGACTAGCCGTTGAAGCTGAC
CCAAGAGCACAGACCGCAACAGTAATCGTGTCTACCACGGTAGCCCTGATTAAGTGTGGTT
ACTTCTCTTTTCGTGCGAAAGATATTCGTGCTTTCTACTTCGTCCTGTACACATTTGTCTA
CTTCTTCTGTATGATCCCAGCAAGGGTGACAGCCATGATGACACTTTGGGATATCGGCTGG
GGCACGCGTGGCGGAAACGAGAAACCAAGTGTGGCACTAGGGTCGCTCTGTGGGCTAAAC
25 AGTATTTGATAGCATACATGTGGTGGGCAGCAGTTGTTGGCGCTGGGGTATACTCCATTGT

TCATAATTGGATGTTTGACTGGAACCTCACTATCCTATAGGTTTCGCACTTGTAGGTATATGC
TCTTACATCGTATTCATCACAATCGTTCTAGTCATCTATTTACAGGAAAGATTACCACAT
GGAATTTACCAAATTACAGAAGGAGTTAATCAAGGATAGGGTCTTATACGATGCTTCCAC
TAACGCCCAGACTGTATAA

5 **SEC. ID NO.: 102** es una secuencia de ácido nucleico
recodificada de hialuronano sintasa (HASA) que procede de virus
Chlorella IL-5-2s1

ATGGCTGCTTCATTCTATGTTATCTTCTTGTTTCGTAATATGCCACCTGTCCTTCGTCTTAT
ATCGTCAAGTTCTATACATAATTTTGGGTAGATACTGGAGTGTTAACAAGCTGACAATGAT
10 CTCTTGGTATACCATTATATCATCTAATCTAATCGCAATCGGTGGGGCTTCCCTTATTTTG
GCACCGGCCATAACCGGCTACATTTTGCATTGGAACATAGCTCTAAGCACAATTTGGGGTG
TGTCAGCCTATGGCATTTCGTGTTCCGGTTCCTTCTTGCTCAGGTTTTGTTTCAGTGAGCT
TAACAGGAAGAGGTTGAGAAAATGGATCTCTTTGAGACCAGATAACTGGAACGCGGTGAGA
GTTGCCGTGATAATCGCTGGTTACCGTGAAGACCCATACATGTTTCAAAGTGTTTGAAT
15 CGGTGAGAGACTCCGATTATGGTAACATTGCGAGGCTTATATGCGTTATAGATGGGGACGA
AGATGACGACATGAAGATGGCAGATGTATACAAGGCTATTTACAATGACAATATAAAGAAG
CCGGAAATTATCCTATGTGAGTCCGACGACAAAGAGGGAGAAAGGATAGACAGTGATTTTA
GCCGTGATATTTGCGTGCTTCAGCCTCACAGAGGTAAGCGTGAATGTTTATATACTGGCTT
TCAGTTAGCTAAAATGGACCCCTCTGTACACGCGGTTGTGCTTATTGACTCGGATACAGTT
20 TTGGAGAAGGATGCCATCCTGGAAGTGGTCTACCCACTTGCTTGCGACCATGAGATTCAAG
CAGTCGCAGGTGAATGCAAGATATGGAATACGGACACCTTATTATCCATATTAGTCGCCTG
GCGTTACTACTCAGCTTTCTGCGTTGAGCGTAGCGCTCAGTCCTTCTTCCGTACTGTGCAA
TGCGTCGGCGGTCCGTTAGGGGCATACAAAATAGACATAATTAAGAGATAAAGGAGCCGT
GGATTTACAAAGATTTCTGGGTCAGAAGTGTACGTACGGAGATGACAGAAGATTAATAA
25 CGAAGTGTTGATGCGTGGAAGAAAGTAGTCTTCACACCTTTTGCGGTAGGATGGAGCGAC

