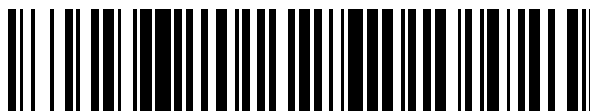


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 279**

51 Int. Cl.:

A61K 31/727 (2006.01)

C08B 37/10 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/34 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C08L 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2008 E 08826650 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2173360**

54 Título: **Heparosano basados biomateriales y revestimientos y métodos de producción y uso de estas materias**

30 Prioridad:

30.03.2007 US 921296 P
03.10.2007 US 906704

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2015

73 Titular/es:

THE BOARD OF REGENTS FOR THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA (100.0%)
660 PARRINGTON OVAL, EVANS HALL ROOM 119
NORMAN, OKLAHOMA 73019, US

72 Inventor/es:

DEANGELIS, PAUL L.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 531 279 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Heparosano basados biomateriales y revestimientos y métodos de producción y uso de estas materias

5 ANTECEDENTES

Campo de la invención

10 **[0001]** La presente invención se refiere a la metodología para la producción y usos de composiciones de biomaterial, y particularmente, a composiciones que comprenden un biomaterial polímero heparosano aislado y métodos de producción y usos de los mismos.

Descripción de la técnica relacionada

15 **[0002]** Los polisacáridos son grandes moléculas de hidratos de carbono que se componen de aproximadamente desde 25 unidades de azúcar a miles de unidades de azúcar. Los oligosacáridos son moléculas de hidratos de carbono más pequeñas que se componen de menos de aproximadamente 25 unidades de azúcar. Animales, plantas, hongos y bacterias producen una enorme variedad de estructuras de polisacáridos que están involucrados en numerosas funciones biológicas importantes tales como elementos estructurales, almacenamiento de energía, y la mediación de interacción celular. Frecuentemente, la función biológica del polisacárido es debido a la interacción del polisacárido con proteínas tales como los receptores y factores de crecimiento. La clase de glucosaminoglucano de polisacáridos y oligosacáridos, que incluye heparina, condroitina, dermatano, keratan, y ácido hialurónico, juega un papel importante en la determinación del comportamiento celular (por ejemplo, migración, adhesión), así como la tasa de proliferación celular en mamíferos. Estos polisacáridos y oligosacáridos son, por lo tanto, esenciales para la correcta formación y el mantenimiento de los órganos del cuerpo humano.

20 **[0003]** Varias especies de bacterias y hongos patógenos también se aprovechan de la función del polisacárido en la comunicación celular. Estos microbios patógenos forman recubrimientos de superficie de polisacáridos o cápsulas que son idénticas o químicamente similares a la sede de moléculas. Por ejemplo, el Grupo A y C *Streptococcus* y Tipo A *Pasteurella multocida* producen cápsulas de ácido hialurónico auténticos, y otras *Pasteurella multocida* (Tipo F y D) y patógena *Escherichia coli* (K4 y K5) son conocidas para hacer cápsulas compuestas de polímeros muy similares a la condroitina y heparina. Los microbios patógenos forman los revestimientos de superficie polisacárido o cápsulas porque dicho recubrimiento es no inmunogénico y protege a las bacterias de las defensas del huésped, proporcionando de este modo el equivalente de camuflaje molecular.

30 **[0004]** Las enzimas llamadas alternativamente sintasas, sintetasas, o transferasas, catalizan la polimerización de polisacáridos que se encuentran en los organismos vivos. Muchas de las enzimas conocidas también polimerizan nucleótidos de azúcar activados. Los donantes de azúcar más prevalentes contienen UDP, pero ADP, el PIB, y CMP también se utilizan dependiendo de (1) el azúcar particular para ser transferido y (2) el organismo. Muchos tipos de polisacáridos se encuentran en, o fuera de, la superficie de la célula. En consecuencia, la mayor parte de la actividad sintasa se asocia típicamente ya sea con la membrana de plasma en la periferia de la célula o con las membranas del aparato de Golgi que están involucrados en la secreción. En general, estas proteínas sintasa unidas a la membrana son difíciles de manipular por procedimientos típicos, y sólo unas pocas enzimas se han identificado después de la purificación bioquímica.

40 **[0005]** Un mayor número de sintasas se han clonado y secuenciado a nivel de nucleótidos utilizando enfoques de genética inversa en la que se obtuvo el gen o el ADN complementario (ADNc) fue obtenido antes de que se caracterice la proteína. A pesar de esta información de la secuencia, los detalles moleculares en relación con las estructuras tridimensionales nativas, los sitios activos y los mecanismos de acción catalítica de las sintasas de polisacárido, en general, son muy limitados o ausentes. Por ejemplo, el mecanismo catalítico para la síntesis de glucógeno todavía no se conoce en detalle a pesar de que la enzima se descubrió hace décadas. En otro ejemplo, es todavía un tema de debate si la mayoría de las enzimas que producen heteropolisacáridos utilizan un sitio de unión UDP-azúcar para transferir ambos precursores, o alternativamente, si existen dos regiones dedicadas para cada sustrato.

50 **[0006]** Como se mencionó anteriormente, los polisacáridos son los biomateriales más abundantes en la tierra, sin embargo, muchos de los detalles moleculares de su biosíntesis y función no son generalmente bien conocidos. El ácido hialurónico o HA es un polisacárido lineal de la clase de glucosaminoglucanos y se compone de hasta miles de β (1,4) GlcUA- β (1,3) GlcNAc repite. En los vertebrados, HA es un elemento estructural importante de la matriz extracelular y juega un papel en la adhesión y reconocimiento. HA tiene una alta densidad de carga negativa y numerosos grupos hidroxilo, por lo tanto, la molécula adopta una conformación extendida y se hidratan en solución. Las propiedades visco elásticas de cartílago y líquido sinovial son, en parte, el resultado de las propiedades físicas del polisacárido HA. HA también interactúa con proteínas tales como CD44, RHAMM, y fibrinógeno lo que influye en muchos procesos naturales, tales como la angiogénesis, el cáncer, la motilidad celular, cicatrización de heridas, y la adhesión celular.

- 5 **[0007]** Hay numerosas aplicaciones médicas de HA. Por ejemplo, HA se ha utilizado ampliamente como un reemplazo visco elástico para el humor vítreo del ojo en cirugía oftálmica durante la implantación de lentes intraoculares en pacientes con cataratas. HA se infiltra directamente en las articulaciones también se utiliza para aliviar el dolor asociado con la artritis. Químicamente geles y películas reticuladas también se utilizan para prevenir las adherencias perjudiciales después de la cirugía abdominal. Otros investigadores utilizando otros métodos han demostrado que los revestimientos de HA adsorbidos también mejoran la biocompatibilidad de los dispositivos médicos tales como catéteres y sensores mediante la reducción de ensuciamiento y la abrasión del tejido.
- 10 **[0008]** HA también se forma por ciertos microbios que causan la enfermedad en humanos y animales. Algunos agentes patógenos bacterianos, a saber, Gram-negativa *Pasteurella multocida* tipo A y Gram-positiva *Streptococcus* Grupo A y C, producen una cápsula de HA extracelular que protege a los microbios de las defensas del huésped como la fagocitosis. Bacterias mutantes que no producen cápsulas de HA son 10^2 - 10^3 menos virulento en comparación con las cepas encapsuladas. Además, el *Paramecium bursaria Chlorella* virus (PBCV-1) dirige las células huésped de algas para producir un revestimiento de superficie HA principios de la infección.
- 15 **[0009]** Los diversos HA sintetas ("HAS"), las enzimas que polimerizan HA, utilizan UDP-GlcUA y UDP-GlcNAc precursores de nucleótidos de azúcar en la presencia de un bivalente Mn, Mg o Co ion para polimerizar largas cadenas de HA. Las cadenas de HA pueden ser bastante grandes ($n = 10^2$ a 10^4). En particular, la variedad HASs son proteínas de membrana localizadas a la bicapa de lípidos en la superficie celular. Durante la biosíntesis de HA, el polímero de HA se transporta a través de la bicapa en el espacio extracelular. En todo HASs, una sola especie de polipéptido cataliza la transferencia de dos azúcares distintos. Por el contrario, la gran mayoría de otras glicosiltransferasas conocidas transfieren sólo un monosacárido.
- 20 **[0010]** La condroitina es uno de los más prevalentes glucosaminoglucanos (GAGs) en los vertebrados, así como parte del polímero capsular de tipo F *P. multocida*, un menor de edad patógeno cólera aviar. Esta bacteria produce condroitina no sulfatado (16), pero los animales poseen sulfatado polímeros de condroitina. La primera sintasa de condroitina de cualquier fuente para ser clonado molecularmente fue el *P. multocida* PMCs (DeAngelis y Padgett-McCue, 2000). El PMCs contiene 965 residuos de aminoácidos y se trata de 90% idéntica a pmHAS. Un soluble recombinante de *Escherichia coli*-derivado PMCs¹⁻⁷⁰⁴ cataliza la adición repetitiva de los azúcares de la UDP-GalNAc y UDP-GlcUA a los aceptadores de oligosacáridos condroitina in vitro.
- 25 **[0011]** Heparosano [N-acetilheparosano], (-GlcUA-β1,4-GlcNAc-α1,4-), es la cadena principal de azúcar de repetición del polisacárido que se encuentra en la cápsula de ciertas bacterias patógenas así como el precursor biocinética de la heparina o heparán sulfato se encuentra en animales desde la hidra hasta los vertebrados. En los mamíferos, las formas sulfatadas se unen a una variedad de polipéptidos extremadamente importantes, incluyendo factores de hemostasia (por ejemplo, antitrombina III, trombina), factores de crecimiento (por ejemplo, EGF, VEGF), y quimiocinas (por ejemplo, IL-8, factor plaquetario 4) como así como las proteínas adhesivas para patógenos virales (por ejemplo, herpes, fiebre Dengue). Actualmente, la heparina se extrae de los tejidos de los animales y es usado como un anticoagulante o fármaco antitrombótico. En el futuro, los polímeros y derivados similares también podrían ser útiles para la intervención farmacológica en una variedad de condiciones patológicas, incluyendo neoplasia y la infección viral.
- 30 **[0012]** Varios sistemas enzimáticos han sido identificados como sintetizadores de heparosano. En las bacterias, ya sea un par de dos glicosiltransferasas separadas (*Escherichia coli* KfIA y KfIC) o un solo glicosiltransferasas (*Pasteurella multocida* PmHS1 o PmHS2; (30, 47)) se han mostrado para polimerizar heparosano; las enzimas de ambas especies son homólogos a nivel de proteínas. En los vertebrados, un par de enzimas, EXT 1 y EXT 2, que no son similares a los sistemas bacterianos parecen ser responsables de la producción de las unidades de repetición de la cadena de polímero que posteriormente se han modificado por sulfatación y de epimerización.
- 35 **[0013]** Las sintetas heparosano de *P. multocida* poseen tanto una hexosamina y un sitio de transferencia de ácido glucurónico en la misma cadena polipeptídica, como se muestra por estudios de mutagénesis (Kane, TA et al., J. Biol. Chem. 2006), y por lo tanto se conocen como "doble acción" o glicosiltransferasas bifuncional. Estas enzimas son complejas, ya que emplean tanto un mecanismo de retención cuando se transfiere el monosacárido a partir de precursores UDP al término no reductor de una cadena en crecimiento y de inversión. Los dos *Pasteurella* sintetas heparosano, PmHS1 y PmHS2, son de aproximadamente 70% idéntico en la secuencia de aminoácidos. Los dos genes se encuentran en diferentes regiones del cromosoma bacteriano: PmHS1 (HSSA) está asociado con el tipo II locus del gen de la biosíntesis de carbohidratos-Gram negativo prototípico pero PmHS2 (HSSB) reside muy lejos en una región no especializado. Como se muestra en la invención actualmente descrita y reivindicada, estos catalizadores tienen propiedades catalíticas útiles que pueden ser aprovechadas por la mano del hombre.
- 40 **[0014]** Biomateriales (vagamente definidos como compuestos o ensamblajes que se utilizan para aumentar o sustituir componentes de tejidos naturales o partes del cuerpo) son y seguirán siendo parte integrante de la ingeniería de tejidos y los enfoques de medicina regenerativa. Los procedimientos complejos, incluyendo trasplantes y terapias con células madre prometen mejorar la salud humana, pero los suministros limitados de donantes de órganos /
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

tejidos y las curvas de aprendizaje (así como los debates éticos) para métodos pioneros son obstáculos. Existe una demanda creciente para más aplicaciones de rutina de biomateriales, tales como en la cirugía reconstructiva, cosméticos y dispositivos médicos. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica para los biomateriales nuevos y mejorados que se pueden utilizar, por ejemplo, pero no a modo de limitación, para aplicaciones de relleno dérmico y para recubrimientos de superficie para dispositivos implantados.

[0015] El hialuronano (HA), productos a base de ácido láctico poli-L-de (poli [lactida]), hidroxiapatita de calcio y colágeno dominan el mercado actual de los biomateriales utilizados en cirugía reconstructiva y procedimientos cosméticos. Sin embargo, estos productos tienen una serie de propiedades deseables para que los fabricantes y los profesionales de la salud estén buscando mejoras. Estas desventajas incluyen, pero no se limitan a, vida útil limitada, el potencial de inmunogenicidad y / o la alergenicidad, y la apariencia no natural en procedimientos estéticos. Para mejorar la biocompatibilidad y durabilidad de un dispositivo implantado, se emplean HA, heparina, albúmina de suero bovino, carbono pirolítico, o lípidos recubrimientos para mejorar la biocompatibilidad de los stents, catéteres y otros dispositivos material implantado. Sin embargo, estos productos a menudo causan ensuciamiento, obstrucción, o la formación de trombos debido a la reactividad con el cuerpo humano. Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica de composiciones nuevas y mejoradas de biomateriales que superan las desventajas y defectos de la técnica anterior.

[0016] La invención actualmente reivindicada y descrita supera las desventajas y defectos de la técnica anterior. La invención actualmente reivindicada y revelada se basa en un biomaterial que comprende heparosano, el precursor biosintético natural de gheparina y heparán sulfato. Esta composición tiene numerosas características que proporcionan mejoras y ventajas sobre los productos existentes. Mientras heparosano es muy similar a HA y heparina, la molécula tiene una mayor estabilidad en el cuerpo, ya que no es la forma final natural de este azúcar y por lo tanto el cuerpo no tiene enzimas de degradación o proteínas de unión que conducen a la pérdida de funcionalidad. Esta propiedad también reduce la contaminación biológica, la infiltración, la cicatrización y / o coagulación. Heparosano también es más hidrófilo que los revestimientos sintéticos tales como plásticos o de carbono. Finalmente, aparte de HA bacteriana, la mayoría de otros biomateriales de relleno actuales son típicamente derivados de animales, que causa preocupación por los efectos secundarios tales como reacciones alérgicas o de granulación, y la estimulación de tales efectos secundarios no será una preocupación con la invención actualmente reivindicada y revelada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

[0017]

FIG. 1 ilustra esquemáticamente una comparación de heparosano y estructuras de hialuronano (HA).

FIG. 2 representa el análisis de un gel demostrando la producción de polisacárido heparosano. Un gel de 0,6% todo con la detención de colorante la detección muestra *Pasteurella multocida* heparosano (marcada con flecha) en comparación con escala de ADN (escala D = Hyper Bioline) y una escala HA (HA = Hylaose HI y LO escalas combinadas).

FIG. 3 representa la producción de geles de polisacáridos heparosano. *P. multocida* heparosano fue reticulado con DVS en un tubo cónico, se lavó, y se retiró el gel. El gel transparente mantiene su forma incluso cuando no está soportado por líquido. Geles más duros o sueltos y líquidos viscosos se realizan mediante la alteración de la estequiometría y las condiciones de reacción.

