

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 252**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C12P 19/26 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/75 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2011 E 11764125 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2614087**

54 Título: **Proceso para la producción de ácido hialurónico en Escherichia coli o Bacillus megaterium**

30 Prioridad:

09.09.2010 IT MI20101641

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

27.06.2016

73 Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Ponte della Fabbrica 3/A
35031 Abano Terme (PD), IT**

72 Inventor/es:

**CORSA, VINCENZA;
NEGRO, ALESSANDRO y
BISICCHIA, SONIA**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 575 252 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

Proceso para la producción de ácido hialurónico en *Escherichia coli* o *Bacillus megaterium*

Objeto de la invención

5 La presente invención divulga un proceso para la producción de ácido hialurónico (HA) en *Bacillus megaterium* a través de vectores plásmidos episomales en donde el gen está bajo el control de un promotor fuerte T7 de bacteriófago T7, y un sistema para la selección de las cepas bacterianas estables productoras de altos niveles de ácido hialurónico.

Campo de la invención

10 El ácido hialurónico es un polisacárido lineal natural que consiste en ácido β -1-4 D-glucurónico y β -1-3 N-acetil glucosamina alternativos. El ácido hialurónico es parte de la familia de glicosaminoglicano, y puede alcanzar un peso molecular de 107 Da, con aprox. 300000 unidades de sacárido repetitivas. Se distribuye ampliamente en el tejido conectivo y la matriz extracelular en el epitelio de los organismos eucariotas, donde se encuentra en la superficie celular, pero también se puede sintetizar en algunos organismos procariotas, tales como los de la familia *Streptococcus*. Los glicosaminoglicanos son lubricantes de articulación ideales, pero también realizan muchos otros papeles funcionales en la reparación de tejidos, motilidad celular, adhesión y desarrollo, cáncer y angiogénesis. Los productos a base de ácido hialurónico se han desarrollado sobre la base de estas características importantes, y se utilizan en ortopedia, reumatología, y dermatología.

15 Las fuentes naturales más comunes de la HA incluyen crestas de gallo, el material clásico a partir del cual se extrae HA, y algunas bacterias, especialmente las que pertenecen a la familia de *Streptococcus*. Todas estas diferentes fuentes presentan numerosos inconvenientes: el ácido hialurónico obtenido a partir de crestas de gallo puede, por ejemplo, causar alergias en los seres humanos, ya que es de origen aviar, mientras que HA a partir de fuentes bacterianas debe estar libre de todas las toxinas presentes normalmente en aquellas bacterias que pueden causar reacciones inflamatorias/inmunológicas posiblemente graves. Por lo tanto, los procesos de purificación de HA industrial actuales comprenden muchas etapas diferentes, con el consiguiente aumento de los costes finales de la fabricación de la materia prima.

20 En consecuencia, existe una necesidad muy sentida de fuentes alternativas que eliminan todos los acontecimientos adversos descritos, mientras que mantiene costes de fabricación razonables. En los últimos años, las vías de biosíntesis para la síntesis de ácido hialurónico se han incluido en detalle en numerosos organismos. Mientras que los genes necesarios para la síntesis de ácido hialurónico que están presentes en organismos eucariotas se distribuyen por todo el genoma, en sistemas bacterianos dichos genes están a menudo presentes y organizados en operones. Por ejemplo, en *Streptococcus equi* el operón para el ácido hialurónico comprende 5 genes: hasA, hasB, hasC, hasD, y hasE. A veces, sin embargo, los genes están presentes en dos operones: en *Streptococcus equisimilis* un operón con genes hasA, hasB y hasC está presente, y otro con los genes hasC, hasD y hasE. Los genes homólogos con hasB, hasC, hasD, y hasE de los *Streptococci* están presentes en muchos organismos, y sintetizan las enzimas necesarias para la síntesis de ácido D-glucurónico precursores de ácido hialurónico y N acetil-D glucosamina, que también son los constituyentes esenciales de las paredes bacterianas. En el caso de los estreptococos, hialuronano sintasa (hasA, que está presente en la membrana plasmática) es la enzima clave para la síntesis final de ácido hialurónico, ya que realiza dos funciones: cataliza la unión de ácido D-glucurónico y N-acetil D-glucosamina, y transporta la cadena de ácido hialurónico recién formado fuera de la célula. El estudio de las enzimas responsables de la síntesis de ácido hialurónico ha permitido el desarrollo de sistemas recombinantes en diversos organismos, tales como *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Escherichia coli* y *Agrobacterium radiobacter*. El primer organismo diseñado para producir ácido hialurónico fue *B. subtilis*, a través de la clonación en su cromosoma de un operón que lleva el gen hasA a partir de *Streptococcus* (que falta en *Bacillus*), con los genes *tuaD* y *gtaB* de *Bacillus* (que corresponde a hasB y hasC de *Streptococcus*), bajo el control de un promotor constitutivo (US2003/175902). De esta manera una vía de biosíntesis se organizó en operones similares a las de *Streptococcus equi*, uno de los principales productores naturales de ácido hialurónico. Sin embargo, el sistema de este modo perfeccionado conduce a la producción industrial de un ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderado de menos de 1 MDA, con rendimientos de fabricación muy bajos.

El sistema de expresión de ácido hialurónico de acuerdo con la presente invención utiliza las bacterias de la cepa de *Bacillus Megaterium*.

50 *Bacillus Megaterium* es una bacteria gram-positiva aeróbica, que fue descrita hace más de 100 años. Su gran tamaño (1 μ m, esto es, 100 veces más grande que la *E. coli* tanto en forma vegetativa como formadora de esporas) la ha hecho muy popular para los estudios de análisis morfológicos. Esta bacteria puede contener muchos tipos diferentes de plásmidos; el ADN de plásmido puede ser transferido por transformación de protoplastos obtenidos por tratamiento con polietilenglicol, y todos ellos funcionan muy bien, con una excelente estabilidad estructural. La bacteria puede ser transducidas con fagos, y la frecuencia de transformación puede llegar a 10^6 transformantes por μ g de ADN. Varios

cientos de mutantes están actualmente disponibles, que cubren diversas rutas de biosíntesis: catabolismo, división, esporulación, germinación, resistencia a los antibióticos y recombinación.

5 No menos de siete plásmidos se han encontrado en diferentes cepas de *B. megaterium*, con tamaños que van desde 5.4 a 165 kb. Los genomas de dos cepas (DSM319: EMBL, número de acceso CP001983, y QM B1551:EMBL, número de acceso CP001982) y las de los siete plásmidos naturales están ahora disponibles. A pesar de que se considera que es una bacteria presente en el suelo, se ha encontrado *B. megaterium* en diversos nichos ecológicos tales como carne seca, agua de mar y peces. *B. megaterium* es capaz de crecer en diversas fuentes de carbono, incluyendo los desperdicios de carnicería y jarabes industriales con un amplio espectro de azúcares (62 de los 95 probados), que incluyen ácidos carboxílicos tales como acetato. *B. megaterium* se puede cultivar a alta densidad, hasta 80 g de peso seco por litro. Se ha obtenido conocimiento considerable de diversas enzimas recombinantes con diferentes aplicaciones industriales que pueden ser secretadas en este organismo, tales como α -amilasa, β -amilasa, penicilina amidasa, proteasa neutra y β -glucanasa. De particular importancia son las amilasas, que se utilizan en la industria de la panificación, glucosa deshidrogenasa, que se utilizan industrialmente para la producción de NADH y como un biosensor, y penicilina amidasa, utilizada para generar nuevos antibióticos sintéticos. Finalmente, *B. megaterium* es la principal fuente de vitamina B12.

Descripción detallada de la invención

La presente invención divulga y reivindica un proceso para la producción de ácido hialurónico (HA) con altos rendimientos industriales en *Bacillus megaterium* a través de vectores plásmidos episomales en donde los genes para la síntesis de las enzimas requeridas para la producción de HA, están bajo el control del promotor fuerte T7, preferiblemente del bacteriófago T7, y un sistema para la selección de cepas bacterianas de diseño estables, produciendo grandes cantidades de ácido hialurónico que tiene pesos moleculares medio ponderados bien definidos (en lo siguiente también indicado como MW).

20 Con el fin de producir proteínas recombinantes (en este caso las proteínas enzimáticas requeridas para la síntesis de HA) de manera eficiente, necesitan ser diseñados los sistemas que utilizan promotores fuertes altamente controlables. La invención divulga un proceso para la transformación de las bacterias divulgadas anteriormente, utilizando un sistema muy eficiente para el control de la transcripción de los genes introducidos, como el gen de interés se coloca bajo el control del promotor dependiente de la ARN polimerasa T7.

30 Durante la construcción en *E. coli* de los vectores que expresan el ácido hialurónico en forma de plásmidos, se descubrió que los genes así introducidos (que son responsables de la síntesis de las enzimas que producen ácido hialurónico) son tóxicos para las células cuando su control transducción es un promotor constitutivo fuerte. De hecho, en *E. coli* transformado con genes *hasA* y *tuaD*, la transducción de genes de *hasA* solo conduce a una gran reducción en los precursores de ácido D-glucurónico requeridos para constituir la pared bacteriana, con el resultado de que la célula muere, mientras que la transducción de genes de *tuaD* solo genera la síntesis no controlada de ácido D-glucurónico que, por acidificación de la bacteria y privándola de glucosa (su precursor), provoca su muerte. Por el contrario, la transducción de ambos genes por polimerasas bacterianas conduce a la activación de las dos enzimas en diferentes momentos, ya que requieren diferentes tiempos de construcción con diferentes procedimientos y sitios de acción (por ejemplo, *hasA* es una proteína transmembrana con diferentes dominios cruzados, por lo que un tiempo mucho más largo es necesario para su síntesis y plegamiento correcto). La célula sólo puede sobrevivir si las cantidades equilibradas de las enzimas precursoras y la enzima necesaria para la síntesis de ácido hialurónico están presentes. En este caso, el ácido D-glucurónico en exceso, que es tóxico en altos niveles en la célula, es utilizado por hialuronano sintasa (*hasA*) que, combinándolo con la glucosamina, la incorpora en el ácido hialurónico naciente y la exporta a partir de la célula, manteniendo así la célula viva.

Por consiguiente, aunque ambos *hasA* y *tuaD* son necesarias para la síntesis de ácido hialurónico, esto es esencial para los dos genes que funcionan en concierto, dejando la célula el tiempo necesario para:

- 45
- producir ácido D-glucurónico a niveles no tóxicos y
 - activar la transcripción del gen *hasA* de tal manera que este último sea capaz de disponer de los altos niveles de ácido D-glucurónico ya que se acumulan en la célula.

En la presente invención, los problemas descritos anteriormente han sido resueltos por

50 - colocar los genes del plásmido, necesarios para la síntesis de las enzimas divulgadas anteriormente, bajo el control de un promotor T7, preferiblemente bajo el control del promotor T7 del bacteriófago T7, dependiente de ARN polimerasa T7, que utiliza XylR represor en *B. megaterium* para su inducción. El promotor T7 del bacteriófago T7 es dependiente de la presencia de polimerasa T7, por lo que los genes de síntesis de HA que están bajo su control sólo pueden ser transcritos por la ARN polimerasa T7, no por la acción de las polimerasas presentes de forma natural en la bacteria;

- perfeccionar un sistema de selección de cepas de *B. megaterium* estables, diseñadas y secretoras, en donde las enzimas necesarias para la síntesis de HA, están presentes en cantidades "equilibradas", por lo tanto, no es tóxico para la célula.

5 Por lo tanto, es objeto de la presente invención un proceso para la preparación de ácido hialurónico en *Bacillus megaterium*, que comprende las siguientes etapas:

(a) cultivo de células huésped bacterianas de *Bacillus megaterium* transformadas de manera estable con el sistema de la ARN polimerasa T7 bajo condiciones apropiadas para la producción de ácido hialurónico en presencia de xilosa como inductor, en donde dichas células huésped bacterianas se caracterizan por ser transformadas adicionalmente con:

10 (i) al menos un vector plásmido episomal que comprende una secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa y una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa en tándem, bajo el control del promotor T7 fuerte inducible, preferiblemente bajo el control del promotor T7 de bacteriófago T7; o

15 (ii) al menos un vector plásmido episomal que comprende una secuencia que codifica para la enzima hialuronato sintasa, una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa, una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa y una secuencia que codifica para la enzima glucosa 6 fosfato isomerasa, bajo el control del T7 fuerte inducible, preferiblemente bajo el control del promotor T7 del bacteriófago T7;

(b) recuperación del ácido hialurónico a partir del medio de cultivo,

en donde dichas células huésped bacterianas de *Bacillus megaterium* transformadas de manera estable con el sistema de la ARN polimerasa T7 y con el vector plásmido (i) o (ii) capaz de producir ácido hialurónico de la etapa a) se preseleccionan en la placa en gradiente de xilosa.