TCGCCTACTAATGTCTTCCGTTATATTGTGCAGCAGACGAGGTGGAGTAAGAGCTGGTGCA
 GGGAGATTTGGTATACACTGTTTCGCGGCGTGGAAGCATGGGTTATCAGGCATTTGGTTGGC
 ATTTGAGTGCTTGTATCAGATCACATACTTCTTTCTAGTGATATATCTGTTTCAGTAGACTA
 GCAGTCGAGGCTGACCCGAGAGCGCAAACCTGCAACGGTTATAGTCAGCACAATGGTTTCAC
 5 TAATCAAGTGTGGATATTTCTCATTCCGTGCTAAGGACATTAGAGCGTTTTATTTCTGACT
 ATATACTTTTGTGTACTTCTTTTGCATGATCCCAGCAAGAGTCACTGCTATGATGACCTTG
 TGGGATATTGGGTGGGGTACTAGGGGTGGAAACGTGAAACCATCGATCGGAACTAGGATCT
 CTTTGTGGGCTAAGCAGTACTTAATCGCGTACATGTGGTGGGCAGCTGTGATCGCCGCAGG
 AGTCTATAGTATAATACATAATTGGATGTTTGATTGGAACCTCTTGTCTATCGTTTCGCG
 10 TTAATAGGCATCTGCTCGTATATCGTATTCATTGCCATTGTTATAGTGATATACTTCACAG
 GTAAGATCACCACCTTGGAATTTTACCAAGCTACAGAAAGAGTTAATTGAAGATAGAGTCTT
 GCATGATGCCGATGTGGACATACAGAACGTATAA

SEC. ID NO.: 103 es una secuencia de ácido nucleico
 recodificada de hialuronano sintasa (HASA) que procede de virus
 15 *Chlorella* CZ-2

ATGACATCTTGGAGAACGATTGTGTCAGCTAACCTTTTCGCAGTTGGTGGGGCTCTTCTAA
 TGTTAGCCCCAGCTATCGTGGGCTATGTATTTCAGTGGAATATAGGCGTGTCCGCAGTCTG
 GGGCATCTCCGTATACGGCGTCTTTGTGTTGGGATTTTATATCGCTCAAATCGTCTTCTCT
 GAGTTCAACAGGATGAGATTATCCGATTGGATAAGTCTTAGACCAGACAACTGGAACGCCA
 20 CAAGGGTTGCGGTCATTATAGCTGGATACAGAGAAGATCCTTTTATGTTCAAGAAGTGCTT
 AGAGAGTGTGAGGGATTTCGGAATACGGCAACGTAGCAAGGCTTATATGCGTAATTGACGGA
 GACGAAGAAGAGGACCTAAAGATGGCTGAGATTTACAAGCAGGTTTACAATGACAACGTGA
 AGAAACCAGGTGTAGTGTTATGCGAATCGGAGAACAAGAATGGATCGACTATAGATTCCGA
 CGTATCTAAGAATATATGCATACTGCAACCCACCGTGGGAAACGTGAGAGCCTATATACC
 25 GGTTCCTCAATTGGCAAGCATGGACCCTTCCGTACATGCGGTTGTTCTTATAGATTCCGACA