FIG. 4 Representa el análisis en gel de agarosa que demuestra la producción de revestimientos de polisacáridos que utilizan un ¹²⁵sonda I-HA. Un radiactivo etiquetado Bolton-Hunter imprimación tetrámero HA se extendió por una reacción de polimerización sincronizada con PmHAS para hacer una sonda HA monodispersa. Manchas de colorante (A) y una película de rayos X (B), ambas muestran un producto único importante ~ 250 kDa (H, altas cargas de la muestra L, bajo y; S, estándares de tamaño de HA = 310, 214, 110, 27 kDa desde arriba hacia abajo, Hylaose LoLadder). Emisiones de rayos gamma de la sonda se siguen fácilmente sin pruebas destructivas de las superficies recubiertas que facilitan la cuantificación.

FIG. 5 ilustra reto de heparosano con plasma humano. Este gel de agarosa (0,9%, 1 x TAE) con detección de manchas muestra que el peso molecular de la heparosano original (H) es la misma, incluso después de la incubación con plasma (P) después de la incubación durante la noche a 37 ° C. (Std, HA lo-escala, la banda de 214 kDa está marcada con una flecha; Hylaose, LLC, Oklahoma City). Heparosano es un biomaterial estable.

FIG. 6 ilustra las reacciones y estructuras de heparosano basados en geles. A: un gel a base de heparosano con una estructura similar a Hylaform® hecho con divinil sulfona. B: un gel a base de heparosano con una estructura similar a Restylane® hecho con 1,2-diethanediol diglicidil éter.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0018] Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle con los dibujos como ejemplos, la experimentación, los resultados y los procedimientos de laboratorio, es de entenderse que la invención actualmente descrita y reivindicada no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y las disposiciones de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos, la experimentación y / o resultados. La invención actualmente descrita y reivindicada es capaz de otras realizaciones o de ser practicada o llevada a cabo de varias maneras. Como tal, el lenguaje utilizado en el presente documento está destinado a dar el

alcance y el significado más amplio posible; y las formas de realización están destinadas a ser ejemplares no exhaustiva. También, se debe entender que la fraseología y terminología empleada en el presente documento es para el propósito de descripción y no deben considerarse como restrictivas.

5 **[0019]** A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que son comúnmente entendidos por los expertos en la técnica. Además, a menos que sea requerido por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los
10 términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, y proteínas y oligo- o polinucleótido química e hibridación descritos en este documento son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y el cultivo de tejidos y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante o como comúnmente logrado en la técnica o como se describe aquí. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la
15 presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989) y Coligan y col Current Protocols in Immunology (Protocolos actual, Wiley Interscience (1994)), que se incorporan en este documento en su totalidad por referencia. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y la química medicinal y farmacéutica reveladas en el presente documento de laboratorio son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Las técnicas estándar se utilizan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y entrega, y de tratamiento de los pacientes.

25 **[0020]** Los glucosaminoglucanos (GAG) son polisacáridos lineales compuestas de unidades repetidas de disacáridos que contienen un derivado de un amino azúcar (ya sea glucosamina o galactosamina). El hialuronano [HA], condroitina y sulfato de heparán / heparina contienen un ácido urónico como el otro componente de la repetición de disacárido mientras queratán contiene una galactosa. Los GAGs se resumen en la Tabla I.

30 **Tabla 1**

Polímero	Repita Disacárido	Post-Polimerización	Modificaciones
Hialuronan	β 3GlcNAc β 4GlcUA	Vertebrados	Bacterias
Condroitina	β 3GalNAc β 4GlcUA	Ninguna	ninguna
Heparina/heparina	β 4GlcNAc α 4GlcUA		ninguna
Keratan	β 4GlcNAc β 3Gal		no reportado

35 **[0021]** Un glucosaminoglucano no natural (GAG no natural) sería una composición de materia que no se encuentra normalmente en la vida de los conocidos vertebrados vivos, animales o microbios; diferentes acuerdos o estructuras de grupos químicos se añaden por la mano del hombre.

40 **[0022]** Vertebrados pueden contener los cuatro tipos de GAG, pero la cadena de polisacáridos es a menudo modificada aún más después de la polimerización de azúcar. Una o más modificaciones, incluyendo O-sulfatación de ciertos hidroxilos, desacetilación y N-sulfatación posterior, o la epimerización de ácido glucurónico a ácido idurónico se encuentran en la mayoría de los GAGs excepto HA. Una increíble variedad de estructuras distintas se han reportado para el sulfato de condroitina y heparán sulfato / heparina incluso dentro de una misma cadena polimérica. Unos microbios patógenos inteligentes también producen cadenas de GAG no modificados; las bacterias utilizan recubrimientos de polisacáridos extracelulares como camuflaje molecular para evitar las defensas del huésped. El sulfato de condroitina y cadenas / heparina de heparán en los vertebrados se sintetizan inicialmente por el alargamiento de un enlace de tetrasacárido que contiene xilosa unida a una variedad de proteínas. Keratan está ligada a O o ligado a N a ciertas proteínas en función de la molécula particular. HA y todos los GAGs bacterianos conocidos no son parte de la clasificación de proteínas conocidas como glicoproteínas. Todos los GAGs excepto HA se encuentran unidos covalentemente a una proteína del núcleo, y dicha combinación se conoce como un proteoglicano. Las glicoproteínas son generalmente mucho más pequeños que los proteoglicanos y sólo contienen 1-60% en peso de hidratos de carbono en forma de numerosa relativamente corto, ramificado oligosacárido cadenas, mientras que un proteoglicano puede contener tanto como 95% de hidratos de carbono en peso. La proteína del núcleo en un proteoglicano es también generalmente una glicoproteína, por lo tanto, por lo general contiene otras cadenas de oligosacáridos además de los GAGs.

50 GAGs y sus derivados se utilizan actualmente en el campo médico como suplementos oftálmicas y viscoelásticas, ayudas quirúrgicas de adhesión para evitar las adherencias post-operatorias, revestimientos de catéteres y dispositivos, y anticoagulantes. Otras aplicaciones futuras actuales o prometedoras incluyen los medicamentos contra el cáncer, matrices de ingeniería de tejidos, moduladores de células inmunes y neurales, antivirales, moduladoras de proliferación, y agentes de drogas focalización.

65

5 [0024] Los carbohidratos complejos, tales como GAG, son ricos en información moléculas. Un propósito principal de los azúcares que componen GAGs es permitir la comunicación entre las células y componentes extracelulares de los organismos multicelulares. Típicamente, ciertas proteínas se unen a particulares cadenas de azúcar de una manera muy selectiva. Una proteína puede simplemente adherirse a la azúcar, pero muy a menudo la actividad intrínseca de la proteína puede ser alterado y / o la proteína transmite una señal a la célula para modular su comportamiento. Por ejemplo, en la cascada de coagulación sanguínea, la unión a proteínas inhibitoras heparina ayuda a cerrar la respuesta de coagulación. En otro caso, HA une a las células a través del receptor CD44 que estimula las células para migrar y proliferar. A pesar de que los polímeros GAG largos (es decir, $> 10^2$ Da) se encuentran naturalmente en el cuerpo, típicamente sitio de unión de la proteína interactúa con un tramo de 4 a 10 monosacáridos. Por lo tanto, los oligosacáridos pueden ser usados para ya sea (a) un sustituto para el polímero, o (b) para inhibir la acción de polímero dependiendo del sistema particular.

15 [0025] HA polisacárido desempeña funciones estructurales en los ojos, la piel y la membrana sinovial articular. Grandes polímeros de HA ($\sim 10^6$ Da) también estimulan la motilidad celular y la proliferación. Por otra parte, los polímeros de HA más cortos ($\sim 10^4$ Da) a menudo tienen el efecto contrario. HA-oligosacáridos compuestos de 10 a 14 azúcares [HA₁₀₋₁₄] tienen posibilidades para la inhibición del crecimiento celular del cáncer y la metástasis. En un ensayo en vivo, los ratones inyectados con diversas líneas invasivas y virulentas de células tumorales (melanoma, glioma, carcinomas de pulmón, mama y ovario) desarrollar una serie de tumores grandes y mueren en cuestión de semanas. El tratamiento con HA oligosacáridos reduce en gran medida el número y el tamaño de los tumores. La metástasis, la fuga de las células cancerosas en todo el cuerpo, es uno de los mayores temores tanto del paciente enfermo y el médico. HA o HA-oligosacáridos como parecen servir como un tratamiento complementario para inhibir el crecimiento del cáncer y metástasis.

25 [0026] Se cree que el modo de acción preliminar de los azúcares HA-oligosacáridos estar mediada por la unión o la interacción con una de varias proteínas importantes HA-unión (probablemente CD44 o RHAM) en el cuerpo de un mamífero. Un escenario propuesto para la acción contra el cáncer de HA-oligosacáridos es que múltiples moléculas de proteína CD44 en una célula cancerosa pueden unirse simultáneamente a un polímero largo HA. Esta activación multivalente HA causas de unión a CD44 (tal vez mediada por la dimerización o un evento de parches receptor) que desencadena la activación de las células del cáncer y la migración. Sin embargo, si la célula de cáncer se inunda con pequeñas HA-oligosacáridos, a continuación, cada molécula CD44 se une una molécula de HA individualmente diferente de una manera monovalente tal que no se produzca la dimerización / evento parches. Por lo tanto no hay señal de activación se transmite a la célula. Actualmente, se cree que el tamaño óptimo HA-azúcar es de 10 a 14 azúcares. Aunque este tamaño puede basarse más en el tamaño de HA actualmente disponibles para probar en lugar de biológica es decir, la funcionalidad de, ahora que las moléculas de HA y derivados de HA-como < 10 azúcares están disponibles de acuerdo a las metodologías de la presente invención, el tamaño óptimo HA o la composición de oligosacárido puede encontrarse a ser diferente.

35 [0027] También se ha demostrado que el tratamiento con ciertos anticuerpos anti-CD44 o CD44-ácido nucleico antisentido previene el crecimiento y la metástasis de las células cancerosas de una manera similar a la de HA-oligosacáridos; en comparación con los azúcares, sin embargo, estos reactivos a base de ácido de proteína y basados en nucleicos son algo difícil de administrar en el cuerpo y / o pueden tener efectos negativos a largo plazo. Un atributo muy deseable de HA-oligosacáridos para la terapéutica es que estas moléculas de azúcar son subproductos naturales que pueden ocurrir en pequeñas cantidades en el cuerpo humano sano durante la degradación del polímero de HA; son obvias la toxicidad no desfavorable innata, la antigenicidad, o preocupaciones alérgicas.

45 [0028] Otras áreas emergentes para el potencial uso terapéutico de oligosacáridos HA son la estimulación de la formación de vasos sanguíneos y la estimulación de la maduración de las células dendríticas. Mejora de la cicatrización de heridas y reabastecimiento oxigenación cardiaca puede ser aplicaciones adicionales que potencien la capacidad de los oligosacáridos de HA para hacer que las células endoteliales para formar tubos y brotar nuevos vasos. Las células dendríticas poseen actividad adyuvante en la estimulación de respuestas celulares específicas T CD4 y CD8. Por lo tanto, las células dendríticas son objetivos en las estrategias de desarrollo de vacunas para la prevención y tratamiento de infecciones, reacciones de aloinjertos, enfermedades alérgicas y autoinmunes y cáncer.

55 [0029] Heparina interactúa con muchas proteínas en el cuerpo, pero dos clases muy interesantes son las proteínas de la cascada de la coagulación y factores de crecimiento. Antitrombina III [ATIII] y ciertas otras proteínas de hemostasia son inhibidores 100.000 veces más potentes de la coagulación de la sangre cuando se compleja con la heparina. De hecho, la heparina es tan potente que debe ser utilizado en un entorno hospitalario y requiere un control cuidadoso para evitar la hemorragia. Las formas más nuevas, procesados de menor peso molecular de la heparina son más seguros, pero este material es todavía una mezcla compleja. Se ha demostrado que un pentasacárido en particular (5 azúcares de largo) que se encuentra en la heparina es responsable del efecto anticoagulante-ATIII. Pero puesto que la heparina es un polímero muy heterogénea, es difícil aislar el pentasacárido (5 azúcares de largo) en un estado puro. El pentasacárido se puede preparar también en una síntesis química convencional que implica de 50 a 60 pasos. Sin embargo, la alteración de la síntesis o la preparación de una variedad de análogos en paralelo no siempre es factible, ya sea química o económicamente.

[0030] Muchos factores de crecimiento, incluyendo VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), HBEGF (factor de crecimiento de fibroblastos), y FGF (factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina), se unen a las células por interactuar simultáneamente con el receptor del factor de crecimiento y una heparina de proteoglicanos de la superficie celular; sin el resto de la heparina, la potencia del factor de crecimiento cae en picada. La proliferación celular se modula en parte por heparina; Por lo tanto, las enfermedades como el cáncer y la aterosclerosis son objetivos potenciales. La proliferación anormal o no deseada se vería disminuida si el factor de crecimiento fue prevenido por el objetivo de la estimulación de las células en estado de enfermedad mediante la interacción con un oligosacárido análogo similar a la heparina en lugar de un receptor unido a la superficie. Alternativamente, en ciertos casos, los oligosacáridos de heparina solos han demostrado tener efectos estimulantes.

[0031] La condroitina es el más abundante GAG en el cuerpo humano, pero la totalidad de sus funciones biológicas específicas aún no están claras. Es un fenómeno como consecuencia de células neurales que parece estar modulada por condroitina. Ambos efectos estimuladores e inhibidores se han observado dependiendo de la forma de condroitina y el tipo de célula. Por lo tanto, condroitina o similares moléculas son de utilidad en las conexiones sinápticas de re-cableado después de las enfermedades degenerativas (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer) o trauma paralítico. La forma epimerizada de condroitina (GlcUA lo convierte en isómero C5, ácido idurónico o IdoUA), dermatán, inhibe selectivamente ciertas proteínas de la coagulación tales como la heparina cofactor II. Mediante la modulación de esta proteína en la vía de coagulación en lugar de ATIII, dermatán parece permitir un margen de seguridad mayor que la heparina tratamiento para la reducción de trombos o coágulos que provocan accidentes cerebrovasculares y ataques cardíacos.

[0032] En las solicitudes de patente que se hace referencia y se incorporan en el presente documento, varios catalizadores prácticos de bacterias *Pasteurella* que permiten la síntesis de los tres GAGs humanos más importantes (es decir, los tres ácidos conocidos GAGs) se describen y se activan (por ejemplo, HA, condroitina, y heparina).

[0033] Todo el conocido HA, condroitina y heparosano / enzimas / sulfato de heparina de glicosiltransferasas heparán que sintetizan las cadenas principales de azúcar de repetición alterna en microbios y en los vertebrados utilizar precursores de UDP-azúcar y cofactores metálicos divalentes (por ejemplo, magnesio, cobalto, y / o de iones de manganeso) cerca de pH neutro de acuerdo con la reacción general:



donde HexNAc = GlcNAc o GalNAc. Dependiendo de la GAG específica y el organismo o tejido particular examinado, y el grado de polimerización, n, varía de aproximadamente 25 a aproximadamente 10.000. Las moléculas más pequeñas se pueden hacer in vitro, según se desee. Si el GAG se polimeriza mediante un único polipéptido, la enzima se llama una sintasa o co-polimerasa.

[0034] Como se indica anteriormente en lo incorporado por referencia en la sección "Referencia cruzada" de esta solicitud, el inventor ha descubierto previamente cuatro nuevos catalizadores de doble acción enzimáticos de distintos aislamientos de la bacteria Gram-negativa *Pasteurella multocida* utilizando diversas estrategias de biología molecular. *P. multocida* infecta a las aves de corral, cerdos y ganado, así como muchas especies de fauna silvestre. Las enzimas son: una HA sintasa, o pmHAS (véase el documento US Ser No. 10 / 217.613, presentado el 12 de agosto 2002, cuyos contenidos completos se incorporan expresamente en este documento por referencia.); una sintasa de condroitina, o PMC (véase el documento US Ser No. 09 / 842.484, presentada el 25 de abril 2002, todo el contenido de las cuales se incorporan expresamente en el presente documento por referencia.); y dos sintasas heparosano, o PmHS1 y PmHS2 (véase el documento US Ser. No. 10 / 142.143, presentada el 8 de mayo de 2002, todo el contenido de las cuales se incorporan expresamente en este documento por referencia).