20 El solicitante utilizó *B. megaterium* (preferiblemente perteneciente a cepas QMB1551 o DSM319), transformado con el sistema de ARN polimerasa T7, para su posterior transformación con el plásmido episomal que contiene los genes para la síntesis de HA, ya que presenta diversas ventajas como huésped de la expresión de ADN heterólogo:

- el HA producido se secreta fácilmente;

- está libre de exotoxinas y endotoxinas, a diferencia bacterias gram-negativas;

25 • no contiene ninguna proteasa alcalina, y por consiguiente no induce la descomposición de la proteína producida;

- es estructuralmente muy estable en comparación con los plásmidos recombinantes: *B. megaterium* puede contener un número mucho mayor de plásmidos episomales que *Bacillus subtilis*, que son más estables; *B. megaterium* también pueden soportar inserciones mucho más grandes que *E. coli* y *B. subtilis*, y esta característica es muy importante cuando, como en el caso de la presente invención, una ruta metabólica larga como la del ácido hialurónico que se va a diseñar.

30

El sistema de la ARN polimerasa T7 transferido a *B. megaterium* controla la expresión de los genes responsables de la síntesis de la ruta de biosíntesis de HA (clonado en plásmidos episomales), y certifica

- muy alta actividad y selectividad de la transcripción génica;

- una consiguiente producción muy alta de las proteínas recombinantes requeridas para la síntesis de ácido hialurónico.

35 El rendimiento final del producto deseado será muy alto: mucho más alto que el obtenido con *B. subtilis*, donde el sistema operón se clona en el cromosoma de la bacteria, y está bajo el control de promotores constitutivos no inducibles.

40 De hecho, el sistema de la ARN polimerasa T7 descrito anteriormente es inducible: se introduce artificialmente en la bacteria y se activa por el solicitante mediante la adición de sustancias como xilosa (por *B. Megaterium* en cantidades entre 0.1% y 10%, preferiblemente entre 0.5% y 1% p/v); en su presencia, los enlaces inductores al represor, modificando su configuración, y el represor entonces se separa a partir del promotor, permitiendo las polimerasas de la bacteria al transductor del gen de la síntesis de la ARN polimerasa T7. Este último, a su vez, sólo puede activar la transcripción de genes de los genes colocados bajo el control de un promotor T7. De esta manera la síntesis de todo el proceso de biosíntesis para la producción de HA se puede controlar. El sistema es tan eficiente porque una sola polimerasa se dedica al gen de interés, y la ARN polimerasa de la bacteria no está involucrada. Con esta metodología, el sistema de síntesis de proteína de la célula está saturado, de modo que las proteínas de interés se obtienen en cantidades de 50% o más de las proteínas totales.

45

- Además, como se demuestra a continuación por el solicitante, mediante la modulación de los tiempos de fermentación, el solicitante puede obtener la producción de altas cantidades de HA con pesos moleculares medio ponderados específicos, comprendidos en un intervalo de 100 KD a por encima de 2 MD. Más particularmente, cuando el proceso de acuerdo con la invención utiliza células huésped bacterianas de *B. megaterium* y el tiempo de fermentación está compuesto por de 80 a 160 horas, es posible obtener HA que tiene un MW promedio ponderado comprendido en el intervalo de 100-500 kD; cuando el tiempo de fermentación se comprende de 40 a 80 horas, es posible obtener HA que tiene un MW promedio ponderado comprendido en el intervalo de 500-1000 KD; cuando el tiempo de fermentación se compone de 12 a 40 horas, es posible obtener HA que tiene un MW promedio ponderado comprendido en el intervalo de 1×10^6 - 3×10^6 D.
- 5 En una realización preferida de la presente invención, la secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa (*hasA*) se obtiene a partir de una cepa *Streptococcus*, preferiblemente a partir de *Streptococcus zooepidemicus*, y las secuencias que codifica para las enzimas UDP-glucosa deshidrogenasa (*hasB* o *tuaD*), UDP-glucosa pirofosforilasa (*hasC* o *gtaB*) y glucosa 6 fosfato isomerasa (*hasE* o *pgi*), se derivan a partir de *B. subtilis*.
- 10 De acuerdo con una realización particularmente preferida de la presente invención, las secuencias que codifica para las enzimas hialuronano sintasa, UDP-glucosa deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y glucosa 6 fosfato isomerasa incluyen una secuencia Shine-Dalgarno en dirección 5'.
- 15 Aún más preferiblemente, dicho vector plásmido (i) comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos como se define en SEQ ID NO:1 o en SEQ ID NO:2.
- 20 La subsiguiente purificación de la HA secretada será extremadamente simple, con el resultado de que el proceso de producción industrial será mucho más barato que el proceso de acuerdo con el estado de la técnica.
- Un sistema también ha sido diseñado en *B. megaterium*. En este caso, el sistema utiliza dos plásmidos: el primero conduce a la síntesis de la proteína enzimática ARN polimerasa T7, y el segundo (diseño) a la del mensajero del gen (o genes) de interés, bajo el control del promotor T7 del bacteriófago T7. El primer plásmido, pT7- RNAP (MoBiTec), se deriva a partir del plásmido pBM100 264 (MoBiTec), que se replica en *B. megaterium* QM B1551 (MoBiTec) y también contiene el origen de replicación de *E. coli*, la resistencia a la ampicilina y cloranfenicol y el promotor para PXY1A xilosa, y su represor Xy1R, que controlan la síntesis de la ARN polimerasa T7, cuya secuencia de genes es en el mismo plásmido. El plásmido para la síntesis de proteínas recombinantes, pPT7 (MoBiTec), se deriva a partir de *B. cereus* y conduce a un origen de replicación de *B. megaterium* y la resistencia a la ampicilina y cloranfenicol, y un origen de replicación para *E. coli* y del promotor T7 controlado por ARN polimerasa T7.
- 25 Cuando la proteína de interés se debe sintetizar, se adiciona la xilosa a las células, y activa su promotor y desconecta el represor. El promotor, liberado, a continuación, permite que la polimerasa de la bacteria para transcribir el gen para la síntesis de la enzima ARN polimerasa T7 que, pasando al promotor T7 del otro plásmido, transcribe su gen de interés, es decir, los genes necesarios para la síntesis de HA. El sistema es muy eficiente, ya que una sola polimerasa se dedica a la transcripción del gen de interés, y las múltiples copias de los dos plásmidos aseguran que los niveles de transcripción sean extremadamente altos.
- 30 Un objeto adicional de la presente invención son vectores plásmidos, que contienen los dos genes *hasA* y *tuaD* o los cuatro genes *hasA*, *tuaD*, *gtaB* y *pgi* (correspondiente a *hasE*), bajo el control del promotor T7 de ARN polimerasa del bacteriófago T7, que son apropiados para permitir la producción en *B. megaterium* del ácido hialurónico con alto rendimiento, de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. Preferiblemente, las secuencias que codifican para la enzima hialuronano sintasa, UDP-glucosa deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y glucosa 6 fosfato isomerasa incluyen una secuencia Shine-Dalgarno en dirección 5'. Estos vectores también pueden ser construidas de manera que contengan cualquier otro gen relacionado con la biosíntesis del ácido hialurónico.
- 35 A diferencia de los que están disponibles hasta la fecha, el plásmido de partida es pequeño, lo que permite el diseño de toda la ruta de biosíntesis del ácido hialurónico (esto es, los cuatro genes *hasA*, *TuaD*, *gtaB* y *pgi*) en un único plásmido, que se denomina en este documento pPT7hasAtuaDgtaBpgi, haciendo la presente invención económicamente ventajosa y con éxito aplicable a escala industrial. En una realización preferida de la presente invención, el vector plásmido es pPT7hasAtuaD (SEQ ID NO:1) o pPT7hasAtuaDgtaBpgi (SEQ ID NO:2).
- 45 La presente invención también se refiere a un método y sistema en relación a la producción/construcción de cepas bacterianas, transformadas con el plásmido que contiene la ruta de biosíntesis del ácido hialurónico completa, y la selección de cepas bacterianas estables, viables, replicantes y secretoras de HA con alto rendimiento.
- 50 Dicho método de construcción de la cepa de diseño con el vector plásmido de 2 genes o 4 genes para la síntesis de HA comprende las siguientes etapas:

- Clonación del gen tuaD (UDP-glucosa deshidrogenasa) a partir de *BacillusSubtilis*,
 - Clonación del gen hasA (hialuronano sintasa) a partir de *Streptococcus zooepidemicus*,
 - Construcción del plásmido pGEM4hasA,
 - Construcción de un plásmido con el gen tuaD después de hasA,
- 5 • Clonación del gen hasA-tuaD en el plásmido de *B. megaterium* pPT7: pPT7hasAtuaD;
- el procedimiento para la construcción de la ruta de los 4 genes procede con las siguientes etapas:
- Clonación del gen gtaB: construcción del plásmido pGEM4hasA-gtaB,
 - Clonación del gen pgi a partir de *Bacillus Subtilis*,
 - Construcción del plásmido pPT7hasAtuaDgtaBpgi, que se conoce como pT7hyal,
- 10 • Transformación de plásmidos pPT7hasAtuaD y pPT7hasAtuaDgtaBpgi en *Bacillus megaterium*,
- Selección de las células secretoras de ácido hialurónico xilosa por gradiente de xilosa para *Bacillus megaterium*,
 - Selección de grandes cantidades estables, viables, replicantes y secretoras de células de HA.

La presente invención será ahora divulgada a modo de ejemplo, pero no de limitación, de acuerdo con realizaciones preferidas, con particular referencia a las figuras adjuntas, en donde:

- 15 La figura 1 muestra una comparación en placas entre el crecimiento de células de *E. coli* TOP10, incorporando el plásmido pHT01 (control) y células de *E. coli* TOP10, incorporando pBS5 (hasA + tuaD);

La figura 2 muestra el análisis en gel de la expresión de gen tuaD en *E. coli* BL21 DE3;

- 20 La figura 3 muestra el análisis en electroforesis de gel de la expresión constitutiva de hialuronano sintasa (Strept) en *E. coli*; la proteína codificada designado SeHAS tiene 417 aminoácidos de longitud (peso molecular calculado 47,778, PI calculado 9.1) y es el miembro más pequeño de la familia HAS identificado hasta el momento; la enzima migra anómalamente rápido en la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (aproximadamente 42000 Da);

La figura 4 muestra el mapa del plásmido pPT7 que comprende el promotor y el terminador de ARN polimerasa T7 del bacteriófago T7; el origen de replicación de Coli y Megaterium; gen de resistencia a ampicilina; gen de resistencia a tetraciclina;

- 25 La figura 5 muestra el mapa de restricción del plásmido PT7hyal;

La figura 6 muestra el análisis por SDS-page de lisados de células de *E. coli* BL21 DE3 para verificar la presencia de proteínas que llevan a la síntesis del ácido hialurónico;

- 30 La figura 7 muestra la comparación de la producción de HA en placa entre las colonias de *E. coli* BL21 DE3 transformadas con el plásmido pPT7 (control de colonias), pPT7hasAtuaD (colonia 6) y pPT7hasAtuaDgtaBpgi (pT7Hya1 – Colonia 2) después de 24 horas de crecimiento a 37 °C, en presencia de IPTG;

La figura 8 muestra los resultados de ensayos de siembra en placa para la selección de células capaces de expresar altos niveles de ácido hialurónico en la presencia o ausencia de IPTG;

La figura 9 muestra los resultados de ensayos de siembra en placa en presencia de IPTG para probar el grado de supervivencia de las células capaces de producir HA;

- 35 La figura 10 muestra el análisis de carbazol de los precipitados de HA en el tubo de ensayo.

Los siguientes ejemplos describen las diversas etapas necesarias para la realización de la invención, a modo de ejemplo, pero no de limitación.

Ejemplo 1: Clonación del gen tuaD (UDP-glucosa deshidrogenasa) a partir de *Bacillus subtilis*

La secuencia del gen *tuaD*, que es 9300 pb de longitud en *B. subtilis*, está presente en las bases de datos bajo el número de acceso AF015609 en el sistema que codifica el operón ácido teicurónico y comprende ocho genes, *tuaABCDEFGH*. En el presente caso, el gen de interés *tuaD* cae entre las bases 3582-4984 pb. El análisis de software para enzimas de restricción indica que los sitios de restricción *Clal*, *EcoRI*, *PstI*, *HindIII* y *SphI* están presentes, y por lo tanto no se pueden utilizar para la clonación. El codón de inicio no es una metionina, pero una valina; en la presente invención, se sustituyó por el codón para la metionina, que es mucho más eficiente en la transducción de la proteína. Dos cebadores de oligonucleótidos con la siguiente secuencia se utilizan para recuperar la siguiente secuencia:

5'atgaaaaaatagctgtcattggaacag 3' (SEQ ID NO:3) y 5'ttataaattgctgtcccaagtct 3' (SEQ ID NO:4).

