

## **REIVINDICACIONES**

1. Una célula de levadura recombinante que produce ácido hialurónico (HA) caracterizada porque 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, de modo que la célula de levadura 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

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

en donde tal 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*.

2. Una célula hospedera recombinante que produce ácido hialurónico (HA) caracterizada porque 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).

3. La célula recombinante de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque el peso molecular del HA está en el intervalo de menos de 50 kDa, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 50 kDa.

4. La célula recombinante de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque el peso molecular del HA está en el intervalo superior a 50 kDa, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 250 kDa.

5. La célula recombinante de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque el peso molecular del HA está en el intervalo superior a 100 kDa, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 100 kDa a aproximadamente 1500 kDa.

6. La célula recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad glutamina sintetasa se obtiene o deriva de *Saccharomyces cerevisiae*.

7. La célula recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque 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*.

8. La célula recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad hialuronano sintasa se obtiene o deriva de *Streptococcus zooepidemicus*, virus *Chlorella 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*.

9. La célula recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque 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 de virus *Chlorella PBCV1*.

10. La célula recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque 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).

11. La célula recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada porque comprende 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).

12. La célula de levadura recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 11, caracterizada porque se selecciona 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*, *Kluyveromyces polysporus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Ogataea polymorpha*, *Yarrowia lypolytica*, *Debaryomyces hansenii* y *Ashbya gossypii*, y es preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*.

13. La célula hospedera recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, caracterizada porque pertenece al orden *Saccharomycetales*, y se 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*, *Kluyveromyces polysporus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Ogataea polymorpha*, *Yarrowia lypolytica*, *Debaryomyces hansenii* y *Ashbya gossypii*, y es preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*.

14. Un método para producir ácido hialurónico (HA) de un peso molecular deseado (HAMW) caracterizado porque comprende:

(a) cultivar una célula recombinante como se define de

conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, 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.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el HA tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 50 kDa, y preferentemente de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 30 kDa.

16. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el HA tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa a aproximadamente 50 kDa.

17. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el peso molecular del HA es de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 150 kDa.

18. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el peso molecular del HA es de aproximadamente 150 kDa a aproximadamente 1500 kDa.

19. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, caracterizado porque la célula recombinante comprende por lo menos 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).

20. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, caracterizado porque 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);

(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 fosfoacetilglucosamina mutasa (PCM1).

21. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, caracterizado porque la célula recombinante es un miembro del género *Saccharomyces*, y en particular es *Saccharomyces cerevisiae*.

22. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, caracterizado porque 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 50 horas, preferentemente aproximadamente 48 horas.

23. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22, caracterizado porque el peso

molecular del ácido hialurónico se controla regulando el pH del medio de cultivo.

24. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23, caracterizado porque 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 más preferentemente aproximadamente 100,000L, o incluso aproximadamente 250,000L.

25. Un ácido hialurónico (HA) caracterizado porque se obtiene a partir de una célula recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o de un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24.

26. Un medio de cultivo caracterizado porque comprende HA de conformidad con la reivindicación 25.

27. Una composición caracterizada porque comprende ácido hialurónico (HA) de conformidad con la reivindicación 25.

28. Un producto industrial o un producto de consumo o un consumible, caracterizado porque comprende (i) el HA de conformidad con la reivindicación 25, (ii) el medio de cultivo de conformidad con la reivindicación 26 o (iii) la composición de conformidad con la reivindicación 27.

29. El producto industrial o el producto de consumo o el consumible de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque 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 una composición de higiene dental y/o bucal.

30. El uso de una célula recombinante como se define de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 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 aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 1000 kDa.

31. Un método para producir ácido hialurónico caracterizado porque comprende las etapas de:

(a) cultivar una levadura recombinante como se define de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 12 en un medio de cultivo; y

(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 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.