[0035] La mayoría de las proteínas de membrana son relativamente difíciles de estudiar debido a su insolubilidad en solución acuosa, y el HSS nativa no son una excepción. Sin embargo, el inventor ha demostrado en la solicitud anterior, incorporado aquí anteriormente, que son de larga duración, secuencia nativa PmHS1 o PmHS2 se puede convertir en un mayor rendimiento, las proteínas solubles que son purificable por la adición de compañeros de fusión de proteína, tal como, pero no limitado, la proteína de unión a maltosa (MBP).

[0036] La presente invención abarca métodos para producir una variedad de moléculas únicas biocompatibles y recubrimientos a base de polisacáridos. Polisacáridos, especialmente los de la clase de glucosaminoglicanos, sirven para numerosas funciones en el cuerpo como elementos estructurales y moléculas de señalización. Pueden utilizarse las composiciones de biomaterial de la invención actualmente descrita y reivindicada, por ejemplo, pero no a modo de limitación, para aumentar los tejidos y para superficies de recubrimiento de implantes. Los recubrimientos de polisacáridos de la presente invención son útiles para la integración de un objeto extraño dentro de una matriz de tejido circundante. Por ejemplo, los componentes artificiales de un dispositivo podrían ser enmascarados por el recubrimiento biocompatible para reducir inmunoreactividad o inflamación.

[0037] La presente invención se refiere a una composición de biomaterial que incluye un polímero heparosano aislado. El polímero heparosano aislado es biocompatible con un paciente mamífero y está representado por la

- estructura (-GlcUA-beta-1,4-GlcNAc-alfa-1,4-) n, en donde n es un entero positivo mayor o igual a 1. En una realización, n puede ser mayor que 10, mientras que en otras realizaciones, n puede ser aproximadamente cerca de 1,000. La composición de biomaterial no es sustancialmente susceptible a hialuronidasas y por lo tanto no está sustancialmente degradado en vivo. Además, la composición de biomaterial puede producirse de forma recombinante como se describe en detalle en este documento, o la composición de biomaterial puede ser aislado y purificado a partir de fuentes naturales mediante cualquier método de aislamiento / purificación conocidos en la técnica.
- 5
- 10 **[0038]** El polímero heparosano de la composición de biomaterial puede ser lineal o reticulado. La composición de biomaterial de la presente invención puede administrarse a un paciente por cualquier medio conocido en la técnica; por ejemplo, pero no a modo de limitación, la composición de biomaterial puede ser inyectable y / o implantable. Además, la composición de biomaterial puede estar en un gel o estado semi-sólido, una suspensión de partículas, o la composición de biomaterial pueden estar en una forma líquida.
- 15 **[0039]** Alternativamente, el polímero heparosano de la composición de biomaterial puede estar unido a un sustrato. Cuando está unido a un sustrato, el polímero heparosano aislado puede ser covalentemente (a través de un enlace químico) o no covalente (a través de enlaces débiles) unido al sustrato. Ejemplos de sustratos que pueden ser utilizados de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, sílice, silicio, semiconductores, vidrio, polímeros, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, metales y combinaciones de los mismos. Cuando el sustrato es un metal, el metal puede incluir, pero no se limita a, oro, cobre, acero inoxidable, níquel, aluminio, titanio, aleaciones termosensibles y combinaciones de los mismos.
- 20
- 25 **[0040]** La presente invención también se compone de composiciones de biomaterial que comprimen un gel reticulado que forman heparosano aislado y al menos un agente de reticulación. El agente de reticulación puede ser cualquier agente de reticulación conocido en la técnica; ejemplos específicos de agentes de reticulación que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluye, pero no se limitan a, aldehídos, epóxidos, compuestos de poliaziridilo, éteres de glicidilo, sulfonas de divinilo, y combinaciones y derivados de los mismos.
- 30 **[0041]** Cualquiera de las composiciones de biomaterial de la invención actualmente descrita y reivindicada puede ser un biomaterial hidratante que protege de la deshidratación; alternativamente, cualquiera de las composiciones de biomaterial de la presente invención puede ser un biomaterial lubricante.
- 35 **[0042]** Otro aspecto de la invención actualmente descrita y reivindicada está relacionado con kits para la administración en vivo de las composiciones de biomaterial descritos anteriormente en este documento a un paciente de los mamífero.
- 40 **[0043]** La invención actualmente descrita y reivindicada también se refiere a métodos para proporcionar un revestimiento sobre una superficie de un implante sintético. En tales métodos, se proporcionan un implante sintético y la composición de biomaterial descrito anteriormente en este documento. La composición de biomaterial está dispuesto sobre al menos una porción de la superficie del implante sintético y se deja formar un recubrimiento sobre la superficie del implante.
- 45 **[0044]** La invención actualmente descrita y reivindicada se relaciona también está relacionada con los métodos de aumentar el tejido en un paciente. En tales métodos, se proporciona la composición de biomaterial descrito anteriormente en este documento, y una cantidad eficaz de los mismos se administra al paciente mamífero. La composición de biomaterial se puede administrar al paciente por cualquier método conocido en la técnica, tales como, pero no limitado a, la inyección y / o implantación. Cuando se inyecta, la composición de biomaterial puede estar en un estado líquido o una suspensión de partículas, mientras que cuando se implanta, la composición de biomaterial puede estar en un estado de gel o semi-sólido, o puede estar unido a un sustrato.
- 50
- 55 **[0045]** La invención actualmente descrita y reivindicada también comprende composiciones de biomaterial que comprende un gel reticulado que consta de heparosano aislado y al menos un agente de reticulación. El agente de reticulación puede ser cualquier agente de reticulación conocido en la técnica; ejemplos específicos de agentes de reticulación que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aldehídos, epóxidos, compuestos de poliaziridilo, éteres de glicidilo, sulfonas de divinilo, y combinaciones y derivados de los mismos.
- 60 **[0046]** La invención actualmente descrita y reivindicada también se refiere a métodos de reparación de huecos en los tejidos de los mamíferos, que comprende inyectar / implantar la composición del biomaterial descrito anteriormente en este documento en dichos huecos.
- 65 **[0047]** La invención actualmente descrita y reivindicada también se refiere a métodos de creación de huecos o víscera en los tejidos de los mamíferos, que comprende inyectar / implantar la composición del biomaterial descrito anteriormente en este documento en un tejido o una construcción de ingeniería de tejidos para crear dichos huecos o víscera.

[0048] La actualmente descrita y reivindicada invención también se refiere a métodos de cirugía reparadora o cirugía plástica, que comprende el uso de las composiciones de biomaterial descritos aquí anteriormente como material de relleno.

5
[0049] La invención actualmente descrita y reivindicada se refiere además a métodos de aumento y / o el tratamiento de la deficiencia de la piel dérmica en un mamífero, que comprende inyectar y / o la implantación de una composición de biomaterial como se ha descrito anteriormente en este documento en dicho mamífero. La composición de biomaterial es biocompatible, hinchable, hidrófilo y sustancialmente no tóxico, y las olas composición de biomaterial al entrar en contacto con fluidos fisiológicos en el sitio de inyección / de implantación.

10
[0050] El método de aumento dérmico de la invención actualmente descrita y reivindicada es especialmente adecuado para el tratamiento de deficiencias contorno de la piel, que a menudo son causadas por el envejecimiento, la exposición del medio ambiente, la pérdida de peso, teniendo hijos, lesiones, cirugía, además de enfermedades como el acné y cáncer. Adecuado para el tratamiento por el método de la presente invención son las deficiencias de contorno, como las líneas de expresión, preocupación líneas, arrugas, patas de gallo, líneas de marioneta, estrías y cicatrices internas y externas resultantes de una lesión, herida, mordedura, cirugía o accidente.

15
[0051] "Aumento dérmico" en el contexto de la invención actualmente descrita y reivindicada se refiere a cualquier cambio del estado natural de las zonas de la piel y relacionadas de un mamífero debido a actos externos. Las áreas que se pueden cambiar por aumento dérmico incluyen, pero sin limitarse a, la epidermis, la dermis, la capa subcutánea, grasa, músculo erector pídora, tallo del pelo, de los poros de sudor, y la glándula sebácea.

20
[0052] Además, la invención actualmente descrita y reivindicada también se refiere a métodos de tratamiento médico o profiláctico de un mamífero, en el que dichos métodos comprenden la administración de las composiciones de biomaterial descritos en este documento a un mamífero en necesidad de tal tratamiento.

25
[0053] Además, la actualmente descrita y reivindicada invención también se refiere a métodos de tratamiento o profilaxis de aumento de tejidos en un mamífero, que comprende administrar una composición médica o profiláctico que se compone de gel de polisacárido que consta de la composición de biomaterial se describe aquí.

30
[0054] La invención actualmente descrita y reivindicada se refiere además a un sistema de suministro para una sustancia que tiene actividad biológica o farmacológica, comprendiendo dicho sistema una jaula molecular formado de un gel reticulado de heparosano o un gel reticulado mixto de heparosano y al menos una otro polímero copolimerizable con el mismo e hidrófilo que tiene dispersa en ella una sustancia que tiene actividad biológica o farmacológica y que es capaz de ser difundida de los mismos de una manera controlada.

35
[0055] Los biomateriales de la invención actualmente descrita y reivindicada se pueden utilizar en cualquiera de los métodos de la utilización de biomateriales conocidos en la técnica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, las composiciones de biomaterial de la invención actualmente descrita y reivindicada se pueden utilizar en cualquiera de los métodos de utilización de otros biomateriales conocidos que se describen en la patente US. Nos. 4.582.865, concedida a Balazs et al. el 15 de abril 1986; 4.636.524, concedida a Balazs y otros el 13 de enero de 1987; 4.713.448, concedida a Balazs y otros el 15 de diciembre de 1987; 5.137.875, expedida a Tsununagay otros el 11 de agosto de 1992; 5.827.937, expedida a Ang el 27 de octubre de 1998; 6.436.424, expedida a Vogely otros el 20 de agosto de 2002; 6.685.963, expedida a Taupiny otros el 3 de febrero de 2004; y 7.060.287, concedida a Hubbard y otros el 13 de junio de 2006. Todo el contenido de estas patentes se incorporan expresamente en este documento por referencia, y por lo tanto cualquiera de los métodos descritos en la misma, cuando se utilizan con las nuevas composiciones de biomaterial de la invención actualmente reivindicada y dada a conocer, también caen dentro del alcance de la presente invención.

40
[0056] Otros ejemplos específicos de usos para las composiciones de biomaterial de la invención actualmente descrita y reivindicada incluyen, pero no se limitan a, (a) un recubrimiento lubricante persistente sobre una superficie, tal como, pero no limitado a, dispositivos quirúrgicos; (B) una crema hidratante de larga duración; (C) un suplemento viscoelástica para enfermedades comunes; y (d) un conducto para la sangre no oclusión no trombótica (tal como, pero no limitado a, un stent o vaso artificial, etc.). Además, las composiciones de biomaterial de la presente invención pueden ser utilizados en la ingeniería de tejidos para formar un conducto o víscera vaso o luz mediante el uso de las composiciones de biomaterial de la invención actualmente descrita y reivindicada como un fabricante de un espacio tridimensional; en este caso, las células circundantes no se unirán a las composiciones de biomaterial de la presente invención, con lo que tales composiciones de biomaterial muy adecuado para esta tecnología.

50
[0057] Además, la invención actualmente descrita y reivindicada incluye además métodos para hacer negocios mediante la producción de los polímeros de glucosaminoglucanos por los métodos descritos anteriormente en este documento y la venta y la entrega de tales polímeros de glucosaminoglucanos a un cliente o la prestación de tales polímeros de glucosaminoglucanos a un paciente.

55
 60
 65

- 5 **[0058]** Tal como se utiliza aquí, el término "heparosano" se entiende que se refiere a la precursora biosintética natural de heparina y sulfato de heparina. El heparosano polímero de azúcar es una molécula de heparina unepimerized no sulfatado, y también puede ser referido como "heparosano N-acetil".
- 10 **[0059]** El término "tejido" como se usa aquí se entenderá para referirse a una agrupación de células dentro de un organismo que se caracterizan de manera similar por su estructura y función.
- 15 **[0060]** El término "biomaterial" como se usa aquí se entenderá para referirse a cualquier material no esteroideos que pueden usarse para tratar, mejorar, proteger o reemplazar cualquier tejido, órgano o función en un organismo. El término "biomaterial" también se refiere a un material derivado biológicamente que se utiliza para su estructural en vez de sus propiedades biológicas, por ejemplo, pero no a modo de limitación, a la utilización de colágeno, la proteína que se encuentra en el hueso y los tejidos conectivos, como un ingrediente cosmético, o para el uso de hidratos de carbono modificados con procesos biotecnológicos como lubricantes para aplicaciones biomédicas o como agentes de carga en la fabricación de alimentos. Un "biomaterial" es cualquier material, natural o hecho por el hombre, que comprende toda o parte de una estructura viva o dispositivo biomédico que realiza, argumenta, protege, o reemplaza una función natural y que es compatible con el cuerpo.
- 20 **[0061]** Como se usa en el presente documento, cuando el término "aislado" se usa en referencia a una molécula, el término significa que la molécula ha sido retirado de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente naturalmente en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Además, las moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector se consideran aisladas para los fines de la presente invención. Moléculas de ARN aisladas incluyen in vivo o en productos de replicación de ARN in vitro de moléculas de ADN y ARN. Moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen además moléculas producidas sintéticamente. Además, las moléculas de vector contenido en las células huésped recombinantes son también aislado. En general, esto también se aplica a los hidratos de carbono en general. Por lo tanto, no todas las moléculas "aislados" tienen que ser "purificadas".
- 25 **[0062]** Tal como se usa en el presente documento, cuando el término "purificado" se usa en referencia a una molécula, significa que la concentración de la molécula de ser purificada se ha aumentado en relación con moléculas asociadas con ella en su entorno natural. Naturalmente moléculas asociadas incluyen proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y azúcares, pero generalmente no incluyen agua, tampones, y reactivos añadidos para mantener la integridad o facilitar la purificación de la molécula de ser purificado.
- 30 **[0063]** Tal como se utiliza aquí, el término "sustancialmente purificado" se refiere a un compuesto que se extrae de su entorno natural y es al menos 60% libre, preferentemente 75% libre, y lo más preferiblemente 90% libre de otros componentes con los que está naturalmente asociado.
- 35 **[0064]** En la presente memoria, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que el objeto especies comprende al menos aproximadamente 50 % (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, tales como más de aproximadamente 85%, 90%, 95% y 99%. En una realización, la especie objeto se purifica hasta homogeneidad esencial (especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales) donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.
- 40 **[0065]** Tal como se utiliza aquí, el término "sustrato" se entiende que se refiere a cualquier superficie de la que un recubrimiento puede estar dispuesto. Ejemplos de sustratos que pueden ser utilizados de acuerdo con la presente invención incluye, pero no se limitan a, sílice, silicio, vidrio, polímeros, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, metales y combinaciones de los mismos. Cuando el sustrato es un metal, el metal puede incluir, pero no se limita a, oro, cobre, acero inoxidable, níquel, aluminio, titanio, aleaciones termosensibles y combinaciones de los mismos.
- 45 **[0066]** Los términos "gel" y "semi-sólido" se usan indistintamente en este documento y se entenderá para incluir un sistema coloidal, con la apariencia de un sólido, en la que un sólido se dispersa en un líquido; el compuesto puede tener una tensión de fluencia limitado. El término "gel" se refiere también a una gelatina como material formado por la coagulación de un líquido coloidal. Muchos geles tienen una matriz fibrosa e intersticios llenos de líquido: los geles son viscoelástico en lugar de simplemente viscoso y pueden resistir una cierta tensión mecánica sin deformación. Cuando se aplica presión a geles o semi-sólidos, se ajustan a la forma en la que se aplica la presión.
- 50 **[0067]** El término "hidrogel" se utiliza aquí para describir una red de cadenas de polímeros que son insolubles en agua, a veces se encuentra en forma de gel coloidal en la que el agua es el medio de dispersión. Los hidrogeles son polímeros naturales o sintéticos muy absorbentes, y pueden contener más del 99% de agua. Los hidrogeles también poseen un grado de flexibilidad muy similar al tejido natural, debido a su contenido significativo de agua.
- 55
- 60
- 65

[0068] Además, los péptidos y / o sustancias biológicamente activas más grandes pueden ser encerrado en hidrogeles, formando así una composición de liberación sostenida.