El ADN genómico de la cepa de *B. subtilis* 168 (ACTT 23857D-5) se obtuvo con el kit de extracción de Qiagen. Con 32 ciclos de PCR, utilizando el ADN de *B. subtilis* como plantilla y los dos dichos oligonucleótidos, se obtuvo un amplificado del peso molecular esperado. El amplificado obtenido se ensayó para determinar la presencia de la enzima de restricción *EcoRI*. Después de cortar con esta enzima en gel de agarosa al 1%, dos bandas de ADN que pesan 470bp y 920bp estaban presentes, que corresponden a los esperados. Para clonar el gen *tuaD* en un vector de expresión, se sintetizaron otros dos oligonucleótidos con la siguiente secuencia:

5'gctggatccatgaaaaaatagctgtcattgg 3' (SEQ ID NO:5) y 5' ctcgctagcttataaattgacgcttccaag 3' (SEQ ID NO:6) con el fin de insertar dicha secuencia entre los sitios de restricción *BamHI* y *NheI* en el vector de expresión, plásmido pRSET B (INVITROGEN).

Una secuencia Shine-Dalgarno (SD) necesita ser introducida en gen *tuaD* en dirección 5' del extremo 5' del gen para permitir el reconocimiento eficiente por la ARN polimerasa bacteriana. Para este fin, el ADN se amplificó con los siguientes cebadores de oligonucleótidos:

5' cgacatatgaaaaaatagctgtcattgg 3' (SEQ ID NO:7) y 5' ctcgctagcttataaattgacgcttccaag 3' (SEQ ID NO:8).

Dos sitios de restricción *NdeI* y *NheI* están presentes en dichos cebadores en 5', que permiten a su clonación en el vector pRSET B entre los mismos sitios. Una secuencia SD, en consecuencia, presente en dirección 5' del sitio de restricción *NdeI* del plásmido pRSET B, es particularmente eficiente y necesario para la ARN polimerasa con el fin de sintetizar la proteína. El sitio de restricción *XbaI*, que se requiere para las posteriores clonaciones, también está presente incluso antes de dicha secuencia. El vector creado, pRSET B, por lo tanto, se llamó pRSETuaD.

Así, en este plásmido, la secuencia que codifica para *tuaD* cae entre los sitios de restricción *NdeI* y *NheI*; sitio de restricción *XbaI*, que es necesario para la posterior clonación, está presente antes y en dirección 5' de dicho plásmido, y otros sitios de restricción, incluyendo *BamHI* - *BglII* --*XhoI*, están presentes detrás del gen *tuaD*.

El siguiente diagrama resume los sitios de interés presente en el plásmido pRSETuaD

XbaI-- *NdeI*----- *tuaD*----- *NheI* -*BamHI*-- *BglII* -*XhoI*

El plásmido descrito es un vector de expresión que funciona no sólo en *B. megaterium* sino también en *E. coli*, debido a que el gen está bajo el control del promotor T7 del bacteriófago T7; si se transforma en células bacterianas BL21 DE3, que son capaces de transcribir la ARN polimerasa T7, que por lo tanto les permite expresar el gen *tuaD*. Después de la inducción con 1 mM de IPTG las células en *E. coli* son capaces de producir la proteína del peso molecular esperado, pero no el ácido hialurónico. La construcción es particularmente eficaz debido a que el nivel de expresión es muy alto. Los tamaños de las colonias que llevan plásmido pRSETuaD son pequeñas en comparación con las células control (Figura 1), lo que demuestra la toxicidad del gen *tuaD*. Esta clonación es difícil precisamente porque es aparentemente difícil que las colonias crezcan; el nivel particularmente alto de enzima UDP-glucosa deshidrogenasa probablemente drena la glucosa de la célula, ya que se requiere para la formación del precursor de ácido hialurónico. Las células en las que se induce la síntesis de *tuaD* con IPTG son por lo tanto ya no son capaces de sobrevivir durante un largo tiempo, por lo que el producto génico es tóxico.

En conclusión, el gen *tuaD* se aisló y se clonó en un plásmido, y la secuencia resultó ser correcta. El gen expresado en *E. coli* es capaz de producir una proteína del peso molecular esperado (54kDa, Figura 2), que es tóxica para la célula. Sin embargo, estas células son incapaces de producir cantidades significativas de ácido hialurónico, ya que es deficiente de hialuronano sintasa (*hasA*).

Ejemplo 2: Clonación del gen *hasA* (hialuronano sintasa) a partir de *Streptococcus zooepidemicus*

La secuencia del gen para hialuronano sintasa está presente en las bases de datos bajo el número de acceso AY173078, y es 3552 bp de largo; la secuencia que codifica para la proteína es entre las bases 1 y 1254. Los sitios de restricción *HindIII* y *StuI* están presentes en esta secuencia, y por lo tanto no se pueden utilizar para la clonación, pero

pueden ser utilizados para verificar la clonación. Dos oligonucleótidos para uso con PCR se diseñaron y sintetizaron para recuperar la secuencia de codificación:

5'atgagaacattaaaaaacctcataac 3' (SEQ ID NO:9) y 5'taataatttttacgtgtcccag 3' (SEQ ID NO:10)

5 El ADN genómico de la bacteria *Streptococcus zooepidemicus* se recuperó con el kit de extracción de Qiagen. La secuencia codificante de 1254 pb se recuperó con PCR. El amplificado esperado de las dimensiones correctas fue controlado con la enzima de restricción *HindIII*, y dio lugar a dos bandas de aprox. 100 pb y 1150 pb que se corresponden con el corte esperado.

Ejemplo 3: Construcción del plásmido pGEM4hasA

10 Otros dos oligonucleótidos con la siguiente secuencia se crearon para clonar la secuencia de hasA en el plásmido pGEM4Z:

5' ggaggatccatgagaacattaaaaaacctcat 3' (SEQ ID NO:11) y

5' cagtctagattataataatttttacgtgtcc 3' (SEQ ID NO:12)

15 El sitio de restricción *BamHI* fue creado en el primer oligonucleótido cerca de 5', y el sitio de restricción *XbaI* fue creado en el segundo oligonucleótido, de nuevo en 5'. El amplificado obtenido a través de estos dos oligonucleótidos se clonó entre los sitios de restricción *BamHI* y *XbaI* en el plásmido pGEM4Z (PROMEGA) entre los mismos sitios para dar el plásmido pGEM4hasA.

La secuencia de ADN entre dichos dos sitios de restricción se analizaron con un secuenciador ABI 7000, resultó ser correcta, y es idéntica a la publicada.

HindIII-BamHI -----hasA-----XbaI-Sall

20 Se comprobó el plásmido para la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* y presentó un peso molecular de aprox. 42 kDa, lo que concuerda con el peso reportado para la proteína en la bibliografía, aunque tiene un peso molecular teórico de 47.778 kDa (Figura 3).

25 La clonación de hasA a partir de streptococcus, por lo tanto, también se manifestó en términos de expresión de la proteína. El plásmido es incapaz de producir cantidades significativas de ácido hialurónico debido a que carece del gen tuaD.

Ejemplo 4: Construcción de un plásmido con el gen tuaD después de hasA

30 Con esta construcción, el gen hasA se coloca en tándem con el gen tuaD. Para este fin, el plásmido pGEM4hasA, que ya contiene el gen hasA, se utiliza como vector. El plásmido se cortó con *XbaI* y *Sall*, y la secuencia del gen tuaD del plásmido pRSEtuaD se cortó con *XbaI* y *XhoI* y se clonó en los mismos sitios (*XhoI* y *Sall* son compatibles) pGEM4hasA

HindIII- BamHI -----hasA-----XbaI-Sall pRSE tuaD

XbaI-- NdeI-----tuaD----- NheI -BamHI-- BglI -XhoI

se obtiene la siguiente secuencia final:

HindIII-BamHI -----hasA-----XbaI--NdeI-----tuaD-NheI -BamHI-- BglI -XhoI

35 Ejemplo 5 Clonación del gen hasA-tuaD en el plásmido pPT7 para *B. megaterium*.

40 Este plásmido pPT7 (MoBiTec) contiene dos orígenes de replicación, uno para *E. coli* y uno para *B. megaterium*, y por lo tanto se pueden propagar en ambas bacterias. También contiene la resistencia a los antibióticos ampicilina y tetraciclina, que se puede utilizar para *E. coli* y *B. megaterium* respectivamente, y la secuencia de reconocimiento para ARN polimerasa T7, es decir, el promotor dependiente de la ARN polimerasa T7 del bacteriófago T7 seguido por su terminador.

El plásmido contiene el sitio de restricción *BsrGI* con la secuencia *tgtaca* unas pocas bases después de la secuencia Shine-Dalgarno, y un sitio *BamHI* (*ggatcc*) después de la metionina inicial. Se sintetizaron dos oligonucleótidos para la clonación con el fin de crear los siguientes dos sitios de restricción en el extremo:

ES 2 575 252 T3

5'GCTTGACATGAGAACATTAAAAACCTCA 3' (SEQ ID NO:13) 5'AGGGATCCTTATAAATTGACGCTTCCCAAG 3'
(SEQ ID NO:14)

5 esto es *BsrGI* y *BamHI* en dirección 5' y en dirección 3' de los genes *hasA* y *tuaD* respectivamente. El amplificado de 2698 pb obtenido se cortó con las enzimas de restricción *BsrGI* y *BamHI* y se clonó en los mismos sitios de restricción como plásmido pPT7 para obtener el plásmido pPT7hasAtuaD (Figura 4).

La secuencia completa de este plásmido, denominado pPT7hasAtuaD, se analizó y se expone a continuación:

ES 2 575 252 T3

0 CTTTTTAGGTTCTAAATCGTGTTCCTTGGAAATGTGCTGTTTTATCCTTTACCTTGTC
60 TACAAACCCCTTAAAAACGTTTTTAAAGGCTTTTAAGCCGCTGTACGTTCCCTTAAGGCG
120 AAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCGAATATTAATTAACCAAG

Bsp1407I

180 GAGGTGAAATGTACAATGAGAACATTAACCACTCATAACTGTTGTGGCCTTTAGTATT
1 M R T L K N L I T V V A F S I

HindIII

240 TTTTGGGTACTGTTGATTTACGTCAATGTTTATCTCTTTGGTGCTAAAGGAAGCTTGTC
1 F W V L L I Y V N V Y L F G A K G S L S
300 ATTTATGGCTTTTTGCTGATAGCTTACCTATTAGTCAAAATGTCCTTATCCTTTTTTTAC
1 I Y G F L L I A Y L L V K M S L S F F Y
360 AAGCCATTTAAGGGAAGGGCTGGGCAATATAAGGTTGCAGCCATTATCCCTCTTATAAC
1 K P F K G R A G Q Y K V A A I I P S Y N
420 GAAGATGCTGAGTCATTGCTAGAGACCTTAAAAAGTGTTCAGCAGCAAACCTATCCCCTA
1 E D A E S L L E T L K S V Q Q Q T Y P L
480 GCAGAAATTTATGTTGTTGACGATGGAAGTGCTGATGAGACAGGTATTAAGCGCATTGAA
1 A E I Y V V D D G S A D E T G I K R I E
540 GACTATGTGCGTGACACTGGTGACCTATCAAGCAATGTCATTGTTCCACGGTCAGAAAAA
1 D Y V R D T G D L S S N V I V H R S E K
600 AATCAAGGAAAGCGTCATGCACAGGCCTGGGCCTTTGAAAGATCAGACGCTGATGTCTTT
1 N Q G K R H A Q A W A F E R S D A D V F
660 TTGACCGTTGACTCAGATACTTATATCTACCCTGATGCTTTAGAGGAGTTGTTAAAAACC
1 L T V D S D T Y I Y P D A L E E L L K T
720 TTTAATGACCCAACTGTTTTGCTGCGACGGGTCACCTTAATGTCAGAAATAGACAAACC
1 F N D P T V F A A T G H L N V R N R Q T
780 AATCTCTTAACACGCTTGACAGATATTCGCTATGATAATGCTTTTGGCGTTGAACGAGCT
1 N L L T R L T D I R Y D N A F G V E R A
840 GCCCAATCCGTTACAGGTAATATTCTCGTTTGCTCAGGCCCGCTTAGCGTTTACAGACGC

ES 2 575 252 T3

1 A Q S V T G N I L V C S G P L S V Y R R
900 GAGGTGGTTGTTCCCTAACATAGATAGATACATCAACCAGACCTTCCTGGGTATTCTGTGA
1 E V V V P N I D R Y I N Q T F L G I P V
960 AGTATCGGTGATGACAGGTGCTTGACCAACTATGCAACTGATTTAGGAAAGACTGTTTAT
1 S I G D D R C L T N Y A T D L G K T V Y
1020 CAATCCACTGCTAAATGTATTACAGATGTTCTGACAAGATGTCTACTTACTTGAAGCAG
1 Q S T A K C I T D V P D K M S T Y L K Q
1080 CAAAACCGCTGGAACAAGTCCTTCTTTAGAGAGTCCATTATTTCTGTTAAGAAAATCATG
1 Q N R W N K S F F R E S I I S V K K I M
1140 AACAACTCTTTTGTAGCCCTATGGACCATACTTGAGGTGTCTATGTTTATGATGCTTGTT
1 N N P F V A L W T I L E V S M F M M L V
1200 TATTCTGTGGTGGATTCTTTGTAGGCAATGTCAGAGAATTTGATTGGCTCAGGGTTTTG
1 Y S V V D F F V G N V R E F D W L R V L
1260 GCCTTTCTGGTGATTATCTTCATTGTTGCTCTTTGTCGTAATATTCACTATATGCTTAAG
1 A F L V I I F I V A L C R N I H Y M L K
1320 CACCCGCTGTCCTTCTTGTTATCTCCGTTTTATGGGGTACTGCTTTGTTTGCCTACAGC
1 H P L S F L L S P F Y G V L L C L S Y S
1380 CCTTGAAATTGTATTCTCTTTTACTATTAGAAATGCTGACTGGGGAACACGTAAAAAAT
1 P