CTGTATTAGAGAAGAATGCTATTCTTGAGGTCGTATACCCTCTATCTTGTGACCCCAACATTAA
 GGCCGTCGCCGGGGAGTGCAAGATATGGAATACAGACACCATCTTGTCCATGCTTGTCTCTTGG
 AGATACTTCTCTGCCTTCAATGTGCGAGCGTGGAGCCCAGTCATTATGGAAGACTGTGCAATGCG
 TAGGCGGGCCACTTGGCGCATACACTATCGACATCATAAATGAAATTAAAGACCCGTGGATTAC
 5 CCAGACATTCTGGGCAACAAGTGCACTTATGGCGACGATAGACGTCTTACCAATGAGGTTTTA
 ATGAGGGGCAAGAAGATTGTATACACTCCGTTTGCCGTCGGTTGGAGCGACAGTCCGACGAATG
 TCATGAGGTACATTGTGCAGCAAAGTAGATGGAGTAAGTCATGGTGCAGAGAGATATGGTACAC
 GTTAGGCAGTGCCTGGAAACATGGATTCTCCGGCATATACCTTGCGTTTGAGTGTATGTACCAG
 ATAATGTACTTCTTCTTAGTCATGTACCTGTTTTCTGTATATCGCAATAAAGGCAGACATCCGTG
 10 CTCAGACTGCAACTGTGTTGGTTTTCTACTCTAGTCACCATAATAAAGAGCAGTTACCTAGCGCT
 GAGGGCCAAGAACCTGAAGGCTTTCTATTTCTGTATACCTATGTCTATTTCTTTTGCATG
 ATACCTGCTAGGATTACCGCTATGTTTACAATGTTTGATATAGCTTGGGGTACACGTGGTGGTA
 ATGCGAAAATGACAATCGGGGCTAGAGTTTGGCTGTGGGCGAAGCAGTTCTTAATAACTTATAT
 GTGGTGGGCAGGAGTACTAGCGGCGGGAGTTTACAGTATAGTTGACAATTGGTACTTCGATTGG
 15 GCTGATATACAGTACAGGTTTGCATTGGTAGGTATTTGCTCGTATTTGGTCTTTGTGAGTATTG
 TACTGGTAATCTACTTGATCGGTAAGATAACAACGTGGAAGTACACACCGCTACAGAAGGAACT
 TATTGAGGAGAGATACTTGCATAACGCCTCTGAGAATGCCCCGGAAGTTTAA

SEC. ID NO.: 104 es una secuencia de ácido nucleico
 recodificada de hialuronano sintasa (HASA) que procede de virus
 20 *Chlorella CVG-1*

ATGACTTCTTGCGGTACAATTGTTTCTGCTAACTTGTTTCGCAGTTGGTGGCGCCTTGTTGA
 TGTTAGCTCCCGCGATAGCCGTTATGTATTTAAATGGAACATAGGCGTTTCTGCCGTTTG
 GGGTATTTCAGTGTACGGGGTCTTCGTGCTTGGTTTCTATATTGCACAGGTAGTCTTCAGC
 GAGTTTAATAGGATGCAGCTGTCAGACTGGATCTCATTGAGACCCGACAAGTGAACGCCA
 25 CCAGAGTAGCGGTAATTATTGCTGGTTACAGGGAAGACCCCTTTATGTTCAAGAAGTGCCT