5 **[0069]** Tal como se utiliza aquí, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una composición de biomaterial o conjugado o derivado del mismo suficiente para exhibir un efecto terapéutico o profiláctico detectable sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica) acorde con una / beneficio razonable relación riesgo cuando se usa de la manera de la invención. La cantidad eficaz para un sujeto dependerá del tipo de sujeto, el tamaño y la salud del sujeto, la naturaleza y gravedad de la afección a tratar, el método de administración, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay) , las formulaciones específicas empleadas, y similares. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad eficaz exacta por adelantado. Sin embargo, la cantidad eficaz para una situación dada puede ser determinada por un experto normal en la técnica usando experimentación de rutina sobre la base de la información proporcionada en este documento.

10 **[0070]** El término "sustancialmente monodispersas de tamaño" como se usa aquí se entenderá para referirse a polímeros glycoasminoglycan definidas que tienen una distribución de tamaño muy estrecha. Por ejemplo, los polímeros de glucosaminoglucanos sustancialmente monodispersas que tienen un peso molecular en un intervalo de aproximadamente 3,5 kDa a aproximadamente 0,5 MDa tendrá un valor de polidispersidad (es decir, M_w / M_n , donde M_w es el peso molecular promedio y M_n es el peso molecular medio numérico) en un intervalo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 1,1, y preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 1,05. En otro ejemplo, los polímeros de glucosaminoglucanos sustancialmente monodispersas que tienen un peso molecular en un intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4,5 MDa MDa tendrán un valor de polidispersidad en el intervalo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 1,5, y preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 1,2.

15 **[0071]** Tal como se utiliza aquí, el término "segmento de ácido nucleico" y "segmento de ADN" se utilizan indistintamente y se refieren a una molécula de ADN que ha sido aislada libre de ADN genómico total de una especie particular. Por lo tanto, un ADN "purificado" o segmento de ácido nucleico como se usa aquí, se refiere a un segmento de ADN que contiene un heparosano sintasa (HS) secuencia de codificación todavía está aislado lejos de, o purificada libre de, ADN genómico no relacionada, por ejemplo, el total de *Pasteurella multocida*. Incluidos dentro del término "segmento de ADN", son segmentos de ADN y fragmentos más pequeños de tales segmentos, y también vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus, y similares.

20 **[0072]** En una realización de la invención actualmente descrita y reivindicada, las composiciones de biomaterial de la presente invención se pueden producir usando transferasas de glucosaminoglucanos recombinantes como se describe en las solicitudes de patentes anteriores del inventor de que previamente se han incorporado en el presente documento. Las transferasas glycosaminglycan recombinantes utilizadas de acuerdo con la presente invención se pueden seleccionar del grupo que consiste de: a heparosano sintasa recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4, y 6-8; una sintasa heparosano recombinante codificado por la secuencia de nucleótidos de al menos uno de SEQ ID NOS: 1, 3 y 5; una sintasa heparosano recombinante codificada por una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse a un complemento de la secuencia de nucleótidos de al menos uno de SEQ ID NOS: 1, 3 y 5 en condiciones de hibridación que comprende la hibridación a una temperatura de 68 ° C en 5 x SSC / 5 x solución de Denhardt / 1,0% SDS, seguido de lavado en 3 X SSC a 42 ° C .; una sintasa heparosano recombinante codificada por una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse a un complemento de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos como se establece en al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8 en condiciones de hibridación que comprenden la hibridación en una temperatura de 68 ° C en 5 x SSC / 5 x solución de Denhardt / 1,0% SDS, seguido de lavado en 3 X SSC a 42 ° C .; una sintasa heparosano recombinante codificada por una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse a un complemento de la secuencia de nucleótidos de al menos uno de SEQ ID NOS: 1, 3 y 5 en condiciones de hibridación que comprende la hibridación a una temperatura de 30 ° C en 5 x SSC , 5 x reactivo de Denhardt, 30% de formamida durante 20 horas, seguido por lavado dos veces en 2 x SSC, 0,1% SDS a aproximadamente 30 ° C durante aproximadamente 15 min seguido de 0,5 x SSC, 0,1% SDS a aproximadamente 30 ° C. durante unos 30 minutos; y una sintasa heparosano recombinante codificada por una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse a un complemento de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos como se establece en al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8 en condiciones de hibridación que comprenden la hibridación a una temperatura de 30 ° C en 5 x SSC, 5 x reactivo de Denhardt, 30% de formamida durante 20 horas, seguido por lavado dos veces en 2 x SSC, 0,1% SDS a aproximadamente 30 ° C durante aproximadamente 15 min seguido por 0,5 x SSC, SDS al 0,1% a aproximadamente 30 ° C durante unos 30 minutos. Sintetas heparosano recombinantes que caen dentro del alcance de la descripción anterior y se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención se han descrito en detalle en la patente de EE.UU. emitida del inventor. N° 7.307.159, emitida 11 de diciembre 2007; y las solicitudes de patente del inventor de EE.UU. Ser. N° 11 / 906.704, presentada el 03 de octubre 2007; y US Ser. N° 10 / 814.752, presentada el 31 de marzo 2004; todo el contenido de cada uno de los cuales se incorporan expresamente en este documento por referencia.

25 **[0073]** El uso de genes truncados transferasa de glucosaminoglucanos para producir las composiciones de biomaterial de la invención actualmente descrita y reivindicada también caen dentro de la definición de secuencias

preferidas como se expuso anteriormente. Por ejemplo, la eliminación de los últimos 50 residuos o los primeros 77 residuos de PmHS1 (SEQ ID NOS: 7 y 8, respectivamente) no inactiva su función catalítica (Kane et al., 2006). Aquellos de experiencia ordinaria en la técnica apreciarán que se pueda lograr la eliminación de aminoácidos sencilla desde cualquier extremo de la secuencia GAG sintasa. Las versiones truncadas de la secuencia tienen que simplemente ser comprobado para la actividad con el fin de determinar si dicha secuencia truncada es todavía capaz de producir GAGs. Las otras sintasas GAG descritos y reivindicados en la presente memoria también son susceptibles de truncamiento o alteración con la preservación de la actividad, y los usos de tales sintasas GAG truncadas o alternados también caen dentro del alcance de la presente invención.

5
10 **[0074]** Las transferasas de glucosaminoglucanos recombinantes utilizadas de acuerdo con la presente invención también abarcan secuencias esencialmente como se expone en SEQ ID NOS: 1-8. El término "una secuencia esencialmente como se expone en la SEC ID NO: X significa que la secuencia corresponde sustancialmente a una porción de SEQ ID NO: X y tiene relativamente pocos aminoácidos o codones que codifican los aminoácidos que no son idénticos a, o un biológicamente equivalente funcional de, los aminoácidos o codones que codifican los aminoácidos de SEQ ID NO: X. El término "equivalente biológicamente funcional" se entiende bien en la técnica y se define adicionalmente en detalle en este documento, como un gen que tiene una secuencia esencialmente como se expone en SEQ ID NO: X, y que se asocia con la capacidad de los procariontes para producir HA o un polímero heparosano in vitro o en vivo. En los ejemplos anteriores X se refiere a cualquiera de SEQ ID NO: 1-8 o cualesquiera secuencias adicionales establecidos en este documento, tales como las versiones truncadas o mutadas de pmHS1 que están contenidos generalmente en SEQ ID NOS: 7-8.

15
20 **[0075]** La técnica está repleta de ejemplos de la capacidad del practicante de hacer cambios estructurales a un segmento de ácido nucleico (es decir, codificación conservado o sustituciones de aminoácidos semi-conservados) y aún conservar su actividad enzimática o funcional cuando se expresa. Véase, por ejemplo especial de la literatura que acredite tales: (1) Risler y otros. Las sustituciones de aminoácidos en las proteínas relacionadas estructuralmente. Un enfoque de reconocimiento de patrones. *J. Mol. Biol.* 204: 1019-1029 (1988) [. . . de acuerdo con la intercambiabilidad observado de cadenas laterales de aminoácidos, sólo cuatro grupos podrían ser delineadas; (I) Ile y Val; (ii) Leu y Met, (iii) Lys, Arg, y Gln, y (iv) Tyr y Phe].;(2) Niefind et al. Aminoácidos de similitud Coeficientes para modelado de proteínas y Secuencia alineación Derivado de Principal-Cadena plegable Anolis. *J. Mol. Biol.* 219: 481-497 (1991) [parámetros de similitud permiten sustituciones de aminoácidos que se diseñen]; y (3) Overington y otros. Aminoácidos Tablas específicas del entorno de sustitución Plantillas Terciario y Predicción de los pliegues de proteínas, *Protein Science* 1: 216-226 (1992) [Análisis del patrón de sustituciones observadas en función del entorno local muestra que hay patrones distintos. . . . Se pueden hacer cambios compatibles.]

25
30
35 **[0076]** Es ampliamente reconocido que un par de enzimas distintas, incluso con 30, 50 o 70% de identidad o similitud en el sitio activo (de las regiones funcionales) de los mismos puede poseer la misma actividad catalítica. Como la mayoría de la secuencia de la proteína es un andamio para el sitio activo, no se requiere que todas las regiones de las enzimas sean exactamente iguales entre homólogos o análogos funcionales de la enzima. Además, algunas secuencias adicionales (no catalíticos) también pueden estar presentes, reduciendo así los niveles totales de similitud de proteínas. Por lo tanto, las regiones funcionales (y secuencias no enteras) deben ser la base para las comparaciones de similitud entre dos enzimas.

40
45 **[0077]** Estas referencias y muchas otras, indican que un experto ordinario en la técnica, dada una secuencia de ácido nucleico o un aminoácido, podría hacer sustituciones y cambios en la secuencia de ácidos nucleicos sin cambiar su funcionalidad (ejemplos específicos de tales cambios se dan en lo sucesivo, y generalmente se establecen en la SEQ ID NOS: 7-8). Además, un segmento de ácido nucleico sustituido puede ser altamente idéntica y retener su actividad enzimática con respecto a su padre no adulterada, y sin embargo todavía no poder hibridar al mismo. Adicionalmente, la presente solicitud describe 4 enzimas y numerosos mutantes de estas enzimas que aún conservan al menos el 50% de la actividad enzimática de la enzima, es decir los padres no mutada, 1/2 de la actividad transferasa de acción dual de la matriz sin adulterar. Como tal, las variaciones de las secuencias y enzimas que caen dentro de las limitaciones funcionales definidos anteriormente se han descrito en las aplicaciones incorporadas por referencia. Un experto ordinario en la técnica, dada la presente memoria descriptiva y las divulgaciones de las solicitudes principales incorporados por referencia, sería capaz de identificar, aislar, crear, y probar ADN en secuencias y / o enzimas que producen natural o quimérico o híbrido moléculas de GAG. Como tal, la presente invención reivindicada y descrita no debe considerarse como limitada exclusivamente al uso de las secuencias específicas descritas y / o incorporados por referencia en el presente documento.

50
55
60 **[0078]** La invención actualmente descrita y reivindicada puede utilizar segmentos de ácido nucleico que codifica un HS enzimáticamente activa a partir de *P. multocida* -pmHS1 y / o PmHS2. Uno de experiencia ordinaria en la técnica apreciará que las sustituciones se pueden hacer a los segmentos de ácido nucleico o pmHS1 PmHS2 enumerados en SEQ ID NO: 1, 3 y 5, respectivamente, sin desviarse fuera del alcance y reivindicarse de la presente invención. De hecho, se han hecho tales cambios y se describen a continuación con respecto a los mutantes producidos. Sustituciones de aminoácidos funcionalmente equivalente estandarizados y aceptados se presentan en la Tabla II. Además, otras enzimas análogas u homólogas que son funcionalmente equivalentes a las secuencias sintasa descritas también serían apreciados por los expertos en la técnica que son igualmente útiles en los métodos

65

de la presente invención, es decir, un nuevo método para controlar con precisión el tamaño distribución de polisacáridos, a saber glucosaminoglucanos.

TABLA II

Grupo Aminoácido	Sustituciones Conservadoras y Semi-Conservadoras
Grupos NonPolares R	Alanina, valina, leucina, Isoleucina, prolina, metionina, Fenilalanina, Triptófano
Grupos Polares R, pero sin carga	Glicina, serina, treonina, cisteína, Asparagina, Glutamina
Grupos R Carga Negativa	Ácido Aspártico, Ácido Glutámico
Grupos R Carga Positiva	Lisina, Arginina, Histidina

[0079] Teniendo en cuenta la degeneración del código genético, así como sustituciones conservadas y semi-conservadas, secuencias que tienen entre aproximadamente 40% y aproximadamente 99%; o más preferiblemente, entre aproximadamente 60% y aproximadamente 99%; o más preferiblemente, entre aproximadamente 70% y aproximadamente 99%; o más preferiblemente, entre aproximadamente 80% y aproximadamente 99%; o incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 90% y aproximadamente 99% de identidad a los nucleótidos de al menos uno de SEQ ID NO: 1, 3 y 5 serán secuencias que son "esencialmente como se establece en al menos uno de SEQ ID NO: 1, 3 y 5. Las secuencias que son esencialmente los mismos que los establecidos en al menos uno de SEQ ID NO: 1, 3 y 5 también puede ser definido funcionalmente como secuencias que son capaces de hibridar a un segmento de ácido nucleico que contiene el complemento de al menos una de las SEQ ID NO: 1, 3 y 5 bajo condiciones estándar de hibridación rigurosas, "condiciones de hibridación moderadamente rigurosas", "condiciones de hibridación menos rigurosas" o "hibridación de baja rigurosidad condiciones" condiciones estándar adecuado o menos estrictos hibridación serán bien conocidas para los expertos en la técnica y se establezcan claramente en lo que sigue. En una realización preferida, se utilizan condiciones de hibridación rigurosas estándar o condiciones de hibridación menos rigurosas.

[0080] Los términos "condiciones estrictas de hibridación estándar", "condiciones moderadamente rigurosas", y las condiciones de hibridación menos rigurosas o "condiciones de hibridación de baja rigurosidad" se usan en este documento, se describen aquellas condiciones bajo las cuales segmentos de ácido nucleico sustancialmente complementarios formarán estándar de apareamiento de bases de Watson-Crick y por lo tanto "hibridar" el uno al otro. Un número de factores son conocidos que determinan la especificidad de la unión o hibridación, tales como el pH; la temperatura; concentración de sal; la presencia de agentes, tales como sulfóxido de dimetil formamida y; la longitud de los segmentos que hibridar; y similares. Hay varios protocolos para experimentos de hibridación estándar. Dependiendo de la similitud relativa de ADN diana y el ADN sonda o consulta, entonces la hibridación se realiza bajo condiciones de baja o menos estrictas rigurosas o moderadas.