XbaI

NdeI

1440 TATTATAATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAAAAA
3 M K K I
1500 TAGCTGTCATTGGAACAGGTTATGTAGGACTCGTATCAGGCACTTGCTTTGCGGAGATCG
3 A V I G T G Y V G L V S G T C F A E I G

EcoRV ClaI

1560 GCAATAAAGTTGTTTGCTGTGATATCGATGAATCAAAAATCAGAAGCCTGAAAAATGGGG
3 N K V V C C D I D E S K I R S L K N G V
1620 TAATCCCAATCTATGAACCAGGGCTTGCAGACTTAGTTGAAAAAATGTGCTGGATCAGC

ES 2 575 252 T3

3 I P I Y E P G L A D L V E K N V L D Q R

EcoRV

1680 GCCTGACCTTTACGAACGATATCCCGTCTGCCATTGGGCCTCAGATATTATTTATATTG

3 L T F T N D I P S A I R A S D I I Y I A

1740 CAGTCGGAACGCCTATGTCCAAAACAGGTGAAGCTGATTTAACGTACGTCAAAGCGGCGG

3 V G T P M S K T G E A D L T Y V K A A A

1800 CGAAAACAATCGGTGAGCATCTTAACGGCTACAAAGTGATCGTAAATAAAAGCACAGTCC

3 K T I G E H L N G Y K V I V N K S T V P

1860 CGGTTGGAACAGGGAAACTGGTGCAATCTATCGTTCAAAAAGCCTCAAAGGGGAGATACT

3 V G T G K L V Q S I V Q K A S K G R Y S

EcoRI

1920 CATTGTGATGTTGTATCTAACCCCTGAATTCCTTCGGGAAGGGTCAGCGATTCATGACACGA

3 F D V V S N P E F L R E G S A I H D T M

1980 TGAATATGGAGCGTGCCCGTATTGGTTCAACAAGTCATAAAGCCGCTGCCATCATTGAGG

3 N M E R A V I G S T S H K A A A I I E E

2040 AACTTCATCAGCCATTCCATGCTCCTGTCATTAACAAACCTAGAAAGTGCAGAAATGA

3 L H Q P F H A P V I K T N L E S A E M I

EcoRV

2100 TTAAATACGCCGGAATGCATTTCTGGCGACAAAGATTCCTTTATCAACGATATCGCAA

3 K Y A A N A F L A T K I S F I N D I A N

2160 ACATTTGTGAGCGAGTCGGCGCAGACGTTTCAAAAGTTGCTGATGGTGTGGTCTTGACA

3 I C E R V G A D V S K V A D G V G L D S

2220 GCCGTATCGGCAGAAAGTTCCTTAAAGCTGGTATTGGATTTCGGCGGTTTCATGTTTTCCAA

3 R I G R K F L K A G I G F G G S C F P K

2280 AGGATACAACCGCGCTGCTTCAAATCGCAAATCGGCAGGCTATCCATTCAAGCTCATCG

3 D T T A L L Q I A K S A G Y P F K L I E

2340 AAGCTGTCATTGAAACGAACGAAAAGCAGCGTGTTCATATTGTAGATAAACTTTTGACTG

3 A V I E T N E K Q R V H I V D K L L T V

ES 2 575 252 T3

2400 TTATGGGAAGCGTCAAAGGGAGAACCATTTTCAGTCCTGGGATTAGCCTTCAAACCGAATA

3 M G S V K G R T I S V L G L A F K P N T

PstI

2460 CGAACGATGTGAGATCCGCTCCAGCGCTTGATATTATCCCAATGCTGCAGCAGCTGGGCG

3 N D V R S A P A L D I I P M L Q Q L G A

HindIII

2520 CCCATGTAAAAGCATAACGATCCGATTGCTATTCTGAAGCTTCAGCGATCCTTGCGCAAC

3 H V K A Y D P I A I P E A S A I L G E Q

SphI

2580 AGGTCGAGTATTACACAGATGTGTATGCTGCGATGGAAGACACTGATGCATGCCTGATTT

3 V E Y Y T D V Y A A M E D T D A C L I L

2640 TAACGGATTGGCCGGAAGTAAAAGAAATGGAGCTTGTAAGTAAAAGTAAAACCCTCTTAAAAC

3 T D W P E V K E M E L V K V K T L L K Q

2700 AGCCAGTCATCATTGACGGCAGAAATTTATTTTCACTTGAAGAGATGCAGGCAGCCGGAT

3 P V I I D G R N L F S L E E M Q A A G Y

2760 ACATTTATCACTCTATCGGCCGTCCCGCTGTTTCGGGGAACGGAACCCTCTGACAAGTATT

3 I Y H S I G R P A V R G T E P S D K Y F

BamHI

2820 TTCCGGGCTTGCCGCTGAAGAATTGGCTAAAGACTTGGGAAGCGTCAATTTATAAGGAT

3 P G L P L E E L A K D L G S V N L

SphI

2880 CCGGCCGCATGCCGGCTAATCGCGACCGGTTAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAA

2940 CGGGTCTTGAGGGTTTTTTGCTAAAGGAGGAACCTATATCCGGTCCAAGAATTGGAGCCA

3000 ATCAATTCTTGCGGAGAACTGTGAATGCGCAAACCAACCCTTGGCAGAACATATCCATCG

3060 CGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGCACGCGGCATCTCGGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC

3120 CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGA

3180 AACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCT

3240 CCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTG

ES 2 575 252 T3

3300 GCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAG
3360 CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTAT
3420 CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAC
3480 AGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC
3540 TACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTC
3600 GGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTT
3660 TTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC
3720 TTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATG
3780 AGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCA
3840 ATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCA
3900 CCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAG
3960 ATAACCTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGAC
4020 CCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGC
4080 AGAAGTGGTCTCGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCT
PstI

4140 AGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATC

Hpy99I

4200 GTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGG
4260 CGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATC
4320 GTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAT

ScaI

4380 TCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAG
4440 TCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCCGGCGTCAACACGGGAT
4500 AATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGG
4560 CGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCA
4620 CCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGA
4680 AGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTC
4740 TTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATA

ES 2 575 252 T3

4800 TTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTG

4860 CCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATC

EcoRI

4920 ACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCCTGTTATAAAAAAGGATCAATTTTGAACCTC

4980 TCCCAAAGTTGATCCCTTAACGATTTAGAAATCCCTTTGAGAATGTTTATATACATTCAA

-

5040 GGTAACCAGCCAACTAATGACAATGATTCCTGAAAAAGTAATAACAAATTACTATACAG

5100 ATAAGTTGACTGATCAACTTCCATAGGTAACAACCTTTGATCAAGTAAGGGTATGGATAA

5160 TAAACCACCTACAATTGCAATACCTGTTCCCTCTGATAAAAAGCTGGTAAAGTTAAGCAA

5220 ACTCATTCCAGCACCAGCTTCCTGCTGTTTCAAGCTACTTGAAACAATTGTTGATATAAC

5280 TGTTTTGGTGAACGAAAGCCCACCTAAAACAAATACGATTATAATTGTCATGAACCATGA

5340 TGTTGTTTCTAAAAGAAAGGAAGCAGTTAAAAGCTAACAGAAAGAAATGTAACCTCGAT

5400 GTTTAACACGTATAAAGGACCTCTTCTATCAACAAGTATCCCACCAATGTAGCCGAAAAT

ScaI

5460 AATGACACTCATTGTTCCAGGGAAAATAATTACACTTCCGATTTCCGGCAGTACTTAGCTG

5520 GTGAACATCTTTCATCATATAAGGAACCATAGAGACAAACCCTGCTACTGTTCCAAATAT

5580 AATCCCCCACAAAGAACTCCAATCATAAAAGGTATATTTTTCCCTAATCCGGGATCAAC

5640 AAAAGGATCTGTTACTTTCCTGATATGTTTTACAAATATCAGGAATGACAGCACGCTAAC

5700 GATAAGAAAAGAAATGCTATATGATGTTGTAACAACATAAAAAATACAATGCCTACAGA

EcoRV

5760 CATTAGTATAATTCCTTTGATATCAAATGACCTTTTATCCTTACTTCTTCTTTAATAA

5820 TTTCATAAGAAACGGAACAGTGATAATTGTTATCATAGGAATGAGTAGAAGATAGGACCA

5880 ATGAATATAATGGGCTATCATTCCACCAATCGCTGGACCGACTCCTTCTCCCATGGCTAC

ClaI

5940 TATCGATCCAATAAGACCAAATGCTTTACCCCTATTTTCCCTTGGAAATATAGCGCGCAAC

6000 TACAACCATTACGAGTGCTGGAAATGCAGCTGCACCAGCCCCTTGAATAAACGAGCCAT

6060 AATAAGTAAGGAAAAGAAAGAATGGCCAACAACCCAATTACCGACCCGAAACAATTTAT

6120 TATAATTCCAATAGGAGTAACCTTTTGATGCCTAATTGATCAGATAGCTTCCATATAC

ES 2 575 252 T3

6180 AGCTGTTCCAATGGAAAAGGTTAACATAAAGGCTGTGTTCACCCAGTTTGTACTCGCAGG
6240 TGGTTTATTAAAATCATTTCGAATATCAGGTAATGAGACGTTCAAACCATTTCATTTAA
6300 TACGCTAAAAAAGATAAAAATGCAAAGCCAAATTTAAAATTTGGTTGTGTCGTAAATTCGA
6360 TTGTGAATAGGATGTATTACATTTCCACCTCCAATAATGAGGGCAGACGTAGTTTATAG
6420 GGTTAATGATACGCTTCCCTCTTTTAATTGAACCCTGTTACATTCATTACACTTCATAAT
6480 TAATTCCTCCTAAACTTGATTAAAACATTTTACCACATATAAACTAAGTTTAAATTCAG
6540 TATTTTCATCACTTATAACAATATGGCCCCTTTGTTGAACTACTCTTTAATAAAAATAAT
6600 TTTTCCGTTCCCAATTCCACATTGCAATAATAGAAAATCCATCTTCATCGGCTTTTTTCGT
6660 CATCATCTGTATGAATCAAATCGCCTTCTTCTGTGTCATCAAGGTTAATTTTTTATGTA
6720 TTTCTTTTAACAAACCACCATAGGAGATTAACCTTTTACGGTGTAAACCTTCCTCCAAAT
6780 CAGACAAACGTTTCAAATTCCTTTCTTCATCATCGGTCATAAAATCCGTATCCTTTACAG
6840 GATATTTTGCAGTTTCGTCAATTGCCGATTGTATATCCGATTTATATTTATTTTTCGGTC
6900 GAATCATTGAACTTTTACATTTGGATCATAGTCTAATTCATTGCCTTTTTCCAAAATT
6960 GAATCCATTGTTTTTGATTACGCTAGTTTTCTGTATCTTAAAATAAGTTGGTCCACAC
7020 ATACCAATACATGCATGTGCTGATTATAAGAATTATCTTTATTATTATTGTCACTTCCG
7080 TTGCACGCATAAAACCAACAAGATTTTTATTAATTTTTTTTATATTGCATCATTCGGCGAA
7140 ATCCTTGAGCCATATCTGACAACTCTTATTTAATTCTTCGCCATCATAAACATTTTTAA
7200 CTGTTAATGTGAGAAACAACCAACGAACGTTGGCTTTTGTTTAATAACTTCAGCAACAA
7260 CCTTTTGTGACTGAATGCCATGTTTCATTGCTCTCCTCCAGTTGCACATTGGACAAAGCC
7320 TGGATTTACAAAACCACACTCGATACAACCTTCTTTTCGCCTGTTTCACGATTTTGTAT
7380 ACTCTAATATTTACGACAATCTTTTACTCTTTCAGCCTTTTTAAATTCAAGAATATGCA
7440 GAAGTTCAAAGTAATCAACATTAGCGATTTTCTTTTCTCTCCATGGTCTCACTTTTCCAC
7500 TTTTTGTCTTGTCCACTAAAACCCTTGATTTTTCATCTGAATAAATGCTACTATTAGGAC
7560 ACATAATATTAAAAGAAACCCCATCTATTTAGTTATTTGTTGGTCACTTATAACTTTA
7620 ACAGATGGGGTTTTTCTGTGCAACCAATTTTAAGGGTTTTCAATACTTTAAAACACATAC
7680 ATACCAACACTTCAACGCACCTTTCAGCAACTAAAATAAAAATGACGTTATTTCTATATG
7740 TATCAAGATAAGAAAGAACAAGTTCAAACCATCAAAAAAGACACCTTTTCAGGTGCTT
7800 TTTTTATTTTATAAACTCATTCCCTGATCTCGACTTCGTTCTTTTTTTACCTCTCGGTTA

7860 TGAGTTAGTTCAAATTCGTT (SEQ ID NO:1)

El plásmido tiene un peso molecular de 7880 pb y contiene los diversos genes responsables de la síntesis de ácido hialurónico bajo el control del promotor fuerte T7 del bacteriófago T7. La secuencia de la sintasa de hasA a partir de *Streptococcus equi* cae entre las bases 196 y 1383, y la del gen tuaD entre las bases 1430 y 2873.