AGAATCTGTGAGAGACTCAGAATACGGGAACATAGCGAGGCTAATCTGTGTTATCGACGGC
 GATGAAGAGGAAGACCTTAAGATGGCTGAGATATACAAGCAAGTATACAACGACAACGTCA
 AGACCCCCGGTGTTGTGCTATGCGAGAATGAAAATAAGAATGGTAGCACCATTGACCCAGA
 TTTTAGTAAGAACATCTGCATTCTGCAACCACACAGGGGCAAACGTGAATCTTTGTACACC
 5 GGATTCCAGATGGCTGGCATGGACCCATCAGTGCACGCAGTTGTACTTATAGACAGTGATA
 CTGTTCTTGAAAAGAACGCTATCCTAGAGGTTGTGTACCCTCTATCTTGTGATCCAAATAT
 CAAAGCTGTCGCGGGAGAGTGTAATCTGGAACACAGATACCATTTTGTCTATGCTAGTT
 TCATGGCGTTATTTCTCGGCTTTCAACGTGGAGAGAGGCGCACAGTCCCTTTGGAAAACAG
 TCCAGTGTGTCGGCGGGCCTTTGGGAGCATACACTATAGACATCATAAACGAGATAAAAGA
 10 CCCCTGGATTACTCAGACATTCTTAGGAAACAAATGTACGTATGGTGACGACAGAAGGTTA
 ACCAATGAAGTGCTTATGAGGGGAAAGAAGATTGTCTATACTCCCTTTGCTGTGCGTTGGT
 CCGATTGCCCCACAAACGTTATGAGGTACATCGTCCAGCAGACAAGGTGGTCTAAGAGCTG
 GTGCCGTGAGATTTGGTACACCTTGGGATCAGCATGGAAACATGGTTTCTCCGGAATCTAC
 TTAGCGTTGAGTGCATGTACCAGATTATGTATTTCTTTATTGTGATGTATTTGTTTCAGTT
 15 ACATTGCCATTAAAGCCAACATCAGGGCACAAGCAGCCACGGTATTGGTCAGTACGCTTGT
 CGCAGTAATCAAATCTAGTTATTTGGCATTAAAGAGCGAAGAACCTAAAAGCTTTGTATTTT
 GTCCTGTATACCTACGTCTACTTCTTCTGCATGATTCCAGCTAGAATAACAGCGATGTTCA
 CGATGTTTCGATATTGCATGGGGTACTAGAGGCGGTAACGCAAAGATGACGATCGGTGCTAG
 AGTCTGGTTGTGGGCTAAACAATTCTTAATTACATACATGTGGTGGGTGGGAGTTTTGGCC
 20 GCTGGGGTCTACAGTATAGTCGATAACTGGTACTTCGACTGGGCGGACATCCAGTACAGAT
 TCGCGCTAGTGGGGATTTGCAGTTACTTAGGTTTCGTTTCCATAATGCTGGTATTCTATCT
 GATTGGTAAAATAACTACGTGGAATTACACTCCTCTACAAAAGGAGCTGATTAAAGAGAGG
 TTACACGCCGCTAATGCAACAGAGGTCTAA

SEC. ID NO.: 105 es una secuencia de aminoácido de hialuronano
 25 sintasa (HASA) que procede de virus *Chlorella CviKI*

MLFSCLSFVICHLSFILRYYKRLKVTMGKNIIIMVSWYTIITSNIIAVGGASLILAPAIT
 GYILHWNIALSTIWGVSAygIFVFGFFLAQVLFSELNRKRLRKWISLRPKGWNVRLAVII
 AGYREDPYMFQKCLESVRDSYGNVARLICVIDGDEDDDMKMAAVYKAIYNDNIKKPEFVL
 CESDDKEGERIDSDFSRDICVLQPHRGKRECLYTGFQLAKMDPSVNAVVLIDS DTVLEKDA
 5 ILEVYPLACDPEIQAVAGECKIWNTDTLLSLLVAWRYSSAFCVERSAQSFRTVQCVGGP
 LGAYKIDIIKEIKDPWISQRFLGQKCTYGDDRRLTNEILMRGKKVVFTPFVAVGWS DPTNV
 FRYIVQQTRWSKSWCREIWYTLFAAWKHGLSGIWLAFECLYQITYFFLVIYLF SRLAVEAD
 PRAQTATVIVSTTVALIKCGYFSFRAKDIRAFYFVLYTFVYFFCMIPARVTAMMTLWDIGW
 GTRGGNEKPSVGTRVALWAKQYLIAYMWWAAVVGAGVYSIVHNW MFDWNSLSYRFALVGIC
 10 SYIVFITIVLVIYFTGKITTWNFTKLQKELIKDRVLYDASTNAQTV

SEC. ID NO.: 106 es una secuencia de aminoácido de hialuronano sintasa (HASA) que procede de virus *Chlorella IL-5-2s1*