[0081] La porción de hibridación de los ácidos nucleicos de hibridación típica es al menos aproximadamente 14 nucleótidos de longitud, y preferiblemente entre 14 y 100 nucleótidos de longitud aproximadamente. La porción de hibridación del ácido nucleico de hibridación es al menos 60%, por ejemplo, al menos 80% o al menos 90% aproximadamente, idéntica a una porción o la totalidad de una secuencia de ácido nucleico que codifica una heparina / sintasa heparosano o su complemento, tales como SEQ ID NO: 1, 3 o 5 o el complemento de la misma. La hibridación de la sonda de oligonucleótido a una muestra de ácido nucleico típicamente se realiza bajo condiciones de hibridación estándar o estricta. Dúplex de ácido nucleico o la estabilidad del híbrido se expresa como la temperatura de fusión o T_m , que es la temperatura a la que una secuencia de ácido nucleico de la sonda se disocia de un ADN diana. Esta temperatura de fusión se utiliza para definir las condiciones de astringencia requeridas. Si se han de identificar secuencias que están relacionadas y sustancialmente idéntica a la sonda, en lugar de idénticas, entonces son útiles para establecer primero la temperatura más baja a la que sólo se produce la hibridación homóloga con una concentración particular de sal (por ejemplo, SSC, SSPE, o HPB). Entonces, suponiendo que 1% de incompatibilidad resultados desalineamientos en un 1 ° C. disminución de la T_m , la temperatura del lavado final en la reacción de hibridación se reduce en consecuencia (por ejemplo, si las secuencias que tienen > 95% de identidad con la sonda se buscan, la temperatura del lavado final se redujo en aproximadamente un 5 C). En la práctica, el cambio en T_m puede estar entre aproximadamente 0,5 ° C y alrededor de 1,5 ° C por 1% de desajuste. Ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas estándar incluyen la hibridación a aproximadamente 68 ° C en 5 x SSC / 5 x solución de Denhardt / 1,0% SDS, seguido de lavado en 0,2 x SSC / 0,1% SDS a temperatura ambiente o hibridación en 1,8 x HPB en alrededor 30 ° C a 45 ° C, seguido por el lavado de un 0,2-0,5 x HPB en alrededor de 45 ° C. Moderadamente condiciones restrictivas incluyen hibridación como se describe anteriormente en 5 x SSC5 x solución al 1% SDS lavado de Denhardt en 3 x SSC a 42 ° C. Los parámetros de concentración de sal y la temperatura pueden variar para alcanzar el nivel óptimo de identidad entre la sonda y el ácido nucleico diana. Orientación adicional con respecto a tales condiciones es fácilmente disponible en la técnica, por ejemplo, por Sambrook y otros, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Press, NY); y Ausubel y otros (eds.), 1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, Nueva York). Varios ejemplos de protocolos de astringencia bajas incluyen: (A) hibridar en 5 x SSC, 5 x reactivo de Denhardt, 30% de formamida a aproximadamente 30 ° C durante aproximadamente 20 horas seguido de lavado dos veces en 2 x SSC, 0,1% SDS a aproximadamente 30 ° C durante aproximadamente 15 minutos, seguido de 0,5 x SSC, SDS al 0,1% a aproximadamente 30 ° C durante unos 30 minutos (FEMS Microbiology Letters, 2000, vol 193, p 99-103.); (B)

hibridar en 5 x SSC a aproximadamente 45 ° C, seguido toda la noche de un lavado con 2 x SSC, a continuación, en 0,7 x SSC a aproximadamente 55 ° C. (J. Métodos Viológico, 1990, vol. 30, p. 141- 150);o (C) hibridación en 1,8 x HPB a unos 30 ° C a 45 ° C; seguido de lavado en 1 x HPB a 23 ° C.

5 **[0082]** Los segmentos de ADN que pueden ser utilizados para producir las composiciones de biomaterial de la invención actualmente descrita y reivindicada abarcan segmentos de ADN que codifican las proteínas del SA equivalentes biológicamente funcionales y péptidos. Tales secuencias pueden surgir como consecuencia de redundancia de codón y equivalencia funcional que se sabe que se producen naturalmente dentro de las secuencias de ácidos nucleicos y las proteínas así codificadas. Alternativamente, proteínas o péptidos funcionalmente
10 equivalentes pueden crearse mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante, en que los cambios en la estructura de proteínas pueden diseñarse, en base a las consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que se intercambian. Los cambios diseñados por el hombre pueden introducirse mediante la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, para introducir mejoras en la actividad de la enzima o para la antigenicidad de la proteína HS o para probar mutantes HS con el fin de examinar la actividad HS a nivel molecular o a producir mutantes HS haber cambiado o nueva actividad enzimática y / o especificidad de sustrato de azúcar.

[0083] Heparosano, un polímero de azúcar que es el precursor biosintético natural de la heparina y sulfato de heparán, tiene numerosas características que indican que este material exhibe un rendimiento mejorado en una variedad de aplicaciones médicas o dispositivos médicos. En comparación con HA y heparina, dos polímeros muy estructuralmente similares utilizados en muchas aplicaciones actuales en varios mercados grandes, heparosano es más estable en el cuerpo, como no hay enzimas de origen natural degradar heparosano, y por lo tanto las composiciones de biomaterial de la presente invención deben tener ya tiempos de vida en comparación con los biomateriales utilizados actualmente. Además, heparosano interactúa con menos proteínas (por tanto, menos ensuciamiento) y células (por tanto, menos infiltración, cicatrices, o coagulación) en comparación con los biomateriales existentes.

[0084] En comparación con los plásticos sintéticos o de carbono, el carácter hidrófilo naturales (aka gran apetencia por el agua) características de heparosano también mejoran la compatibilidad con los tejidos. Las proteínas animales derivados (por ejemplo, colágeno, albúmina de suero bovino) y la hidroxiapatita de calcio a menudo tienen efectos secundarios, incluyendo, pero no limitado a, provocar una respuesta alérgica y / o estimular la granulación (5). Por otro lado, incluso ciertas bacterias patógenas utilizan heparosano para ocultar en el cuerpo ya que este polímero es no inmunogénico (8-10). Las composiciones de biomaterial de la invención actualmente descrita y reivindicada producido a partir de una fuente no animal también prometen estar libres de agentes extraños (por ejemplo, virus de vertebrados, priones) que podrían contaminar los animales o las fuentes de origen humano.

[0085] Ciertos hidratos de carbono juegan un papel en la formación y el mantenimiento de las estructuras de los organismos multicelulares, además de papeles más conocidos como nutrientes para la energía. Los glucosaminoglucanos [GAG], polisacáridos lineales largos que consisten en repeticiones de disacáridos que contienen un azúcar amino, son bien conocidos por ser esenciales en los vertebrados (9, 11-15). Las estructuras de GAG poseen muchos grupos negativos y están equipadas con grupos hidroxilo, por lo tanto, estos azúcares tienen una alta capacidad para adsorber agua e iones. La heparina / heparán (backbone [β 4GlcUA- α 4GlcNAc]_n), la condroitina (backbone [β 4GlcUA- β 3GalNAc]_n), y ácido hialurónico (HA; columna vertebral [β 4GlcUA- β 3GlcNAc]_n) son los tres GAG más prevalentes en los humanos. Dependiendo del tipo de células y tejidos, los GAGs son estructurales, la adhesión, y / o elementos de señalización. Unos microbios también producen revestimientos inteligentes de polisacáridos extracelulares, llamados cápsulas, compuestas de cadenas de GAG que sirven como factores de virulencia (9, 10). La cápsula está pensada para ayudar en la evasión de las defensas del huésped, tales como fagocitosis y complemento. Como el polisacárido microbiano es idéntico o muy similar a la GAG anfitrión, la respuesta de anticuerpos es muy limitada o inexistente.

[0086] Comercialmente, los polímeros GAG se extraen de cualquiera de los tejidos animales o cultivos bacterianos. El mercado actual de GAG es ~ \$ 4-8 mil millones y va creciendo a medida que surgen más aplicaciones médicas. Por ejemplo, la heparina es el fármaco más utilizado (un anticoagulante) en los hospitales.

[0087] La producción de las especies heparinoides finales se encuentran en animales y requiere múltiples etapas de procesamiento in vivo (12). La ruta biosintética general para el sulfato de heparina / heparina en los seres humanos y otros vertebrados es:

60

65

	Paso polímero	Unidad Repita	Nombre común de
5	1.polimerización de columna vertebral	(GlcNAc-GlcUA) _n	heparosano
	2.N-desacetilación y N-sulfatación	(GlcNSO ₄ - GlcUA) _n	N-sulfo- heparosano
	3.epimerización de unidad de ácido *	(GlcNSO ₄ -IdoUA) _n	
10	4.más O-sulfatación de azúcar-unidades *	(GlcNSO ₄ [OSO ₄] - IdoUA- [OSO ₄]) _n	heparán sulfato, heparina
	* nota - niveles epimerization y sulfatación varían en los tejidos y estado de desarrollo, y entre las especies.		

15 [0088] En los seres humanos, heparosano sólo existe de forma transitoria, que sirve como un precursor de los productos finales más altamente modificadas de heparán sulfato y heparina. En contraste, las cepas bacterianas establecidas en este documento producen heparosano como su producto final (16). Debido a la menos compleja composición de células bacterianas y a la facilidad relativa con la que su crecimiento y la expresión pueden ser moduladas, la cosecha de un polímero a partir de microbios es mucho más fácil, más escalable, y menos costosa que la extracción de tejidos animales.

20 [0089] Los rellenos dérmicos sirven para reemplazos de tejidos blandos o agentes de aumento (5, 6). La necesidad de un relleno dérmico puede surgir de envejecimiento (pérdida de HA y elastina), trauma (pérdida de tejido), acné (picaduras graves), y / o atrofia (emaciación ciertas enfermedades incluyendo la lipoatrofia). Tres características importantes que deben poseer los rellenos dérmicos incluyen a) la capacidad de llenar el espacio, b) el mantenimiento de la hidratación, y c) biocompatibilidad (5). Actualmente, polisacáridos, proteínas, plásticos y cerámicas han sido utilizados como biomateriales en rellenos dérmicos. Con respecto a la apariencia estética y la facilidad de implantación, geles inyectables más suaves tienen mejores atributos; Por lo tanto, se utilizan ampliamente polisacáridos y proteínas. Además de los usos terapéuticos, aplicaciones cosméticas son cada vez más generalizada. Alternativas al tratamiento de relleno dérmico son el uso de la cirugía (i) de plástico (endurecimiento de la piel), (ii) los agentes nerviosos como BOTOX® (relajar los músculos) matando, y (iii) el uso de grasa autóloga. En comparación con los rellenos dérmicos, estas alternativas son más invasivas y / o suelen dejar al paciente con un aspecto poco natural (5, 6). Para las víctimas de trauma, cicatrices, o enfermedad grave, un objetivo de la terapia es infundir más confianza en sí mismo y una mejor disposición; este efecto no debe descartarse, ya que el estado mental de un paciente es importante para la curación total.

35 [0090] Un objetivo importante de la bioingeniería es el diseño de dispositivos artificiales implantados para reparar o para controlar el cuerpo humano. Polímeros de alta resistencia, aleaciones resistentes, versátiles y semiconductores tienen muchas propiedades que hacen que estos materiales sean deseables para tareas de bioingeniería. Sin embargo, el cuerpo humano tiene una amplia gama de defensas y respuestas que evolucionaron para prevenir infecciones y para eliminar sustancias extrañas que dificulta la utilización de sustancias artificiales modernas (17, 40 18). La mejora de la biocompatibilidad de estos materiales eliminará un cuello de botella importante en el avance de la bioingeniería.

45 [0091] Un ejemplo destacado de una necesidad médica de recubrimientos superficiales mejoradas se encuentra en la enfermedad cardiovascular. Los daños causados por esta enfermedad son un problema muy frecuente y costoso; el sistema del paciente es la falta de oxígeno y nutrientes debido a la mala circulación sanguínea. La disponibilidad de injertos de vasos sanguíneos a partir de trasplantes (ya sea autólogo o donante) se limita así como inasequible. Por lo tanto, la habilidad de crear nuevos vasos artificiales es una meta, pero se necesitará más tiempo para perfeccionar debido a la compleja ingeniería y necesidades biológicas. Otra corriente intervención terapéutica, más accesible emplea stents, dispositivos artificiales que mantienen abierta la cavidad interior del vaso sanguíneo de un paciente. Como sumada por Jordan & Chaikof, "El desarrollo de un injerto vascular de pequeño diámetro clínicamente duradera, así como biosensores permanentemente implantables y sistemas de órganos artificiales que se interconectan con sangre, incluyendo el corazón artificial, riñón, hígado y pulmón, siendo limitado por la superficie trombóticos respuestas inducidas "(7). Por lo tanto, para avanzar en esta tecnología aún más, se necesitan recubrimientos de superficie tromborresistente que inhiben: (i) la proteína y de la célula de adsorción, (ii) la formación de trombina y fibrina, y (iii) la activación y agregación de plaquetas.

55 [0092] Plásticos artificiales (poli [lactida] en Sculptra® (Sanofi-Aventis) o poli [metacrilato de metilo] en Artecoll® (Artes Medical, Inc., San Diego, Calif.), Cerámica (hidroxiapatita de calcio en Radiesse® (Bioform Medical, Inc. , San Mateo, California.)) o carbono puro tienen utilidad para muchas aplicaciones terapéuticas (1, 5, 7, 18), pero en muchos aspectos, sus propiedades químicas y físicas no son tan óptimas como los polisacáridos para los objetivos específicos de los rellenos dérmicos o revestimientos de superficies. Los problemas más críticos son la falta de una buena humectabilidad (debido a la pobre interacción con el agua) y / o dureza (que conduce a una sensación no natural o fragilidad). La invención actualmente reivindicada y descrita se relaciona con el uso de heparosano para reemplazar y suplantat polímeros de azúcar útiles que son hidrófilos (amante del agua) y se pueden preparar en una forma suave.