5 Ejemplo 6: Clonación del gen gtaB (UDP-Glc pirofosforilasa)

El gen gtaB a partir de *Bacillus Subtilis* se recuperó del genoma bacteriano como el anterior, y a través de dos oligonucleótidos que tienen las siguientes secuencias:

5'ATGTCTAGAATAATAAGGAAGGTGCCTTTTAAATGAA 3' (SEQ ID NO:15)

5'CTCTCGAGCTAGCTTAGATTTCTTCTTTGTTTAGTAAAG 3' (SEQ ID NO:16)

10 El producto amplificado de 925 pb se cortó con *XbaI* y *XhoI* y se clonó en el plásmido pGEM4hasA en los mismos sitios de restricción; el plásmido pGEMhasA-gtaB se obtiene de esta manera.

Ejemplo 7 Clonación del gen pgi a partir de *Bacillus subtilis* en el plásmido pRSET B

15 El gen pgi (glucosa 6 fosfato isomerasa, también llamado pgi fosfoglucoisomerasa, correspondiente a hasE de *S. zooepidemicus*) se recuperó a partir del genoma de bacterias como se describe anteriormente con estos dos oligonucleótidos

5'TACATATGACGCATGTACGCTTGACTACTCCAAAAG 3' (SEQ ID NO:17)

5'ATGCTAGCTCATTATAATCTTCCAGACGTTTTTCAAG 3' (SEQ ID NO:18)

20 y PCR, y se clonó después del corte con enzimas de restricción *NdeI* y *NheI* en plásmido pRSETB entre los mismos sitios de restricción. El plásmido pRSEpgi se obtiene de esta manera. Se coloca el gen pgi bajo el control de un promotor T7, y cuando se transfiere a las células de *E. coli* BL21 DE3 que produce la proteína del peso molecular esperado. Este plásmido se cortó con *XbaI* y *PstI*, y el fragmento de 1340 pb se clonó en el plásmido pGEMhasA-gtaB entre los sitios *NheI* y *PstI*. El sitio de restricción *XbaI*, como *NheI*, se pierde después de la clonación. De esta manera el gen pgi se coloca detrás del gen gtaB. El plásmido, denominado pGEM hasA-gtaB-pgi, se cortó con *XbaI* y *XhoI*, y el fragmento que contiene las secuencias que codifican para gtaB y pgi se clonó en el plásmido pRSEtuaD entre los mismos sitios. El plásmido obtenido se denomina pRSEtuaD-gtaB-pgi.

Este último se cortó con *XbaI* y *BamHI* y el fragmento que contiene la secuencia que codifica para tuaD, gtaB y pgi se clonó en el plásmido pPT7hasAtuaD entre los mismos sitios para obtener el plásmido pPT7hasAtuaDgtaBpgi, que se llama pT7hyal.

La secuencia del plásmido pT7hya1 se muestra a continuación

ES 2 575 252 T3

0 CTTTTTAGGTTCTAAATCGTGTTTTTCTTGGAATTGTGCTGTTTTATCCTTTACCTTGTC
60 TACAAACCCCTTAAAAACGTTTTTAAAGGCTTTTAAGCCGTCTGTACGTTTCCTTAAGGCG
120 AAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCGAATATTAATTAACCAAG

Bsp1407I

180 GAGGTGAAATGTACAATGAGAACATTAAAAAACCTCATAACTGTTGTGGCCTTTAGTATT

1 M R T L K N L I T V V A F S I

HindIII

240 TTTTGGGTACTGTTGATTTACGTCAATGTTTATCTCTTTGGTGCTAAAGGAAGCTTGTC

1 F W V L L I Y V N V Y L F G A K G S L S

300 ATTTATGGCTTTTTGCTGATAGCTTACCTATTAGTCAAAATGTCCTTATCCTTTTTTTTAC

1 I Y G F L L I A Y L L V K M S L S F F Y

360 AAGCCATTTAAGGGAAGGGCTGGGCAATATAAGGTTGCAGCCATTATTCCTCTTATAAC

1 K P F K G R A G Q Y K V A A I I P S Y N

ES 2 575 252 T3

420 GAAGATGCTGAGTCATTGCTAGAGACCTTAAAAAGTGTTTCAGCAGCAAACCTATCCCCTA
1 E D A E S L L E T L K S V Q Q Q T Y P L
480 GCAGAAATTTATGTTGTTGACGATGGAAGTGCTGATGAGACAGGTATTAAGCGCATTGAA
1 A E I Y V V D D G S A D E T G I K R I E
540 GACTATGTGCGTGACACTGGTGACCTATCAAGCAATGTCATTGTTACCGGTGAGAAAAA
1 D Y V R D T G D L S S N V I V H R S E K
600 AATCAAGGAAAGCGTCATGCACAGGCCTGGGCCTTTGAAAGATCAGACGCTGATGTCTTT
1 N Q G K R H A Q A W A F E R S D A D V F
660 TTGACCGTTGACTCAGATACTTATATCTACCCTGATGCTTTAGAGGAGTTGTTAAAAACC
1 L T V D S D T Y I Y P D A L E E L L K T
720 TTTAATGACCCAACTGTTTTTGCTGCGACGGGTCACCTTAATGTCAGAAATAGACAAACC
1 F N D P T V F A A T G H L N V R N R Q T
780 AATCTCTTAACACGCTTGACAGATATTCGCTATGATAATGCTTTTGGCGTTGAACGAGCT
1 N L L T R L T D I R Y D N A F G V E R A
840 GCCCAATCCGTTACAGGTAATATTCTCGTTTGCTCAGGCCCGCTTAGCGTTTACAGACGC
1 A Q S V T G N I L V C S G P L S V Y R R
900 GAGGTGGTTGTTCCCTAACATAGATAGATACATCAACCAGACCTTCTGGGTATTCTCTGTA
1 E V V V P N I D R Y I N Q T F L G I P V
960 AGTATCGGTGATGACAGGTGCTTGACCAACTATGCAACTGATTTAGGAAAGACTGTTTAT
1 S I G D D R C L T N Y A T D L G K T V Y
1020 CAATCCACTGCTAAATGTATTACAGATGTTCTGACAAGATGTCTACTTACTTGAAGCAG
1 Q S T A K C I T D V P D K M S T Y L K Q
1080 CAAAACCGCTGGAACAAGTCCTTCTTTAGAGAGTCCATTATTTCTGTTAAGAAAATCATG
1 Q N R W N K S F F R E S I I S V K K I M
1140 AACAACTCTTTGTAGCCCTATGGACCATACTTGAGGTGTCTATGTTTATGATGCTTGT
1 N N P F V A L W T I L E V S M F M M L V
1200 TATTCTGTGGTGGATTTCTTTGTAGGCAATGTCAGAGAATTTGATTGGCTCAGGTTTTG
1 Y S V V D F F V G N V R E F D W L R V L

ES 2 575 252 T3

1260 GCCTTTCTGGTGATTATCTTCATTGTTGCTCTTTGTCGTAATATTCACTATATGCTTAAG

1 A F L V I I F I V A L C R N I H Y M L K

1320 CACCCGCTGTCCTTCTTGTTATCTCCGTTTTATGGGGTACTGCTTTGTTTGTCTACAGC

1 H P L S F L L S P F Y G V L L C L S Y S

1380 CCTTGAAATTGTATTCTCTTTTTACTATTAGAAATGCTGACTGGGGAACACGTAAAAAAT

1 P

XbaI

NdeI

1440 TATTATAATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAAAAA

3 M K K I

1500 TAGCTGTCATTGGAACAGGTTATGTAGGACTCGTATCAGGCACTTGCTTTGCCGAGATCG

3 A V I G T G Y V G L V S G T C F A E I G

EcoRV

ClaI

1560 GCAATAAAGTTGTTTGTCTGTGATATCGATGAATCAAAAATCAGAAGCCTGAAAAATGGGG

3 N K V V C C D I D E S K I R S L K N G V

1620 TAATCCCAATCTATGAACCAGGGCTTGCAGACTTAGTTGAAAAAATGTGCTGGATCAGC

3 I P I Y E P G L A D L V E K N V L D Q R

EcoRV

1680 GCCTGACCTTTACGAACGATATCCCGTCTGCCATTCGGGCCTCAGATATTATTTATATTG

3 L T F T N D I P S A I R A S D I I Y I A

1740 CAGTCGGAACGCCTATGTCCAAAACAGGTGAAGCTGATTTAACGTACGTCAAAGCGGCGG

3 V G T P M S K T G E A D L T Y V K A A A

1800 CGAAAACAATCGGTGAGCATCTTAACGGCTACAAAAGTGATCGTAAATAAAAGCACAGTCC

3 K T I G E H L N G Y K V I V N K S T V P

1860 CGGTTGGAACAGGGAAACTGGTGCAATCTATCGTTCAAAAAGCCTCAAAGGGGAGATACT

3 V G T G K L V Q S I V Q K A S K G R Y S

EcoRI

1920 CATTTGATGTTGTATCTAACCCCTGAATTCCTTCGGGAAGGGTCAGCGATTTCATGACACGA

ES 2 575 252 T3

3 F D V V S N P E F L R E G S A I H D T M
1980 TGAATATGGAGCGTGCCGTGATTGGTTCAACAAGTCATAAAGCCGCTGCCATCATTGAGG
3 N M E R A V I G S T S H K A A A I I E E
2040 AACTTCATCAGCCATTCCATGCTCCTGTCATTAACAACCTAGAAAGTGCAGAAATGA
3 L H Q P F H A P V I K T N L E S A E M I

EcoRV

2100 TTAAATACGCCGCGAATGCATTTCTGGCGACAAAGATTTCTTTTATCAACGATATCGCAA
3 K Y A A N A F L A T K I S F I N D I A N
2160 ACATTTGTGAGCGAGTCGGCGCAGACGTTTCAAAAAGTTGCTGATGGTGTGGTCTTGACA
3 I C E R V G A D V S K V A D G V G L D S
2220 GCCGTATCGGCAGAAAGTTCCTTAAAGCTGGTATTGGATTCGGCGGTTTCATGTTTTCCAA
3 R I G R K F L K A G I G F G G S C F P K
2280 AGGATACAACCGCGCTGCTTCAAATCGCAAAATCGGCAGGCTATCCATTCAAGCTCATCG
3 D T T A L L Q I A K S A G Y P F K L I E
2340 AAGCTGTCATTGAAACGAACGAAAAGCAGCGTGTTTCATATTGTAGATAAACTTTTGACTG
3 A V I E T N E K Q R V H I V D K L L T V
2400 TTATGGGAAGCGTCAAAGGGAGAACCATTTTCAGTCCTGGGATTAGCCTTCAAACCGAATA
3 M G S V K G R T I S V L G L A F K P N T

PstI

2460 CGAACGATGTGAGATCCGCTCCAGCGCTTGATATTATCCCAATGCTGCAGCAGCTGGGCG
3 N D V R S A P A L D I I P M L Q Q L G A

HindIII

2520 CCCATGTAAAAGCATAACGATCCGATTGCTATTCTGAAGCTTCAGCGATCCTTGCGCAAC
3 H V K A Y D P I A I P E A S A I L G E Q

SphI

2580 AGGTCGAGTATTACACAGATGTGTATGCTGCGATGGAAGACACTGATGCATGCCTGATTT
3 V E Y Y T D V Y A A M E D T D A C L I L
2640 TAACGGATTGGCCGGAAGTAAAAGAAATGGAGCTTGAAAAGTGAAAACCTCTTAAAAC