MAASFYVIFL FVICHLSFVLYRQVLYIILGRYWSVNKLT MISWYTIISSNLIAIGGASLIL
 APAITGYILHWNIALSTIWGVSAygIFVFGFFLAQVLFSELNRKRLRKWISLRPDNWN AVR
 15 VAVIIAGYREDPYMFQKCLESVRDSYGN IARLICVIDGDEDDDMKMADVYKAIYNDNIKK
 PEIILCESDDKEGERIDSDFSRDICVLQPHRGKRECLYTGFQLAKMDPSVHAVVLIDS DTV
 LEKDAILEVYPLACDHEIQAVAGECKIWNTDTLLSILVAWRYSSAFCVERSAQSFRTVQ
 CVGGPLGAYKIDIIKEIKEP WISQRFLGQKCTYGDDRRLTNEVLMRGKKVVFTPFVAVGWS D
 SPTNVFRYIVQQTRWSKSWCREIWYTLFAAWKHGLSGIWLAFECLYQITYFFLVIYLF SRL
 20 AVEADPRAQTATVIVSTMVSLIKCGYFSFRAKDIRAFYFVLYTFVYFFCMIPARVTAMMTL
 WDIGWGTRGGNVKPSIGTRISLWAKQYLIAYMWWAAVIAAGVYSIIHNW MFDWNSLSYRFA
 LIGICSYIVFIAIVIVYFTGKITTWNFTKLQKELIEDRVLHDADVDIQNV

SEC. ID NO.: 107 es una secuencia de aminoácido de hialuronano sintasa (HASA) que procede de virus *Chlorella CZ-2*

25 MTSWRTIVSANLFAVGGALLMLAPAIVGYVFQWNIGVSAVWGISVYGVFVLGFYIAQIVFS

EFNRMRLSDWISLRPDNWNATRVAVIIAGYREDPFMFKKCLESVRDSEYGNVARLICVIDG
 DEEEDLKMAEIKQVYNDNVKKPGVVLCESENKNGSTIDSDVSKNICILQPHRGKRESLYT
 GFQLASMDPSVHAVVLIDSDTVLEKNAILEVVYPLSCDPNIKAVAGECKIWNTDTILSMLV
 SWRYFSAFNVERGAQSLWKTVCVGGPLGAYTIDIINEIKDPWITQTFLGNKCTYGDDRRL
 5 TNEVLMRGKKIVYTPFAVGWSDSPTNVMRYIVQQTRWSKSWCREIWTLGSAWKHGFSGIY
 LAFECMYQIMYFFLVMYLF SYIAIKADIRAQTATVLVSTLVTTIKSSYLALRAKNLKAIFY
 VLYTYVYFFCMIPARITAMFTMFEDIAWGTRGGNAKMTIGARVWLWAKQFLITYMWWAGVLA
 AGVYSIVDNWYFDWADIQYRFALVGICSYLVFVSIVLVIYILIGKITTWNYTPLQKELIEER
 YLHNASENAPEV

10 **SEC. ID NO.: 108** es una secuencia de aminoácido de hialuronano
 sintasa (HASA) que procede de virus *Chlorella CVG-1*

MTSWRTIVSANLFAVGGALLMLAPAIAGYVFKWNIGVSAVWGISVYGVFVLGFYIAQVVF
 EFNRMQLSDWISLRPDNWNATRVAVIIAGYREDPFMFKKCLESVRDSEYGNVARLICVIDG
 DEEEDLKMAEIKQVYNDNVKTPGVVLCENENKNGSTIDPDFSKNICILQPHRGKRESLYT
 15 GFQMAGMDPSVHAVVLIDSDTVLEKNAILEVVYPLSCDPNIKAVAGECKIWNTDTILSMLV
 SWRYFSAFNVERGAQSLWKTVCVGGPLGAYTIDIINEIKDPWITQTFLGNKCTYGDDRRL
 TNEVLMRGKKIVYTPFAVGWSDSPTNVMRYIVQQTRWSKSWCREIWTLGSAWKHGFSGIY
 LAFECMYQIMYFFIVMYLF SYIAIKANIRAQAATVLVSTLVAVIKSSYLALRAKNLKAIFY
 VLYTYVYFFCMIPARITAMFTMFEDIAWGTRGGNAKMTIGARVWLWAKQFLITYMWWVGVLA
 20 AGVYSIVDNWYFDWADIQYRFALVGICSYLGFVSIMLVFYILIGKITTWNYTPLQKELIKER
 LHAANATEV