- 5 [0093] Además de HA y heparina, otros polisacáridos tales como dextrano ($[\alpha 6\text{Glc}]_n$), celulosa ($[\beta 4\text{Glc}]_n$), o quitosano ($[\beta 4\text{GlcN}]_n$) tener muchas propiedades útiles, pero puesto que no son, naturalmente, aniónicas (cargadas negativamente), estos polímeros no imitan la matriz o las superficies extracelulares naturales de los vasos sanguíneos. La celulosa y dextrano pueden transformarse químicamente en polímeros cargados que ayudan a aumentar su biocompatibilidad y mejorar sus propiedades fisicoquímicas generales, pero las duras condiciones se requieren conduciendo a problemas de variabilidad y de calidad de lote a lote. Por otro lado, GAGs, los polímeros naturales, tienen cargas negativas intrínsecas.
- 10 [0094] HA y heparina se han empleado como revestimientos biomaterial para prótesis y stents vasculares (vasos sanguíneos artificiales y soportes), así como revestimientos sobre las lentes intraoculares y prótesis de tejidos blandos (7, 22). La razón fundamental es prevenir la coagulación sanguínea, mejorar el ensuciamiento resistencia y evitar la adhesión después de la cirugía (cuando los órganos se pegan de forma indeseable). Las composiciones de biomaterial de la presente invención también deberían ser adecuadas como un recubrimiento, como se describe en mayor detalle después en este documento.
- 15 [0095] Una ventaja clave con heparosano es que ha aumentado bioestabilidad en la matriz extracelular en comparación con otros GAGs. Como con la mayoría de los compuestos sintetizados en el cuerpo, se hacen nuevas moléculas, y después de servir a su propósito, se descomponen en componentes más pequeños para reciclaje. La heparina y el heparán sulfato eventualmente son degradados y entregados por una única enzima conocida como heparanasa (23, 24). Desafío experimental de heparosano y N-sulfo-heparosano con heparanasa, sin embargo, muestra que estos polímeros que carecen de O-sulfatación no son sensibles a la acción enzimática in vitro (25, 26). Estos hallazgos demuestran que heparosano no está fragmentado enzimáticamente en el cuerpo. En general, esto indica que heparosano es un biomaterial muy estable.
- 20 [0096] Otra glucosaminoglucano, hialuronano [HA], es muy abundante en el cuerpo humano y se emplea actualmente como un biomaterial para muchas aplicaciones (2, 5, 6, 27, 28). Sin embargo, una familia de enzimas degradativas, llamados hialuronidasas, ataca HA en el cuerpo durante el recambio normal (29) de una manera similar a la actividad de la heparanasa. Heparosano, aunque posee la misma composición unidad de azúcar, tiene diferentes enlaces interazúcares que no son escindibles por las hialuronidasas (30) (FIG. 1). Por lo tanto se espera heparosano a ser más larga vida de HA, un biomaterial actualmente útil, en el cuerpo humano. Para rellenos dérmicos, esta característica se traduce en una reducción en el número de inyecciones que deban llevarse a cabo (en la actualidad ~2-3 por año). Para los productos basados en HA con la mayor cuota de mercado, las cadenas de polisacáridos son reticuladas, lo que dificulta la digestión hialuronidasa (6), pero se sigue produciendo la escisión; dicha escisión se debilita y finalmente destruye la red de gel. Los dispositivos de la presente invención reivindicada y divulgada, que tienen ya recubrimientos duraderos, no deberían tener que ser removido / reemplazado lo más rápido y / o deberían tener tasas de fracaso / complicación más bajas en comparación con los dispositivos de biomateriales existentes.
- 25 [0097] Polímero heparosano se prevé que sea mucho más estable en el compartimiento extracelular de HA como se describió anteriormente. Sin embargo, si se generan fragmentos heparosano (por especies de oxígeno reactivo) y luego internalizados en el lisosoma, estas cadenas será degradada por beta-glucosidasa y beta-hexosaminidasa enzimas residentes (que eliminan un azúcar a la vez de los extremos de la cadena) como heparina o HA (31). Por lo tanto, el polímero heparosano es biodegradable y no es permanente y por lo tanto no debe causar un problema de almacenamiento lisosomal. Una ventaja clave con heparosano es que ha aumentado bioestabilidad en la matriz extracelular en comparación con otros GAGs.
- 30 [0098] Heparosano es un polímero de azúcar transitoriamente existente en los mamíferos. En términos generales, las moléculas que normalmente existen en el cuerpo son consideradas como "propias" y por lo tanto no son sometidas al ataque de los anticuerpos, los fagocitos, o el sistema de complemento. Este hecho es empleado por ciertas bacterias patógenas que recubren a sí mismos con moléculas idénticas o muy similares a albergar moléculas. Dos tipos diferentes de bacterias, *Pasteurella multocida* tipo D (16) y *Escherichia coli* K5 (32), ambos producen recubrimientos heparosano que son importantes para el camuflaje y se esconden de las defensas del huésped (8, 32). Por lo tanto, heparosano se prevé que sea relativamente invisible a las defensas humanas de primera línea.
- 35 [0099] Las funciones normales de sulfato de heparina / heparán en los vertebrados incluyen, pero no se limitan a, la unión factores de coagulación (que inhiben la coagulación de la sangre) y factores de crecimiento (señalización células a proliferar o diferenciar) (33). Las estructuras clave de heparina / heparán sulfato que son reconocidos por estos factores incluyen una variedad de patrones de O-sulfatación y la presencia de ácido idurónico [IdoUA]; en general, los polímeros sin estas modificaciones no estimulan el crecimiento de la coagulación celular (33). Por lo tanto, geles o recubrimientos a base de heparosano no deberían provocar la coagulación no deseada o el crecimiento celular / modulación.
- 40 [0100] El sulfato de heparán también interactúa con las moléculas de la matriz extracelular incluyendo el colágeno (33), pero heparosano no debe interactuar fuertemente bajo condiciones fisiológicas normales. La deposición de colágeno es parte del proceso normal de reparación de la herida; por lo tanto, geles heparosano y revestimientos
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

deberían evitar generar cicatrices. Otras proteínas que hacen heparina / heparán sulfato se unen y varios tipos de células con otros receptores de proteínas para el heparán sulfato / heparina no deben adherirse a heparosano. Ciertos factores quimiotácticos que se unen heparina no se sabe que se unen heparosano (33). Por lo tanto, las células no deben buscar e infiltrar materiales a base de heparosano, poniendo así en peligro su integridad o cambiar sus propiedades.

[0101] El hialuronano [HA] se hace normalmente como una gran polisacárido de peso molecular ($n = 10^{3-4}$ unidades de azúcar), pero con el tiempo (~día a semanas) HA se degrada en oligosacáridos más pequeños ($n = 4-20$ unidades) (29, 34). Estos últimos fragmentos tienen dos actividades biológicas (35-37) que pueden tener un impacto directo en el cuerpo implantado con un biomaterial basado en HA. En primer lugar, estos fragmentos son angiogénico, y por lo tanto causan nuevos vasos sanguíneos para brotar. En segundo lugar, los fragmentos parecen constituir una "señal de peligro" en el que el cuerpo se alerta al potencial de ataque de patógenos o daños. En ambos casos, estos sistemas de reparación normales volverán a modelar o alterar los tejidos cerca del biomaterial derivados de HA implantado o superficie con recubrimiento de HA, que puede ser perjudicial. Tanto la angiogénesis y los eventos "señales de peligro" son iniciados por HA oligosacáridos de unión a los receptores de la superficie celular; Receptores CD44 y de tipo de daño, respectivamente, parecen ser las proteínas de señalización (38, 39). Heparosano, que es estructuralmente similar a la HA, no se une a CD44 (resultados preliminares de laboratorio, DeAngelis). Ciertos linfocitos (células blancas de la sangre) con CD44 de superficie que interactúan con HA también no debe reconocer heparosano; se cree que ayuda a mover el CD44 de células de la sangre a los tejidos (extravasación). Heparosano no debe servir como tal sitio de atraque, lo que limita la infiltración de linfocitos del biomaterial implantado o alrededores.

[0102] En general, heparosano es más biológicamente inerte de HA o heparina, tanto popular como biomateriales altamente rentables. Para rellenos dérmicos y aplicaciones de cirugía reconstructiva, el espacio de llenado, las características de retención de humedad del biomaterial se desean sin desencadenar los acontecimientos posteriores, como la angiogénesis, inflamación o infiltración cascadas. Del mismo modo, las superficies heparosano recubiertos deben interactuar libremente con el agua, pero las proteínas y las células no deben unirse fuertemente al polímero.

[0103] Algunas aplicaciones médicas pueden requerir un material bioactivo o la modificación de la superficie en lugar de las propiedades inertes de heparosano. Heparosano todavía puede servir potencialmente como el andamio que contiene o liberar estas moléculas bioactivas.

[0104] Actualmente, varios biomateriales aprobados (incluyendo el colágeno y algunos HA) tienen limitaciones debido a los componentes derivados de origen humano-animal o (5, 6). Por ejemplo, Baxter tuvo que retirar lotes de heparina porcina en 2008. Agentes extraños tales como principios de virus o priones no podrán ser removidos por completo durante el procesamiento. El colágeno bovino es potencialmente la preocupación más grande a la luz de la "enfermedad de las vacas locas", pero los agentes extraños humanos también pueden ser transferidos de los materiales de bancos de tejidos o líneas celulares. Además, los patógenos hasta ahora no reconocidos o emergentes, así como los niveles de patógenos muy bajas (es decir, debido a las pruebas erróneas o "falso negativo"), son siempre una posibilidad con materiales derivados de vertebrados. Por lo tanto, la FDA proporcionó una relación de orientación en 2004 que sólo sintético o materiales a base de plantas deberán utilizarse en futuras terapias, si es posible. Afortunadamente, las composiciones de biomaterial heparosano derivadas de bacterias de la presente invención no pueden poseer los priones, VIH o virus de la hepatitis, etc., ya que estos contaminantes se asocian únicamente con vertebrados.

[0105] Además de contener agentes adventicios potenciales, las proteínas animales son generalmente reconocidos por el sistema inmunológico humano porque sus secuencias de aminoácidos no son idénticas a las del hombre. Algunos individuos humanos son sensibles y por lo tanto no puede utilizar el colágeno derivado de vaca o la de HA derivada de la cresta del pollo (5). Actualmente, las pruebas de la piel se utilizan para la detección de hipersensibilidad o alergenicidad. Sin embargo, ciertos individuos también pueden llegar a ser sensibles o reactivos a los materiales después de la implantación; en efecto, esa persona se habrá vacunado con un material extraño. Este efecto puede ser más problemático si el mismo material se da en varias aplicaciones, y una ligera respuesta se intensifica después que el sistema inmune se potencia varias veces. Con los procedimientos de relleno dérmico, múltiples aplicaciones son a menudo estándar. Si un efecto secundario perjudicial se produce una vez que se implanta un gel, es prácticamente imposible eliminar todo el material ofensivo.

[0106] Incluso si se emplea colágeno humano, después de la extracción y el procesamiento, su estado desnaturalizado o desplegada puede estimular potencialmente algunas enfermedades del tejido conectivo tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, polimiositis, dermatomiositis o (5). Por otro lado, heparosano no debe crear una respuesta autoinmune contra proteínas del tejido conectivo.

[0107] Material derivado Humano-se utiliza para dos productos, Cymetra™ (derivados del tejido dérmico acelular; LifeCell Corp., Branchburg, NJ) y aloinjerto colágeno (extractos de cultivo de fibroblastos). Además de las posibles preocupaciones de seguridad, estos materiales están limitados (derivan de material de tejido banco) y / o caro

(célula humana cultivada in vitro). Por otro lado, el polisacárido heparosano de la fermentación bacteriana puede ser un abundante, recurso renovable.

5 **[0108]** La química y estructuras físicas compartidas por HA, la heparina y heparosano resultan en su capacidad para unirse a grandes cantidades de agua y los iones para expandir tejidos e interactuar bien con los fluidos acuosos del cuerpo. Estos son los principales atributos beneficiosos para un relleno dérmico o un revestimiento.

10 **[0109]** En resumen, las principales características de las composiciones de biomaterial de la presente invención que proporcionan un rendimiento mejorado para el uso en rellenos dérmicos para la cirugía reconstructiva, no infame, y que no obstruya los dispositivos médicos, en comparación con HA o heparina productos existentes, incluyen, pero son no limitado a: ataque (a) resistencia a la mediada por enzima; (B) la falta de factor de coagulación, quimioatrayente, y el factor de crecimiento de los sitios de unión; (C) la falta de dominios de señalización celular o de fijación conocidos; (D) la falta de proteínas de vertebrados derivados y agentes extraños; y (e) la falta de alérgenos o inmunógenos basados en proteínas.

15 **[0110]** Se proporcionan ejemplos a continuación. Sin embargo, la presente invención describe y reivindica debe entenderse que no se limita en su aplicación a la experimentación, los resultados y los procedimientos de laboratorio específicos. Más bien, los ejemplos se proporcionan simplemente como una de varias formas de realización y están destinados a ser ejemplares, no exhaustivos.

20 EJEMPLOS

25 **[0111]** Producción de heparosano Polisacárido. Ciertas bacterias *Pasteurella multocida* producen un revestimiento extracelular compuesta de polímero heparosano no sulfatado que se cosecha fácilmente a partir de los medios de cultivo. Sólo hay una otra fuente conocida de no sulfatado, heparosano no derivado: la *Escherichia coli* K5. Una ventaja importante de la *Pasteurella* heparosano sobre *E. coli* K5 heparosano y heparina mamífero es que tiene un peso molecular más alto, ~200-300 kDa (16); Por lo tanto, geles formados de la *Pasteurella* heparosano deberían ser más fáciles de producir.

30 **[0112]** Matraces de agitación a pequeña escala de la *Pasteurella* microbio se cultivaron en medio sintético de 20 a 36 horas. La centrifugación se utiliza para eliminar las células. El medio gastado fue extraído con disolvente, luego se purifica de intercambio de aniones. El heparosano resultante es sustancialmente libre de proteína (según se juzga por los ensayos de Bradford y geles de SDS-PAGE con tinción de Coomassie) y el ADN (a juzgar por geles de agarosa con tinción de bromuro de etidio; ver FIG. 2) Contaminación. Este material (~0.2-0.5 gramos / litro de rendimiento) formado por polvo blanco libre de sal esponjoso adecuado para reacciones químicas de reticulación o de recubrimiento.

35 **[0113]** La producción de polisacárido Geles. Los agentes de reticulación, tales como, pero no limitado a, divinilsulfona (DVS) o di-epóxidos, fueron utilizados para hacer una variedad de geles GAG incluyendo una pequeña cantidad de un gel prototipo heparosano (FIG. 3). El gel es estable in vitro, mantiene su forma física, pero es suave como se desee.

40 **[0114]** La producción de revestimiento polisacárido. Radiactivo ¹²⁵I-etiquetados HA (FIG. 4), Un polímero con la misma reactividad química y peso molecular (~ 300 kDa) como el heparosano producido anteriormente, se incubó con acero o de silicona epoxi-activado (obtenido a partir de AeonClad Revestimientos, LLC) y a continuación se lavó extensivamente. La radiactividad de los materiales se comprobó en un contador gamma.

45 **[0115]** Como se muestra en la Tabla III, el azúcar radiactivo se acopló a ambas superficies; En contraste, las superficies de control en paralelo sin el recubrimiento epoxi no se unen sustancialmente el azúcar. Los recubrimientos fueron relativamente estables durante al menos 4 semanas (la longitud del estudio inicial) después de incubación en solución salina (múltiples lavados con el tiempo).

50 **[0116]** Estabilidad de composiciones de biomateriales en el plasma humano. FIG. 5 ilustra que las composiciones de biomaterial de la presente invención no se degradan en la sangre humana. La sangre fresca se obtuvo a partir de un pinchazo en el dedo de un varón humano sano, se diluyó 1: 1 con PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4), y las células se eliminaron mediante centrifugación suave (300 x g, 2 min). El plasma en el sobrenadante se mezcló con una solución heparosano en PBS (polímero de 0,7 mg / ml) en una proporción de 1: 2 vol / vol y después se incubó durante la noche a 37 ° C. Una muestra de 10 microlitros se sometió a electroforesis en gel. Como controles, plasma solo o heparosano solo se probaron en paralelo. Como lo demuestra FIG. 5, El peso molecular de la heparosano original (H) es la misma, incluso después de la incubación con plasma (P) después de la incubación durante la noche. Por lo tanto, las composiciones de biomaterial heparosano de la presente invención son biomateriales estables.

65

alcanzables. Por otro lado, el polímero más pequeña de *E. coli* K5 es sólo ~30-80 kDa y por lo tanto más difíciles de manera efectiva reticular en concentraciones de azúcar que pueda conseguirse fácilmente.

5 [0122] Los agentes de reticulación seleccionados tienen la capacidad de reaccionar de forma simultánea con dos grupos hidroxilo de los polímeros de azúcar, lo que permite múltiples cadenas que se conectan de forma covalente. Se crea una vasta red de cadenas reticuladas, formando de esta manera un gel de azúcar.

10 [0123] La invención actualmente reivindicada y descrita demuestra que heparosano es una mejor biomaterial para ciertas aplicaciones médicas accesible. Una comparación de las características y propiedades de la presente invención a las tecnologías existentes aparece en la Tabla IV.

15 [0124] La invención actualmente reivindicada y descrita incluye un método para aplicar un revestimiento de superficie polisacárido heparosano que proteger componentes de dispositivos médicos de las respuestas perjudiciales del cuerpo a la materia extraña. Curiosamente, no es un prototipo natural de tal revestimiento de la superficie: ciertas bacterias patógenas utilizan una cáscara externa del mismo polisacárido como camuflaje para crecer relativamente sin obstáculos en el cuerpo durante la infección (8). Por lo tanto, la presente invención reivindicada y descrita proporciona una interfaz biocompatible para cerrar la brecha entre las sustancias artificiales y la carne viva y la sangre.

20 [0125] Los objetivos que se pueden recubrir mediante la presente invención incluyen, pero no se limitan a, acero quirúrgico, ampliamente utilizado para stents, y caucho de silicona de grado médico, ampliamente utilizado para fluidos de tuberías y sangre. Las propiedades y características de la presente invención y los revestimientos existentes superficie del dispositivo médico se describen en la Tabla V.