ES 2 575 252 T3

3 T D W P E V K E M E L V K V K T L L K Q
 2700 AGCCAGTCATCATTGACGGCAGAAATTTATTTTCACTTGAAGAGATGCAGGCAGCCGGAT
 3 P V I I D G R N L F S L E E M Q A A G Y
 2760 ACATTTATCACTCTATCGGCCGTCCCGCTGTTTCGGGGAACGGAACCCTCTGACAAGTATT
 3 I Y H S I G R P A V R G T E P S D K Y F
 2820 TTCCGGGCTTGCCGCTTGAAGAATTGGCTAAAGACTTGGGAAGCGTCAATTTATAAGCTA
 3 P G L P L E E L A K D L G S V N L
 2880 GAATAATAAGGAAGGTGCCTTTTAAATGAAAAAAGTACGTAAAGCCATAATTCCAGCAGC
 2 M K K V R K A I I P A A
 2940 AGGCTTAGGAACACGTTTTCTTCCGGCTACGAAAGCAATGCCGAAAGAAATGCTTCCTAT
 2 G L G T R F L P A T K A M P K E M L P I
 3000 CGTTGATAAACCTACCATTCAATACATAATTGAAGAAGCTGTTGAAGCCGGTATTGAAGA
 2 V D K P T I Q Y I I E E A V E A G I E D
 3060 TATTATTATCGTAACAGGAAAAAGCAAGCGTGCGATTGAGGATCATTTTGATTACTCTCC
 2 I I I V T G K S K R A I E D H F D Y S P
 3120 TGAGCTTGAAAGAAACCTAGAAGAAAAAGGAAAAACTGAGCTGCTTGAAAAAGTGAAAAA
 2 E L E R N L E E K G K T E L L E K V K K
 3180 GGCTTCTAACCTGGCTGACATTCACTATATCCGCCAAAAAGAACCTAAAGGTCTCGGACA
 2 A S N L A D I H Y I R Q K E P K G L G H
 3240 TGCTGTCTGGTGCACGCAACTTTATCGGCGATGAGCCGTTTGCGGTACTGCTTGGTGA
 2 A V W C A R N F I G D E P F A V L L G D
 3300 CGATATTGTTTCAGGCTGAAACTCCAGGGTTGCGCCAATTAATGGATGAATATGAAAAAAC
 2 D I V Q A E T P G L R Q L M D E Y E K T
 3360 ACTTTCTTCTATTATCGGTGTTTCAGCAGGTGCCCCGAAGAAGAAACACACCGCTACGGCAT
 2 L S S I I G V Q Q V P E E E T H R Y G I
 3420 TATTGACCCGCTGACAAGTGAAGGCCGCCGTTATCAGGTGAAAACTTCGTTGAAAAACC
 2 I D P L T S E G R R Y Q V K N F V E K P
 3480 GCCTAAAGGCACAGCACCTTCTAATCTTGCCATCTTAGGCCGTTACGTATTCACGCCTGA

ES 2 575 252 T3

2 P K G T A P S N L A I L G R Y V F T P E
BglIII
3540 GATCTTCATGTATTTAGAAAGAGCAGCAGGTTGGCGCCGCGGAGAAATTCAGCTCACAGA
2 I F M Y L E E Q Q V G A G G E I Q L T D
3600 CGCCATTCAAAGCTGAATGAAATTCAAAGAGTGTGCTTACGATTTTGAAGGCAAGCG
2 A I Q K L N E I Q R V F A Y D F E G K R
3660 TTATGATGTTGGTGAAGCTCGGCTTTATCACAACAACCTCTGAATTTGCGATGCAGGA
2 Y D V G E K L G F I T T T L E F A M Q D
3720 TAAAGAGCTTCGCGATCAGCTCGTTCATTTATGGAAGGTTTACTAAACAAAGAAGAAAT
2 K E L R D Q L V P F M E G L L N K E E I
NdeI
3780 CTAAGCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACGCATGTACG
2 M T H V R
3840 CTTGACTACTCCAAAAGCGTTGACTTTCTTTCCAACGGAACATGAACTTACATACCTGCG
2 L T T P K A L T F F P T E H E L T Y L R
3900 GGACTTTGTAAAAACAGCACACCATAATATCCATGAGAAAACAGGCGCGGGCAGCGATTT
2 D F V K T A H H N I H E K T G A G S D F
EcoRI
3960 TCTAGGCTGGGTGGACCTCCCTGAACATTATGATAAAGAAGAATTCGCGCGCATCCAAAA
2 L G W V D L P E H Y D K E E F A R I Q K
4020 AAGCGCGGAAAAAATCCAATCTGACTCTGATGTCTTGCTTGTGTCGGCATCGGCGGTTTC
2 S A E K I Q S D S D V L L V V G I G G S
4080 TTATCTTGGAGCGCGGGCAGCGATTGAAGCGCTGAATCACGCGTTTTATAACACTTTGCC
2 Y L G A R A A I E A L N H A F Y N T L P
4140 AAAAGCCAAACGCGGCAATCCGCAAGTCATTTTAACTTCTCTATTAATGTGATTTCTAA
2 K A K R G N P Q V I F N F S I N V I S K
HindIII
4200 ATCAGGTACGACAACCTGAACCTGCAATCGCTTCCGTATTTTCCGCAAGCTTCTTGAAGA

ES 2 575 252 T3

2 S G T T T E P A I A F R I F R K L L E E
 4260 GAAATACGGTAAAGAAGAAGCGAAAGCGCGGATTTATGCAACAACCTGATAAAGAGCGCGG
 2 K Y G K E E A K A R I Y A T T D K E R G
 4320 CGCATTAAAAACGCTTTCTAACGAAGAAGGCTTTGAATCATTTCGTAATTCCTGACGATGT
 2 A L K T L S N E E G F E S F V I P D D V
 4380 CGGCGGCCGTTATTTCAGTTTTAACAGCTGTAGGTCTCTTGCCGATTGCTGTCAGCGGCGT
 2 G G R Y S V L T A V G L L P I A V S G V
 4440 CAACATTGACGACATGATGAAAGGCGCCCTGGATGCGAGCAAAGATTTTGCAACATCTGA
 2 N I D D M M K G A L D A S K D F A T S E
 4500 ACTGGAAGATAACCCAGCATACCAATATGCGGTTGTTTCGCAATGTCCTTTATAATAAGGG
 2 L E D N P A Y Q Y A V V R N V L Y N K G
 4560 CAAAACAATTGAAATGCTCATCAACTACGAACCGGCGCTTCAATACTTTGCGGAATGGTG
 2 K T I E M L I N Y E P A L Q Y F A E W W
 4620 GAAGCAGCTGTTCCGAGAAAAGCGAAGGGAAAGATGAGAAGGGCATTATCCTTCTTCAGC
 2 K Q L F G E S E G K D E K G I Y P S S A
 4680 GAACTATTCAACAGACCTTCATTCTTTAGGCCAGTATGTACAAGAAGGCCGAGAGATTT
 2 N Y S T D L H S L G Q Y V Q E G R R D L
 4740 ATTCGAAACGGTCCTGAACGTAGAGAAGCCTAAACATGAACTGACAATTGAGGAAGCGGA
 2 F E T V L N V E K P K H E L T I E E A D
 4800 TAACGATCTTGACGGCTTGAACATTTAGCCGTTAAAACCTGTTGATTTTCGTTAACAAAA
 2 N D L D G L N Y L A G K T V D F V N K K
 4860 AGCATTCCAAGGTACAATGCTTGCCCATACAGACGGAAATGTTCCGAACTTAATCGTTAA
 2 A F Q G T M L A H T D G N V P N L I V N
 4920 CATTCTGAGCTGAATGCATATACTTTTGGATACCTGTATATTTCTTCGAAAAAGCCTG
 2 I P E L N A Y T F G Y L V Y F F E K A C
 4980 CGCGATGAGCGGTTACCTCCTTGGCGTCAATCCGTTTGACCAGCCTGGTGTAGAAGCGTA
 2 A M S G Y L L G V N P F D Q P G V E A Y
 5040 TAAAGTCAATATGTTTGCCTTACTCGGCCAACCTGGCTTTGAAGAGAAAAAGCAGAGCT

ES 2 575 252 T3

2 K V N M F A L L G K P G F E E K K A E L

NheI

5100 TGAAAAACGTCTGGAAGATTATAAATGAGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCCG

2 E K R L E D Y K

BamHI KpnI

SphI AgeI

5160 GGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGGTACCGGCCGCATGCCGGCTAATCGCGAC

5220 CGGTAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGTCTAAA

5280 GGAGGAACATATCCGGTCCAAGAATTGGAGCCAATCAATCTTGCGGAGAAGTGTGAAT

5340 GCGCAAACCAACCCTTGGCAGAACATATCCATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGCACG

5400 CGGCGCATCTCGGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCA

5460 TCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCA

5520 GGC GTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGG

5580 ATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAG

5640 GTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGT

5700 TCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACA

5760 CGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGTTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG

5820 CGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATT

5880 TGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATC

5940 CGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCG

6000 CAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG

6060 GAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTA

6120 GATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTG

6180 GTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCG

6240 TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACC

6300 ATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATC

6360 AGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGC

6420 CTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAGTTAATAG

ES 2 575 252 T3

6480 TTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTAT
6540 GGCTTCATTAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTG
6600 CAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGT
6660 GTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAG

ScaI

6720 ATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCG
6780 ACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTT
6840 AAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCT
6900 GTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTAC
6960 TTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAAT
7020 AAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCAT
7080 TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACA
7140 AATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTAT

EcoRI

7200 TATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTTCAAGAATT
7260 CCTGTTATAAAAAAGGATCAATTTTGAAGTCTCTCCCAAAGTTGATCCCTTAACGATTT
7320 AGAAATCCCTTTGAGAATGTTTATATACATTTCAAGGTAACCAGCCAACATAATGACAATGA
7380 TTCCTGAAAAAAGTAATAACAAATTACTATACAGATAAGTTGACTGATCAACTTCCATAG
7440 GTAACAACCTTTGATCAAGTAAGGTATGGATAATAAACCACCTACAATTGCAATACCTG
7500 TTCCCTCTGATAAAAAGCTGGTAAAGTTAAGCAAACCTCATTCCAGCACCAGCTTCCCTGCT
7560 GTTTCAAGCTACTTGAAACAATTGTTGATATAACTGTTTTGGTGAACGAAAGCCACCTA
7620 AAACAAATACGATTATAATTGTCATGAACCATGATGTTGTTTCTAAAAGAAAGGAAGCAG
7680 TTA AAAAGCTAACAGAAAGAAATGTA ACTCCGATGTTTAACACGTATAAAGGACCTCTTC
7740 TATCAACAAGTATCCCACCAATGTAGCCGAAAATAATGACACTCATTGTTCCAGGGAAAA

ScaI

7800 TAATTACACTTCCGATTTCCGGCAGTACTTAGCTGGTGAACATCTTTCATCATATAAGGAA
7860 CCATAGAGACAAACCCTGCTACTGTTCCAAATATAAATCCCCACAAAGAACTCCAATCA
7920 TAAAAGGTATATTTTTCCCTAATCCGGGATCAACAAAAGGATCTGTTACTTTCCCTGATAT

ES 2 575 252 T3

7980 GTTTTACAAATATCAGGAATGACAGCACGCTAACGATAAGAAAAGAAATGCTATATGATG
EcoRV
8040 TTGTAAACAACATAAAAAATACAATGCCTACAGACATTAGTATAATTCCTTTGATATCAA
8100 AATGACCTTTTATCCTTACTTCTTTCTTTAATAATTTTCATAAGAAACGGAACAGTGATAA
8160 TTGTTATCATAGGAATGAGTAGAAGATAGGACCAATGAATATAATGGGCTATCATTCCAC
8220 CAATCGCTGGACCGACTCCTTCTCCCATGGCTACTATCGATCCAATAAGACCAAATGCTT
8280 TACCCCTATTTTCCTTTGGAATATAGCGCGCAACTACAACCATTACGAGTGCTGGAAATG
8340 CAGCTGCACCAGCCCCTTGAATAAAACGAGCCATAATAAGTAAGGAAAAGAAAGAATGGC
8400 CAACAAACCCAATTACCGACCCGAAACAATTTATTATAATTCCAAATAGGAGTAACCTTT
8460 TGATGCCTAATTGATCAGATAGCTTCCATATACAGCTGTTCCAATGGAAAAGGTAAACA
8520 TAAAGGCTGTGTTCAACCAGTTTGTACTCGCAGGTGGTTTATTAAAATCATTGCAATAT
8580 CAGGTAATGAGACGTTCAAACCATTTCATTTAATACGCTAAAAAAGATAAAATGCAAA
8640 GCCAAATTAATAATTTGGTTGTGTCGTAATTCGATTGTGAATAGGATGTATTCACATTT
8700 ACCCTCCAATAATGAGGGCAGACGTAGTTTATAGGGTAAATGATACGCTTCCCTCTTTTA
8760 ATTGAACCCGTGTTACATTCATTACACTTCATAATTAATTCCTCCTAAACTTGATTAAAAC
8820 ATTTTACCACATATAAACTAAGTTTTAAATTCAGTATTTTCATCACTTATACAACAATATG
8880 GCCCGTTTGTGAACTACTCTTTAATAAAAATAATTTTTCCGTTCCCAATTCCACATTGCA
8940 ATAATAGAAAATCCATCTTCATCGGCTTTTTTCGTCATCATCTGTATGAATCAAATCGCCT
9000 TCTTCTGTGTCATCAAGTTTAATTTTTTATGTATTTCTTTTAACAAACCACCATAGGAG
9060 ATTAACCTTTTACGGTGTAAACCTTCCTCCAAATCAGACAAACGTTTCAAATTCCTTTCT
9120 TCATCATCGGTCATAAAATCCGTATCCTTTACAGGATATTTTGCAGTTTCGTCAATTGCC
9180 GATTGTATATCCGATTTATATTTATTTTTTCGGTCGAATCATTGAACTTTTACATTTGGA
9240 TCATAGTCTAATTTCAATGCCTTTTTCCAAAATTGAATCCATTGTTTTTGATTACGTAG
9300 TTTTCTGTATTCCTTAAAATAAGTTGGTTCCACACATACCAATACATGCATGTGCTGATTA
9360 TAAGAATTATCTTTATTATTTATTGTCACCTCCGTTGCACGCATAAAACCAACAAGATTT
9420 TTATTAATTTTTTTATATTGCATCATTCGGCGAAATCCTTGAGCCATATCTGACAACTC
9480 TTATTTAATTCCTCGCCATCATAAACATTTTTAACTGTTAATGTGAGAAACAACCAACGA
9540 ACTGTTGGCTTTTGTTTAATAACTTCAGCAACAACCTTTTGTGACTGAATGCCATGTTTC

```

9600  ATTGCTCTCCTCCAGTTGCACATTGGACAAAAGCCTGGATTTACAAAACCACACTCGATAC
9660  AACTTTCTTTTCGCCCTGTTTCACGATTTTGTTTATACTCTAATATTTTCAGCACAATCTTTT
9720  ACTCTTTTCAGCCTTTTTAAATTCAAGAATATGCAGAAGTCAAAGTAATCAACATTAGCG
9780  ATTTTCTTTTCTCTCCATGGTCTCACTTTTCCACTTTTTGTCTTGTCCACTAAAACCCTT
9840  GATTTTTCATCTGAATAAATGCTACTATTAGGACACATAATATTAAAAGAAACCCCATC
9900  TATTTAGTTATTTGTTTGGTCACTTATAACTTTAACAGATGGGGTTTTTCTGTGCAACCA
9960  ATTTTAAGGGTTTTCAATACTTTAAAACACATACATACCAACACTTCAACGCACCTTTCA
10020 GCAACTAAAATAAAAATGACGTTATTTCTATATGTATCAAGATAAGAAAGAACAAGTTCA
10080 AAACCATCAAAAAAAGACACCTTTTCAGGTGCTTTTTTTATTTTATAAACTCATTCCCTG
10140 ATCTCGACTTCGTTCTTTTTTTACCTCTCGGTTATGAGTTAGTTCAAATTCGTT

```

(SEQ ID NO:2)

5 Este plásmido tiene un peso molecular de 10194 bp y contiene los diversos genes responsables de la síntesis de ácido hialurónico bajo el control de un promotor fuerte T7 de bacteriófago T7. La secuencia hasA a partir de *Streptococcus equi* está incluida entre las bases 196 y 1383, la del gen tuaD entre las bases 1430 y 2873, la secuencia que codifica para gtaB entre las bases 2905 y 3781, y que para pgi entre las bases 3824 y 5125.

Ejemplo 8: Mapa de restricción del plásmido pT7hya1

10 Cuando el plásmido pT7hya1 se corta con enzimas de restricción que dan lugar a un mapa de restricción que corresponde al que se espera después de la secuenciación. En la columna 1 de la Figura 5, se muestra que el corte con la enzima *EcoRI* da lugar a tres bandas de 4900 pb, 3240 pb y 2020 pb a partir del plásmido; en la columna 2 se muestra que el corte con *EcoRI* y *HindIII* da lugar a seis bandas de 3290 pb, 2950 pb, 1660 pb, 1400 pb, 610 pb y 290 pb; en la columna 3 se muestra que el corte con *HindIII* da lugar a tres bandas de 6240 pb, 2240 pb y 1690 pb, y en la columna 4 se muestra que, el corte con enzima de restricción *XbaI*, un sitio único da lugar a una única banda (Figura 5).

Ejemplo 9: Comprobar en la síntesis de las proteínas que dan lugar a la síntesis de ácido hialurónico

15 Los dos plásmidos pPT7hasAtuaD y pPT7hasAtuaDgtaBpgi (pT7Hya1) se transformaron en células bacterianas de *E. coli* BL21 DE3. Después de la inducción con IPTG, las células se lisaron, y la muestra obtenida se cargó en una SDS-PAGE para detectar la presencia de las proteínas que conducen a la síntesis de ácido hialurónico (Figura 6). La preparación en la columna 2 corresponde a células que llevan el plásmido pPT7hasAtuaD: como se muestra en la Figura 6, en comparación con las colonias de control en la columna 1, columna 2 presenta una proteína con un peso molecular de 54 kDa que corresponde a tuaD, y una proteína con un peso de 42 kDa que corresponde a hasA. Las muestras de la columna 7 y 8 que llevan el plásmido pPT7hasAtuaDgtaBpgi producen, en comparación con colonias de control 5 y 6, una proteína con un peso molecular de 54 kDa que corresponde a tuaD, una proteína con un peso molecular de 51 kDa que corresponde a pgi, una proteína con un peso de 42 kDa que corresponde a hasA, y una proteína con un peso molecular de 32 kDa que corresponde a gtaB. En conclusión, ambos plásmidos producen las proteínas de peso molecular esperado requerido para la síntesis de ácido hialurónico.

25 Ejemplo 10: Síntesis de ácido hialurónico en *E. coli* y selección por gradiente de IPTG

Los plásmidos pPT7 (colonia control), pPT7hasAtuaD (colonia 6) y pPT7hasAtuaDgtaBpgi (pT7Hya1 - colonia 2) se transformaron en células bacterianas BL21 DE3. Después de un crecimiento de 24 horas a 37 °C, se analizaron las colonias para la producción de ácido hialurónico. En solución, las células que llevan plásmidos pPT7hasAtuaD (colonia 6) o plásmidos pPT7hasAtuaDgtaBpgi (colonia 2) crecen mucho más lentamente, y después de la inducción con IPTG

sólo producen niveles bajos de ácido hialurónico. Después las células se sembraron en placas en presencia de IPTG (Figura 7).

5 Las colonias de control que llevan plásmido pPT7 (y ningún gen de síntesis de ácido hialurónico) crecen más fácilmente y son más grandes y más planas, que la colonia 6 y colonia 2, en la que las bacterias participan en la producción de ácido hialurónico; de hecho, colonias 2 y 6 son más brillantes que la del control, ya que producen ácido hialurónico. Para seleccionar células capaces de expresar altos niveles de ácido hialurónico, las células se sembraron en placas en presencia o ausencia de IPTG (Figura 8). En presencia de IPTG la mayoría de las colonias mueren, y sólo algunas sobreviven, especialmente aquellos cercanos al gradiente de IPTG formado. Se seleccionaron estas células y se volvieron a sembrar en presencia de IPTG para establecer su tasa de supervivencia (Figura 9): todas ellas quedaron con vida, manteniendo su capacidad de síntesis de HA.

10 Las declaraciones anteriores se demuestran por el hecho de que las células de las colonias de 6 y 2 se cultivaron en solución durante 48 horas en la presencia de IPTG y 1% de sacarosa. Se centrifugó 1 ml de este cultivo bacteriano para obtener el precipitado, y después el precipitado bacteriano se lisaron en presencia de 0.1% de SDS durante 10 minutos. Después de la adición de 2 volúmenes de alcohol etílico absoluto, el resultado fue como se muestra en la Figura 10.

15 Como se verá, sólo las colonias 6 y 2 dan lugar a un precipitado de ácido hialurónico (que se probó con el ensayo de carbazol).

Ejemplo 11: Transformación de plásmidos pPT7hasAtuaD y pPT7hasAtuaDgtaBpgi en *Bacillus megaterium*

20 El *B. megaterium* utilizado en la presente invención ya está pretransformado con el plásmido pT7-RNAP (QM B1551 MoBiTec) (este plásmido es capaz de replicarse tanto en *E. coli* como *B. megaterium*, ya que contiene dos orígenes de replicación que permita su propagación en ambas bacterias). También contiene la resistencia a la ampicilina y cloranfenicol, que puede ser utilizado para *E. coli* y *B. megaterium*, respectivamente. El plásmido contiene la secuencia capaz de codificar para la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor inducible por la xilosa, y también contiene el represor para el promotor de xilosa; si se mantienen las células en ausencia de xilosa, que por lo tanto no son capaces de transcribir la ARN polimerasa T7.

25 Para la transformación de esta bacteria fue necesario eliminar su pared bacteriana para obtener los protoplastos a utilizar para la transformación. Para eliminar la pared bacteriana, se introdujeron 50 ml de medio LB en un matraz Erlenmeyer de 300 ml, y se adicionó 1 ml de *Bacillus megaterium* cultivado durante la noche bajo condiciones aeróbicas. Cuando la densidad celular en OD578 alcanza el valor de 1, las células se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 minutos. A continuación, las células se suspendieron en 5 ml de 17.5 g/L de medio de antibióticos no. 3, sacarosa 30 500 mM, maleinato de sodio 20 mM y MgCl₂ 20 mM pH 6 (solución reguladora de SMMP). 50 ml de 1 mg/ml de lisozima se adicionaron en solución reguladora de SMMP y la mezcla se mantuvo a 37 °C durante 60 minutos, con el fin de eliminar la pared celular; a continuación, las células se centrifugaron suavemente a 1300 rpm durante 10 minutos. Las células bacterianas se suspendieron en 5 ml de solución reguladora de SMMP fresco sin agitación, ya que los protoplastos son sensibles al estrés físico. Este lavado se repitió una vez más. Después de la suspensión, los protoplastos estaban listos para ser utilizados directamente para la transformación o ser congeladas a -80 °C en SMMP, 35 que contiene 15% de glicerol. Sin embargo, las transformaciones son mucho más eficientes cuando los protoplastos se preparan. Para la transformación, se mezclaron 500 µl de suspensión de protoplastos con 1 µg de ADN del plásmido pPT7hasAtuaD o pPT7hasAtuaDgtaBpgi; a continuación, se adicionaron 1.5 ml de PEG-P (40% p/v de PEG6000 en 1xSMM) y la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se adicionaron 5 ml de SMMP, y los tubos se 40 mezclaron suavemente por rotación.

Las bacterias se centrifugaron suavemente a 3000 rpm, durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y el sedimento casi invisible contenía las bacterias de interés. Se adicionaron 500 µl de SMMP a las bacterias, que se incubaron a continuación durante 90 minutos a 37 °C bajo agitación lenta, a un máximo de 10 rpm; a continuación, se prepararon 2.5 ml de agar superior CR5 en tubos estériles en un baño caliente a 43 °C.

45 El agar superior CR5 fue preparado por la mezcla de dos componentes:

a) 51.5 g de sacarosa, 3.25 g de MOPS y 0.33 g de NaOH en 250 ml de H₂O pH 7.3, esterilizado por filtración

b) 2.0 g de agar, 0.1 g de casaminoácidos, 5 g de extracto de levadura y 142.5 ml de H₂O.

Después de la esterilización en autoclave durante 20 minutos, los dos ingredientes, enfriados a 50 °C, se mezclaron entre sí.

50 Después del cultivo, se adicionaron 100 µl de la preparación celular divulgada anteriormente a 2.5 ml de agar superior, se mezcló suavemente por rotación con ambas manos, y se depositan sobre una placa precalentada que contiene el

antibiótico (4.5 µg/ml de cloranfenicol y 10 µg/ml de tetraciclina). La mezcla se incubó durante la noche a 37 °C; Las colonias resultantes mayor o menor, dependiendo de su acceso al aire.

Ejemplo 12: Expresión de ácido hialurónico en *B. megaterium*

- 5 Las células de *B. megaterium* transformadas se cultivaron en medio LB con tetraciclina y cloranfenicol hasta una densidad óptica a 578 nm de 0.4 a 37 °C. La inducción se llevó a cabo con la adición de 0.5% de D-xilosa (p/v), seguido de incubación a 37 °C. La densidad óptica de las bacterias se leyó cada 30 minutos hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó 1.5; en este punto las células alcanzaron el estado estacionario. Estas células, como en el caso de *E. coli*, son incapaces de producir ácido hialurónico directamente después de la inducción.

Ejemplo 13: Sistema para la selección de las células secretoras de ácido hialurónico

- 10 Para obtener células *B. megaterium* capaces de producir ácido hialurónico, se empleó el sistema de selección de placa presentado para *E. coli*, utilizando la xilosa como inductor en lugar de IPTG. A continuación, se seleccionaron las células que producen altos niveles de ácido hialurónico en la placa. Esas células sobreviven y se pueden cultivar. El sobrenadante contiene el ácido hialurónico producido (su presencia se confirmó por análisis de carbazol cuando se precipitó con dos volúmenes de etanol).