25 [0126] Deposición de plasma es un proceso probado para depositar películas delgadas directamente a partir de un estado de gas sobre un sustrato sólido. Métodos de deposición de plasma suelen equilibrar los beneficios de tiempos de recubrimiento extendidos con los negativos de ablación de superficie que se produce con la exposición plasmática prolongada. La mayoría de los métodos de deposición de plasma utilizan una descarga continua para crear el estado de plasma. Sin embargo, la exposición prolongada puede comenzar a erosionar no sólo el revestimiento recién formado, sino también el material subyacente. Avanzado un solo paso de AeonClad, libre de disolventes, proceso pulsada elimina ablación de superficie, creando rápidamente una capa de polímero protector en el que un número de películas se puede depositar (42, 43). Por lo tanto, la presente invención incluye métodos para proporcionar un recubrimiento del biomaterial heparosano en la superficie de un sustrato utilizando tales métodos de deposición de plasma.

TABLA IV.

40 **Comparación de heparosano y existentes Biomateriales Quirúrgicos para Aplicaciones relleno dérmico.**

Variable Clave	Objetivo Proyecto	Práctica Actual	Barrera asociado del actual Procedimiento	Enfoques innovadores de Presente Invención
45 Estabilidad del revestimiento	De larga duración (semanas-meses).	HA, heparina, De suero bovino albúmina (BSA) Carbono (C) Lípidos (L)	Degradado por el cuerpo de enzimas naturales Desprenden de la superficie	Utilice heparosano, un polímero que no es enzimáticamente digerido en el cuerpo humano
50 Mojabilidad	Interactúa libremente con agua.	BSA, HA, heparina, L C	- Hidrofóbico	Utilice heparosano polímero preferente de agua
55 Las incrustaciones, coagulación	Superficie no une proteínas o células.	HA, heparina BSA, C, L	Se unen células de la sangre y factores de coagulación	Utilice relativamente y biológicamente polímero heparosano inerte
60 Transmisión Enfermedad	cero riesgo de virus animal o priones	HA [pollo], CG HA [bacteriana], PP, CHP	Riesgo potencial -	Utilice heparosano sin derivar de bacterias de animales

65

TABLA V. Comparativa de heparosano y Biomateriales existentes para aplicaciones de recubrimiento de superficies.

Variable Clave	Objetivo Proyecto	Práctica Actual	Barrera asociado del actual Procedimiento	Enfoques innovadores de Presente Invención
Gel Semi-estable Formación	Inyectable, suave, de larga duración (> 12-24 meses), pero no gel permanente.	Hyaluronan Gel (HA) Colágeno Gel (CG) Las partículas de plástico (PP) Ca hidroxiapatita Partículas (CHP)	Vida demasiado corta Aspecto granulado y vida demasiado larga Aspecto granulado demasiado larga vida útil, y no puede inyectar fácilmente	Utilice heparosano, un polímero que es no digerido enzimáticamente en cuerpo humano, y no es un material grueso, duro
Inmunogenicidad, Alergenicidad	No generación de anticuerpo	HA [bacteriana], PP, CHP HA [pollo], CG [bovina> humano]	----- respuesta Inmune o alérgica	Utilice polímero heparosano que ve "humano" y no desencadene sistema inmunológico.
Infiltración	Reducir adhesión celular y / o señalización	HA PP, CHP CG	Las proteínas y las células se unen ----- Las células se unen	Utilice polímero heparosano que carece de dominios de adhesión conocidos o señales de quimiotaxis
Enfermedad Transmisión	Cero riesgo de humanos o virus animal	HA [pollo], CG HA [bacteriana], PP, CHP	Riesgo potencial	Utilice heparosano derivado de animales sin bacterias.
Imagen de rayos X Compatible	No opaco o priones áreas marcadas.	HA, CG PP, CHP	Oscurece imágenes	De rayos-X transparente Uso heparosano.
Recurso Abundante	Renovables y no excesivamente costoso para producir.	CG [humana] HA, CHP, PP, CHP	Banco de tejidos Limitado de suministro o de células de cultivo derivada (costosa)	Utilice heparosano hecho vía la fermentación bacteriana.

Materiales y métodos

[0127] Heparosano Producción y pruebas: *P. multocida* tipo D células fueron cultivadas en medio sintético a 37 ° C en matraces de agitación de ~ 24 hrs. Medio de cultivo gastado (la parte líquida de la cultura después de retirar las células microbianas) se cosechó (por centrifugación a 10.000 x g, 20 min) y desproteinizado (extracción con disolvente con cloroformo) (16). El gran polímero heparosano aniónicos (~200-300 kpa) fue aislado mediante ultrafiltración (30 kpa peso molecular de corte; Amicon) y cromatografía de intercambio iónico (NaCl gradiente en Q-Sepharose, Pharmacia). En general, se eliminaron fácilmente las células (con la gran mayoría de los contaminantes) y las moléculas pequeñas (que consumiría enlaces cruzados o superficie activada).Cualquier endotoxina se eliminó por paso a través de una columna de polimixina inmovilizada (Pierce); entonces el material se ensayó con una *Limulus* ensayo basado amoebocyte-(Cambrex) para asegurar que el heparosano contiene <0,05 unidades de endotoxina / mg de sólido (basado en las directrices de la USP para dispositivos médicos).

[0128] El rendimiento y el peso molecular de la distribución del tamaño de heparosano en el medio gastado se comprobó mediante a) ensayos de carbazol para el ácido urónico (44) y b) electroforesis en gel de agarosa (1 x tampón TAE, 0,8-1,5% de agarosa), seguido de Stains-All detección (45). El ensayo es un ensayo de carbazol química espectrofotométrico que mide la cantidad de ácido urónico en la muestra a través de la producción de un color rosa; cada otro azúcar en la cadena de heparosano es un ácido glucurónico. El tamaño del polímero heparosano se determinó por comparación con estándares de tamaño monodisperso HA (HA Mín Global, Hyalose, LLC) se ejecutan en geles. El límite de detección del carbazol y los ensayos de gel es ~5-15 microgramos de

polímero. Se estima que se requieren ~3-5 gramos de polímero heparosano para gel y la preparación de recubrimiento.

5 **[0129]** *Gel general de síntesis.* La porosidad o la fuerza de un gel a base de polisacárido se pueden modular mediante la alteración de (a) las concentraciones de polímero y / o (b) la relación de polímero y reticulante. Menos polímero por unidad de volumen (es decir, baja concentración) tendrá una estructura más flexible. A una concentración de polímero de azúcar determinada, más enlaces cruzados resultan en geles fuertes con pequeños poros y menos enlaces cruzados resultan en geles suaves con los poros dilatados. Por lo tanto, se hizo una serie paralela de reacciones con cantidades variables de agente de reticulación y / o heparosano y se analizó. La gama de partida inicial para las condiciones de reacción es de 10-100 mg / ml heparosano reticulado con 50: 1 a 5: 1 w / w de polímero / reticulante en proporciones 0,1-0,25 M NaOH (pH \geq 9); divinilsulfona se hace reaccionar a 20 ° C durante 1 hora, mientras que el 1,2-diethanediol diglicidiléter se utiliza a 40 ° C durante 2-4 horas. Estas selecciones se basan en la preparación de productos Hylaform® y Restylane® (US Pat No. 4,582,865 y la Patente US No. 5.827.937, respectivamente.); sin embargo, la presente invención también incluye una extensión de este rango también. El uso de soluciones de NaOH muy alcalinas también ayuda a desinfectar los geles, una ventaja añadida para su procesamiento.

20 **[0130]** Después de la reacción de reticulación, el gel se lavó repetidamente con agua y se usó un tampón solución salina para eliminar cualquier exceso de reactivos (NaOH, reticulantes) y luego se sometió a quimiofísico y análisis biológico. En la realización más ampliamente empleado de rellenos dérmicos, se inyectó una suspensión o suspensión de partículas de gel (creado por tamizado a través de malla definido y / o interrupción sónica).

25 **[0131]** *Recubrimiento general de síntesis.* Se emplearon dos pasos: primero, plasma-activación de la superficie y la segunda, reacción química con heparosano. Una técnica de plasma pulsado ciclo de trabajo variable de frecuencia de radio (RF) se utiliza (42, 43). El uso de un algoritmo, el ciclo de trabajo óptimo (el plasma dentro y fuera de anchos de pulso se puede variar independientemente 0,01 a 100 milisegundos), tiempo de recubrimiento (por ejemplo, 20 minutos para añadir 100 nm de espesor de revestimiento), mezcla de monómeros, y la tasa de deposición de pico para cada recubrimiento y el sustrato están optimizados. La formación de la película se produce predominantemente en el plasma de veces a través de un mecanismo de radicales libres, iniciado por las especies reactivas producidas durante el brevísimo plasma en períodos. Básicamente, el uso de pulsos de frecuencia modulada permite niveles mucho más altos de retención de funcionalidades grupo reactivo de monómero, así como amplía la gama de químicas disponibles, en las películas de polímero producidas. Es importante destacar, también es posible variar, de una manera altamente controlada, la densidad superficial de los grupos reactivos por lo introdujo. El método de plasma de RF pulsada proporciona la flexibilidad para producir muchos tipos de recubrimientos incluyendo aquellos con características antimicrobianas, anti-trombogénicas, lubricantes, y biocompatibles.

40 **[0132]** Las superficies iniciales son (a) un tubo de silicona (grado médico Silastic, Dow Corning) y (b) de acero quirúrgico revestido con el metacrilato de glicidial reactivo; bajo condiciones de plasma pulsado bajo ciclo de trabajo, este reactivo se forma superficies que contiene epóxido para reacciones de acoplamiento heparosano posteriores simples (como en la Tabla III). Optimización preliminar del espesor de revestimiento de la superficie epóxido (para formar una capa estable de agua con buena reactividad de la superficie) ya se ha realizado por AeonClad, pero varios espesores para uso con heparosano también será explorado. Como se mencionó anteriormente, HA, cerca de proxy químico para heparosano, se ha inmovilizado en una forma estable a las muestras iniciales de acero activado y silicona.

50 **[0133]** Otros reticulantes posibles se pueden usar también. Por ejemplo, los recubrimientos que proporcionan grupos amino que par de grupos ácidos del GAG en presencia de carbodiimida, si es necesario. Además, tanto con el epóxido o las superficies de amina, moléculas espaciadoras se pueden introducir fácilmente que permita la fijación de la heparosano a diferentes distancias de los sustratos sólidos.

55 **[0134]** Las superficies revestidas a base de epóxido se han hecho reaccionar con hidroxilos de heparosano a pH alto (en analogía a la síntesis de gel, FIG. 3B). Para este procedimiento, condiciones ácidas para acoplarse a los epóxidos unidos a la superficie a través de los grupos carboxilato son también posibles. La superficie activada se inunda con la solución heparosano en el tampón apropiado (0,1-0,25 M de NaOH o 0,1 M fosfato de Na, pH 2-5) durante varias horas a 22-40 ° C. Luego se retira la solución y la superficie se lava a fondo (agua, solución salina, etc.) antes de la prueba. Superficies no activadas (control negativo), así como las superficies tienen señales más bajas en comparación.

60 **[0135]** Aunque la invención anterior se ha descrito en detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, será obvio para los expertos en la técnica que ciertos cambios y modificaciones pueden ponerse en práctica sin apartarse del espíritu y alcance de la misma, como se describe en esta memoria descriptiva y como se define en las reivindicaciones adjuntas a continuación.

65

Referencias

- [0136] Las siguientes referencias, en la medida en que proporcionan ejemplos de procedimientos u otros detalles suplementarios a los establecidos en la presente memoria, se incorporan específicamente en este documento por referencia en su totalidad como si se establece en el presente documento en particular.
- 5 1. Burg, KJ, Porter, S., y Kellam, JF (2000) La evolución de biomateriales para la ingeniería de tejido óseobiomateriales 21, 2347-2359
 - 10 2. Luo, Y., Kirker, KR, y Prestwich, GD (2000) reticuladas películas de hidrogel de ácido hialurónico: nuevos biomateriales para la administración de fármacos J Control de Liberación 69, 169-184
 3. Morra, M. (2005) Ingeniería de biomateriales superficies por ácido hialurónico Biomacromolecules 6, 1205-1223
 - 15 4. Olivier, V., Faucheux, N., y Hardouin, P. (2004) retos de biomateriales y enfoques para detener el uso de células en la cirugía reconstructiva ósea Drogas Discov Hoy 9, 803-811
 5. Johl, SS, y Burgett, RA (2006) agentes de relleno dérmico: una revisión práctica Curr Opin Ophthalmol 17, 471-479
 - 20 6. Eppley, BL, y Dadvand, B. (2006) inyectables rellenos de tejidos blandos: resumen clínico Plast Surg Reconstr 118, 98e-106e
 7. Jordania, SW, y Chaikof, EL (2007) Materiales tromborresistente Novela J Vasc Surg 45 Suppl A, A104-115
 - 25 8. DeAngelis, PL (2002) microbianas glicosiltransferasas glicosaminoglicanos Glycobiology 12, 9R-16R
 9. DeAngelis, PL (2002) Evolución de los glicosaminoglicanos y sus glicosiltransferasas: Implicaciones para las matrices extracelulares de los animales y las cápsulas de las bacterias patógenas Anatomical Record 268, 317-326
 - 30 10. Jann, K., y Jann, B. (1992) Cápsulas de Escherichia coli , la expresión y significado biológico Can J Microbiol 38, 705-710
 11. Sugahara, K., y Kitagawa, H. (2002) La heparina y la biosíntesis de sulfato de heparán IUBMB Vida 54, 163-175
 - 35 12. Esko, JD, y Lindahl, U. (2001) Molecular diversidad de sulfato de heparán J Clin Invest 108, 169-173
 13. Hardingham, TE, y Fosang, AJ (1992) Proteoglicanos: muchas formas y muchas funciones Faseb J 6, 861-870
 - 40 14. Laurent, TC, y Fraser, JR (1992) Hyaluronan Faseb J 6, 2397-2404
 15. Toole, BP (2000) Hyaluronan no es sólo una sustancia pegajosa! J Clin Invest 106, 335-336
 - 45 16. DeAngelis, PL, Gunay, NS, Toida, T., Mao, WJ, y Linhardt, RJ (2002) Identificación de los polisacáridos capsulares de Tipo D y F Pasteurella multocida como la heparina y la condroitina no modificada, respectivamente Carbohydr Res 337, 1547 -1552
 17. Gorbet, MB, y Sefton, MV (2004) la trombosis asociada al biomaterial: roles de los factores de coagulación, complemento, plaquetas y leucocitos Biomateriales 25, 5681 a 5703
 - 50 18. Ma, Z., Mao, Z., y Gao, C. (2007) Modificación de la superficie y análisis de propiedades de los polímeros biomédicos utilizados para la ingeniería de tejidos Coloides Surf B Biointerfaces
 19. Massia, SP, Holecko, MM, y Ehteshami, GR (2004) In vitro evaluación de recubrimientos bioactivos para aplicaciones de implantes neurales J Biomed Mater Res A 68, 177-186
 - 55 20. Czaja, WK, Joven, DJ, Kawecki, M., y Brown, RM, Jr. (2007) Las perspectivas de futuro de celulosa microbiana en aplicaciones biomédicas Biomacromolecules 8, 1-12
 21. Chandy, T., y Sharma, CP (1990) quitosano como un biomaterial células Biomater Artif Artif Órganos 18, 1-24
 - 60 22. Allison, DD, y Grande-Allen, KJ (2006) Revisión. Ácido hialurónico: una herramienta poderosa ingeniería de tejidos Tissue Ing 12, 2131-2140
 - 65 23. McKenzie, E., Joven, K., Hircock, M., Bennett, J., Bhaman, M., Félix, R., Turner, P., Sellos, A., McMillan, D., Saville, G., Ng, S., Mason, S., Snell, D., Schofield, D., Gong, H., Townsend, R., Gallagher, J., Página, M., Parekh,

- R., y Stubberfield, C. (2003) Caracterización bioquímica de la forma heterodímero activo de heparanasa humana proteína (Hpa1) expresado en las células de insectos *Biochem J* 373, 423-435
- 5 24. Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Bitan, M., Pappo, O., Peretz, T., Michal, I., Spector, L., y Pecker, I. (1999) heparanasa de mamífero: la clonación de genes, expresión y función en la progresión tumoral y la metástasis *Nat Med* 5, 793-802
- 10 25. Pikas, DS, Li, JP, Vlodavsky, I., y Lindahl, U. especificidad (1998) Substrato de heparanasas de hepatoma humano y plaquetas *J Biol Chem* 273, 18770 a 18777
- 15 26. Gong, F., Jemth, P., Escobar Galvis, ML, Vlodavsky, I., Horner, A., Lindahl, U., y Li, JP (2003) Tratamiento de la heparina macromolecular por heparanasa *J Biol Chem* 278, 35152-35.158
- 20 27. Balazs, EA (2004) Viscosuplementación para el tratamiento de la osteoartritis: desde el descubrimiento inicial de la situación actual y resultados *Surg Technol Int* 12, 278-289
- 25 28. Goa, KL, y Benfield, P. (1994) El ácido hialurónico. Una revisión de su farmacología y el uso como ayuda quirúrgica en oftalmología, y su potencial terapéutico en enfermedades de las articulaciones y la cicatrización de heridas *Drogas* 47, 536-566
- 30 29. Stern, R. (2004) Hyaluronan catabolismo: una nueva vía metabólica *Eur J Cell Biol* 83, 317-325
- 35 30. DeAngelis, PL, y Negro, CL (2002) Identificación y clonación molecular de una sintasa heparosano de *Pasteurella multocida* tipo D *J Biol Chem* 277, 7209-7213
- 40 31. Barzu, T., van Rijn, JL, Petitou, M., Tobelem, G., y Caen, JP (1987) la degradación de heparina en las células endoteliales *Thromb Res* 47, 601-609
- 45 32. Vann, WF, Schmidt, MA, Jann, B., y Jann, K. (1981) La estructura del polisacárido capsular (K5 antígeno) de tracto urinario-infeccioso *Escherichia coli* 010: K5: H4. Un polímero similar a desulfo-heparina *Eur J Biochem* 116, 359-364
- 50 33. Capila, I., y Linhardt, RJ (2002) Las interacciones proteína-Heparina *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 391-412
- 55 34. Tammi, MI, Día, AJ, y Turley, EA (2002) Ácido hialurónico y homeostasis: un acto de equilibrio *J Biol Chem* 277, 4581-4584
- 60 35. Stern, R., Asari, AA, y Sugahara, KN (2006) fragmentos de hialuronano: un sistema de información-rica *Eur J Cell Biol* 85, 699-715
- 65 36. Powell, JD, y Horton, MR (2005) Matriz de Amenazas: ácido hialurónico de bajo peso molecular (HA) como una señal de peligro *Immunol Res* 31, 207-218
37. West, DC, y Kumar, S. (1989) Ácido hialurónico y la angiogénesis *Ciba Found Symp* 143, 187-201; discusión 201-187, 281-185
38. Trochon, V., Mabilat, C., Bertrand, P., Legrand, Y., Smadja-Joffe, F., Soria, C., Delpech, B., y Lu, H. (1996) La evidencia de la participación de CD44 en la proliferación celular endotelial, la migración y la angiogénesis *in vitro Int J Cancer* 66, 664-668
39. Scheibner, KA, Lutz, MA, Boodoo, S., Fenton, MJ, Powell, JD, y Horton, MR (2006) fragmentos de hialuronano actúan como una señal de peligro endógeno mediante la participación de TLR2 *J Immunol* 177, 1272-1281
40. Hodson, N., Griffiths, G., Cook, N., Pourhossein, M., Gottfridson, E., Lind, T., Lidholt, K., y Roberts, ES (2000) Identificación que Kfia, una proteína esencial para la biosíntesis de la *Escherichia coli* polisacárido capsular K5, es una glicosiltransferasa alfa-UDP-GlcNAc. La formación de un complejo de biosíntesis de K5 asociada a la membrana requiere Kfia, KfiB, y KfiC *J Biol Chem* 275, 27311-27315
41. Monheit, GD, y Coleman, KM (2006) rellenos de ácido hialurónico *Dermatol Ther* 19, 141-150
42. Li, M., Timmons, RB, y Kinsel, GR (2005) Radio plasma frecuencia recubrimientos de polímeros de captura por afinidad espectrometría de masas MALDI *Anal Chem* 77, 350-353 Fabricación y propiedades *Ann Biomed Ing* 31, 667-677
44. Amargo, T. y Muir, HM (1962) A modificada reacción carbazol ácido urónico *Anal Biochem* 4, 330-334

45. Lee, HG, y Cowman, MK (1994) Un método electroforético en gel de agarosa para el análisis de la distribución del peso molecular hialuronano Anal Biochem 219, 278-287

5 46. Tracy, BS, Avci, FY, Linhardt, RJ, y DeAngelis, PL (2007) la especificidad del aceptor de la Pasteurella de ácido hialurónico y condroitina sintasas y la producción de glicosaminoglicanos quiméricos J Biol Chem 282, 337-344

47. Deangelis PL, White C L. (2004) La identificación de otro diferente y crítico sintasa heparosano de Pasteurella multocida tipo A, D y F. J Bacteriol. 186, 8529-32.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. La composición biomaterial, la composición comprime al menos uno de:
- 5 (a) un polímero heparosano aislado a un paciente mamífero, en donde el polímero heparosano aislado es biocompatible con el paciente mamífero y es representado por la estructura (-GlcUA-beta1,4 -GlcNAc-alfa-1,4-) n, donde n es un integrante positivo mayor o igual que 10; y
(b) la composición que comprime:
- 10 un polímero heparosano aislado a un paciente mamífero, en donde el polímero heparosano aislado es biocompatible con el paciente mamífero y en el que el polímero heparosano aislado está representado por la estructura, (-GlcUA-beta1,4 -GlcNAc-alfa-1,4-) n, en donde n es un entero positivo mayor que o igual a 10, sustrato; y donde el polímero heparosano es adherido al sustrato.
- 15 2. La composición biomaterial de la reivindicación 1, donde al menos uno:
- (a) n es aproximadamente de 1.000;
(b) el polímero heparosano es lineal; y
(c) el polímero heparosano es entrecruzado
- 20 3. La composición biomaterial de la reivindicación 1(a), donde la composición es in gel o semi-sólido en un estado particular o líquido.
- 25 4. La composición biomaterial de la reivindicación 1(a), donde la composición es al menos una inyectable o trasplantable.
5. La composición biomaterial de la reivindicación 1, donde al menos una es:
- 30 (a) la composición es considerablemente no susceptible a hialuronidasas y así de este modo no es sustancialmente degradable in vivo; y
(b) la composición es producida de manera recombinante.
6. La composición de biomaterial de la reivindicación 1(b), donde al menos uno:
- 35 (a) el polímero heparosano aislado está adherido al sustrato de manera covalente;
(b) el polímero heparosano no es de manera covalente adherido al sustrato;
(c) el sustrato es seleccionado de un grupo que consiste en sílice, silicona, semiconductores, vidrio, polímeros, compuestos orgánicos, inorgánicos, metales y otras combinaciones; y
(d) al menos una porción de sustrato es un metal seleccionado de un grupo que consiste en oro, cobre, acero inoxidable, níquel, aluminio, titanio, aleación termosensitiva y combinaciones de las mismas.
- 40 7. Un kit para la administración de una composición de una paciente mamífero, conteniendo:
La composición de cualquier reclamación de 1 a 6.
- 45 8. La composición biomaterial de la reclamación 1(a) para usarlo en un método para proveer una cubierta en una superficie de un implante sintético, comprimiéndose en los pasos:
- depositando la composición del biomaterial en al menos una porción de la superficie del implante sintético; y permitiendo la composición del biomaterial para formar una cubierta en la superficie del implante.
- 50 9. La composición del biomaterial de la reclamación 8 para usarlo en un método para proveer la cubierta en la superficie de un implante sintético donde al menos:
- 55 (a) n es aproximadamente de 1.000;
(b) el polímero heparosano es lineal; y
(c) el polímero heparosano es entrecruzado.
10. La composición del biomaterial de la reclamación 8 para usar un método para proveer una cubierta en la superficie del implante sintético donde la menos un:
- 60 (a) En el paso para proveer el implante sintético, al menos una porción de la superficie del implante sintético es construido de un material seleccionado de un grupo que consiste en sílice, silicona, semiconductores, vidrio, polímeros, compuestos orgánicos, inorgánicos, metales y otras combinaciones;
(b) en el paso de proveer un implante sintético, al menos una porción de superficie del implante sintético es construido de metal seleccionado de un grupo que consiste en oro, cobre, acero inoxidable, níquel, aluminio, titanio aleación termosensitiva y otras combinaciones.
- 65

(c) la cubierta de la superficie del implante sintético es sustancialmente no susceptible a hialuronidasas y de este modo no es sustancialmente degradada en vivo, y;

(d) en el paso de proveer una composición de biomaterial, el biomaterial es recombinantemente producido.

5 **11.** La composición de biomaterial de cualquier reclamación de 1 a 6 para usarlo en un método de tejido incrementado en un paciente, comprimiendo los pasos:

administrando una cantidad efectiva de la composición de biomaterial en una paciente mamífero.

10 **12.** La composición de biomaterial de la reclamación 11 para usarlo en un método de tejido incrementado en un paciente, donde la administración de una cantidad efectiva del paso de composición de biomaterial es más adelante definida como un implante de una efectiva cantidad de la composición de biomaterial en una paciente mamífero.

15 **13.** La composición de biomaterial de la reclamación 11 para usarlo en un método de tejido incrementado en un paciente, donde la administración de una cantidad efectiva del paso de composición de biomaterial es más adelante definida como un implante de una efectiva cantidad de la composición de biomaterial en una paciente mamífero.

20 **14.** La composición de biomaterial de la reclamación 1(a) para usarlo en un método de administración en una cantidad efectiva de la composición de biomaterial de un paciente mamífero.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

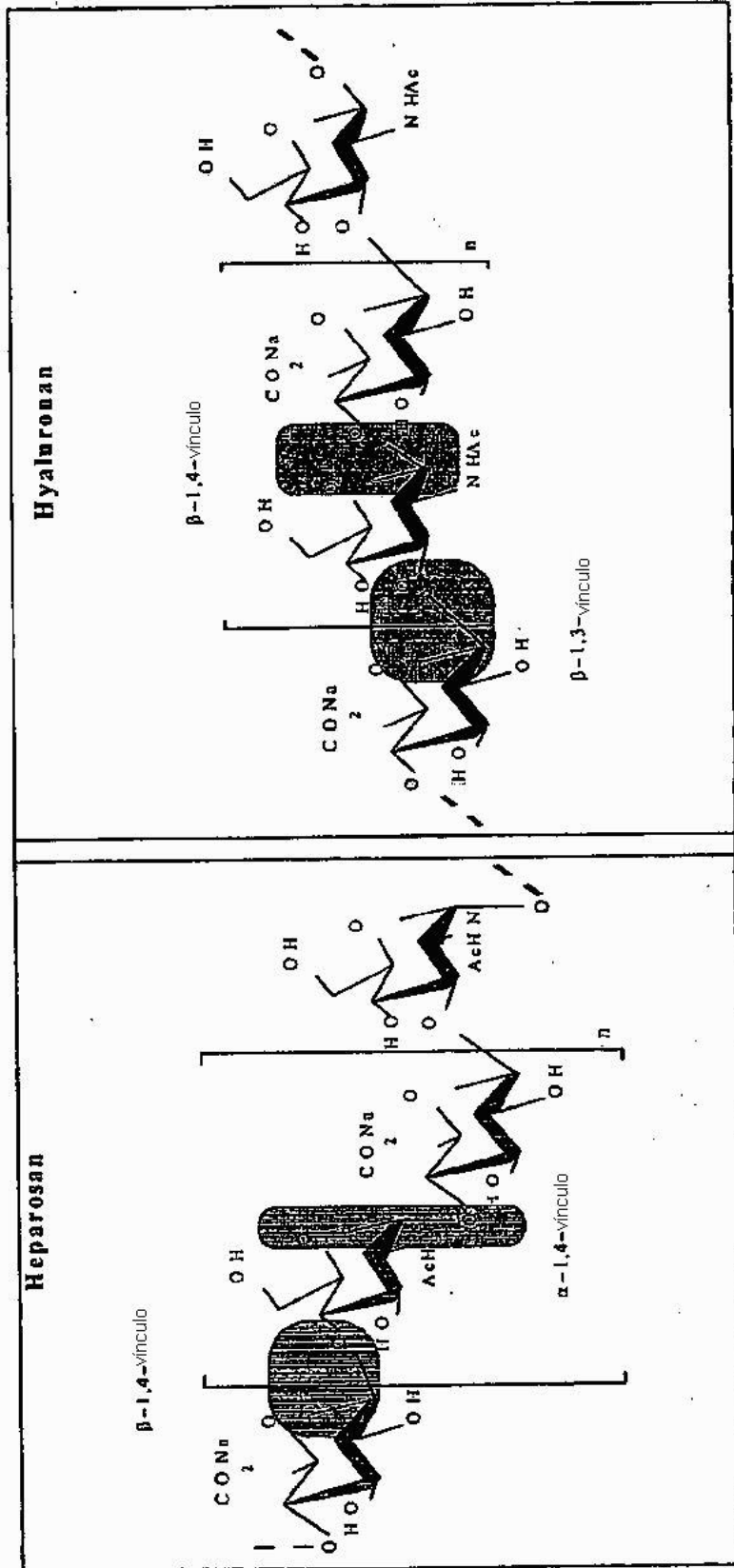


FIGURA 2

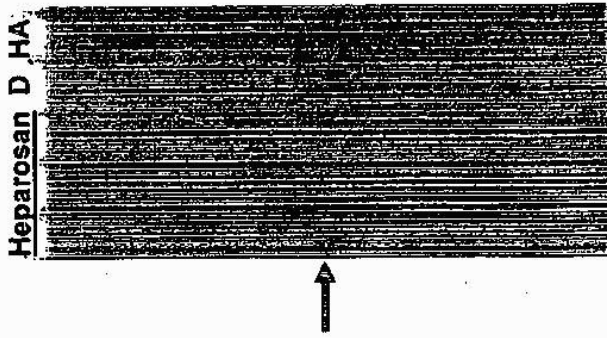


FIGURA 3



FIGURA 5

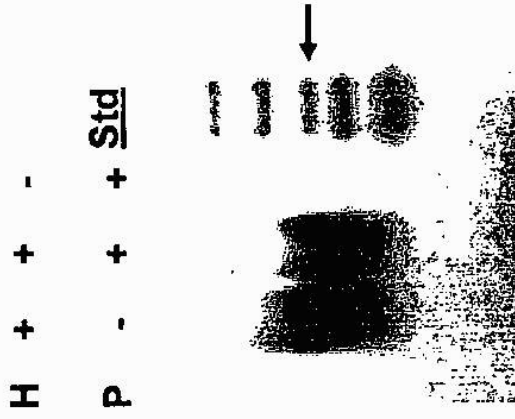


FIGURA 4

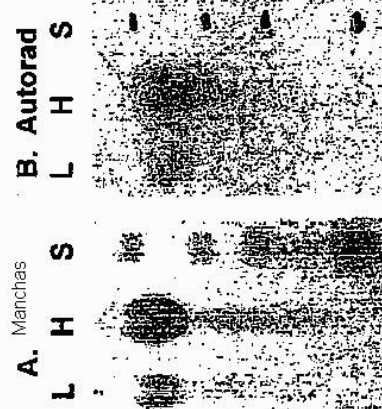


FIGURA 6