- 15 Ejemplo 14: La fermentación de las células de *B. megaterium* transformada seleccionadas en gradiente

Las células de *Bacillus megaterium* transformadas con dos genes plásmido pPT7hasAtuaD o con cuatro genes del plásmido pPT7hasAtuaDgtaBpgi, y seleccionados en gradiente de xilosa se cultivaron en un fermentador de 20 L en 5 L de medio MM ++ y glucosa o sacarosa como fuente de carbono.

Se adicionó xilosa como inductor después del inicio de la fermentación.

- 20 A continuación, algunos procesos de fermentación para la producción de HA se ilustran, dichos procesos difieren principalmente debido a:

- la fuente de partida de carbono;

- la alimentación adicionada (glucosa o sacarosa);

- 25 - la temperatura de fermentación (la temperatura se puede establecer en un intervalo desde 20 a 38 °C, preferiblemente desde 25 a 35 °C);

- tiempo de fermentación.

Medios de cultivo utilizados:

Caldo LB (Miller), pH 7

MM ++ (Medio Mínimo Bs), pH 7, que contiene por litro:

- 30 1 g de (NH₄)₂ HPO₄; 1 g de NH₄NO₃; 2.5 g de K₂HPO₄; 2.5 g de KH₂PO₄; 0.2 g de MgSO₄7H₂O; 0.01 g de FeSO₄7H₂O; 0.007 g de MnSO₄7H₂O.

Ejemplo 14a: Producción de HA que tiene un MW promedio ponderado comprendido en el intervalo de 100 - 500 KD

Se utilizó la cepa bacteriana *B. megaterium* (QM B1551), transfectada con el plásmido pPT7hasAtuaDgtaBpgi seleccionado en gradiente de xilosa al 0.5% p/v, como se describe en el Ejemplo 13,.

- 35 Proceso: se inoculó una única colonia resistente a la xilosa en 5 ml de medio LB estéril que contenía 5 mg/l de tetraciclina y el inductor. El cultivo se hizo crecer a 37 °C, con agitación a 200 rpm.

Después de 8 horas, se inocularon 50 µml de este cultivo en un matraz que contenía 50 ml del medio mencionado anteriormente (que contiene el inductor), y se hizo crecer en las mismas condiciones descritas anteriormente.

- 40 Posteriormente, pasadas 14-16 horas adicionales, se inocularon 2 ml de este cultivo en un matraz que contenía 500 ml del medio anterior, y se hicieron crecer en las mismas condiciones hasta alcanzar un D.O. ^{600nm} de 0.6-0.8.

500 ml del cultivo obtenido de este modo a continuación, se inocularon en el fermentador que contiene medio MM++, y las condiciones de fermentación que participan que mantienen el cultivo con agitación a 600 rpm, aireación con 20-24

litros de aire/min, una temperatura de 37 °C (la temperatura de fermentación se puede establecer en un intervalo entre 25 °C y 38 °C), y un pH de 6.9 a 7.1. La fuente inicial de carbono fue de 2% de sacarosa.

5 Después de 4 horas de fermentación, se adicionó un suministro de sacarosa al 2%. A las 24 horas de fermentación, se adicionó xilosa a una concentración final de 0.5%; esta inducción procedió durante 4 horas; al final, se adicionó 10% de sacarosa en las etapas.

Al final de la fermentación (130 horas), el cultivo bacteriano se descargó y se centrifugó a 7500 rpm a 8 °C, durante 20 minutos.

El caldo de fermentación obtenido de este modo, clarificado como libre del componente celular, se analizó para determinar la concentración de HA con el método de carbazol (Bitter and Muir, 1962, Anal Biochem. 4:330-334).

10 Resultados: El análisis dio como resultado una concentración de HA de 3.5 g/l.

Determinación del peso molecular MW medio ponderado:

Para su análisis se utilizó el método de la viscosidad intrínseca (como se describe en Terbojevich et al., Carbohydr. Res 1986, 363-377, incorporado en este documento por referencia).

Resultados: la muestra de HA analizada mostró un peso molecular MW medio ponderado en el intervalo de 100-300 KD.

15 Ejemplo 14b: Producción de HA que tiene un peso molecular medio ponderado comprendido en el intervalo de 1×10^6 - 2×10^6 D

Se utilizó, la cepa bacteriana *B. megaterium* (QM B1551), transfectada con los dos genes del plásmido pPT7hasAtuaD y con los cuatro genes del plásmido pPT7hasAtuaDgtaBpgi, seleccionado en gradiente de xilosa, como se describe en el Ejemplo 13,.

20 Procedimiento: para cada plásmido que se utilizó, se procesó una única colonia resistente a la xilosa como se indica en el ejemplo 14a. La fuente inicial de carbono fue sacarosa al 2%: en este ejemplo, el suministro adicional fue glucosa (ensayos experimentales adicionales mostraron que puede estar sustituido con cantidades iguales o inferiores de sacarosa). Las condiciones de fermentación fueron las mismas que las utilizadas en el ejemplo 14a con la única diferencia de la temperatura de fermentación: 25 °C.

25 Los medios de cultivo utilizados para la fermentación fueron los divulgados de acuerdo con el ejemplo 14a.

Al final del proceso (terminó después de 24 horas), se analizó el caldo de fermentación para determinar la concentración de HA con el método de carbazol.

Resultados: *B. megaterium* (QM B1551), transfectada con los dos genes del plásmido pPT7hasAtuaD: el análisis dio como resultado una concentración de HA de 2.5 g/l;

30 *B. megaterium* (QM B1551), transfectada con los cuatro genes del plásmido pPT7hasAtuaDgtaBpgi: el análisis dio como resultado una concentración de HA de 3.2 g/L;

Determinación del peso molecular MW medio ponderado:

Para su análisis se utilizó el método de la viscosidad intrínseca como se indica en el ejemplo anterior 14a.

35 Resultados: la muestra analizada HA producida por *B. megaterium* transfectada con los dos genes del plásmido mostraron un peso molecular MW medio ponderado en el intervalo de 1.3×10^6 - 1.7×10^6 D;

la muestra analizada HA producida por *B. Megaterium* transfectada con los cuatro genes del plásmido mostró un peso molecular MW medio ponderado en el intervalo de 1.6×10^6 - 2×10^6 D.

40 El sistema diseñado en *B. megaterium* es inducible, por lo que el proceso de fermentación se puede continuar mediante la estimulación de la producción de HA para obtener el peso molecular MW medio ponderado deseado; tiempos de fermentación entre 80 y 160 horas resultan en un peso molecular MW medio ponderado medio-bajo, comprendido en el intervalo entre 100-500 KD, tiempos de fermentación entre 40 y 80 horas dan lugar a un peso molecular medio ponderado en el intervalo entre 500-1000 KD, tiempos de fermentación entre 12 a 40 horas dan lugar a un peso molecular MW medio ponderado en el intervalo 1×10^6 - 3×10^6 D.

Con los experimentos y los resultados obtenidos anteriormente, el solicitante ha demostrado que ha perfeccionado un sistema de producción de HA en *B. megaterium* mediante vectores plásmidos por:

- diseño de vectores plásmidos de 2 genes (o 4 genes) para la síntesis de las enzimas necesarias para la producción de dicho polisacárido, cuyo control del gen se coloca bajo el control de un promotor fuerte T7 del bacteriófago T7;
- 5
- perfeccionamiento de un sistema de selección de estas cepas transfectadas para la producción de cepas estables, viables, replicantes y secretoras de HA;
 - creación de un sistema inducible de la producción de HA, por lo tanto, controlable tanto con el fin de obtener altas concentraciones de HA y para la producción de dicho polisacárido en diferente peso molecular MW medio ponderado.

Reivindicaciones

1. Proceso para la preparación de ácido hialurónico en *Bacillus megaterium*, que comprende las siguientes etapas:
 - (a) cultivo de células huésped bacterianas de *Bacillus megaterium* transformadas de manera estable con el sistema de la ARN polimerasa T7, bajo condiciones apropiadas para la producción de ácido hialurónico en presencia de xilosa como inductor, en donde dichas células huésped bacterianas se caracterizan por ser transformadas adicionalmente con:
 - (i) al menos un vector plásmido episomal que comprende una secuencia que codifica la hialuronano sintasa de la enzima y una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa en tándem, bajo el control del promotor T7 fuerte inducible, preferiblemente bajo el control del promotor T7 fuerte inducible del bacteriófago T7; o
 - (ii) al menos un vector plásmido episomal que comprende una secuencia que codifica para la enzima hialuronato sintasa, una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa, una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa y una secuencia que codifica para la enzima glucosa 6 fosfato isomerasa, bajo el control del promotor T7 fuerte inducible, preferiblemente bajo el control del promotor T7 fuerte inducible del bacteriófago T7;
 - (b) recuperación del ácido hialurónico del medio de cultivo,
- en donde dichas células huésped bacterianas de *Bacillus megaterium* transformadas de manera estable con el sistema de la ARN polimerasa T7 y con el vector plásmido (i) o (ii) capaz de producir ácido hialurónico de la etapa a) se pre-seleccionan en la placa en un gradiente de xilosa.
2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se adiciona el inductor xilosa en cantidades entre 0.1% y 10%, preferiblemente entre 0.5% y 1% p/v.
3. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dichas células huésped bacterianas de *Bacillus megaterium* transformadas con el sistema de la ARN polimerasa T7 pertenecen a la cepa de *B. megaterium* QM B1551 o DSM319.
4. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa (hasA) se obtiene a partir de una cepa de *Streptococcus*, preferiblemente *Streptococcus zooepidemicus*, y las secuencias que codifican para enzimas UDP-glucosa deshidrogenasa (hasB o tuaD), UDP-glucosa pirofosforilasa (gtaB) y glucosa 6 fosfato isomerasa (pgi o hasE) se obtienen a partir de *Bacillus subtilis*.
5. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en las cuales las secuencias que codifican para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa, hialuronano sintasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y glucosa 6 fosfato isomerasa incluyen una secuencia Shine-Dalgarno en dirección 5'.
6. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho vector plásmido (i) comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos como se define en la reivindicación 14.
7. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho vector plásmido (ii) comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos como se define en la reivindicación 16.
8. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, el tiempo de fermentación está comprendido en el intervalo entre 80 y 160 horas para producir HA que tiene un peso molecular medio ponderado comprendido en el intervalo de 100-500 KD.
9. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el tiempo de fermentación está comprendido en el intervalo entre 40 y 80 horas para producir HA que tiene un peso molecular medio ponderado comprendido en el intervalo de 500-1000 KD.
10. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el tiempo de fermentación está comprendido en el intervalo entre 12 y 40 horas para producir HA que tiene un peso molecular medio ponderado comprendido en el intervalo 1×10^6 - 3×10^6 D.
11. Vector plásmido que comprende un promotor T7 fuerte inducible del bacteriófago T7, unido operativamente a una secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa y una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa en tándem.

12. Vector plásmido que comprende un promotor T7 fuerte inducible del bacteriófago T7, unido operativamente a una secuencia que codifica para la enzima hialuronato sintasa, una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa, una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa y una secuencia que codifica para la enzima glucosa 6 fosfato isomerasa.
- 5 13. Vector plásmido de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, en donde dicha secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa es el gen hasA a partir de *Streptococcus zooepidemicus*, y dicha secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa es el gen tuaD a partir de *Bacillus subtilis*.
14. Vector plásmido de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende o consiste en la siguiente secuencia de nucleótidos:

CTTTTTAGGTTCTAAATCGTGTTTTTCTTGGAATTGTGCTGTTTTATCCTTTACCTTGTCTAC
AAACCCCTTAAAAACGTTTTTAAAGGCTTTTAAGCCGTCTGTACGTTTCCTTAAGGCGAAATT
AATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTTCCCGAATATTAATTAACCAAGGAGGTGA
AATGTACAATGAGAACATTAAAAAACCTCATAACTGTTGTGGCCTTTAGTATTTTTTGGGTA

CTGTTGATTTACGTCAATGTTTATCTCTTTGGTGCTAAAGGAAGCTTGTCAATTTATGGCTTT
TTGCTGATAGCTTACCTATTAGTCAAAATGTCCTTATCCTTTTTTTTACAAGCCATTTAAGGGA
AGGGCTGGGCAATATAAGGTTGCAGCCATTATTCCCTCTTATAACGAAGATGCTGAGTCATT
GCTAGAGACCTTAAAAAGTGTTTCAGCAGCAAACCTATCCCCTAGCAGAAATTTATGTTGTTG
ACGATGGAAGTGCTGATGAGACAGGTATTAAGCGCATTGAAGACTATGTGCGTGACACTGG
TGACCTATCAAGCAATGTCATTGTTACCGGTCAGAAAAAATCAAGGAAAGCGTCATGCAC
AGGCCTGGGCCTTTGAAAGATCAGACGCTGATGTCTTTTTTGACCGTTGACTCAGATACTTAT
ATCTACCCTGATGCTTTAGAGGAGTTGTTAAAAACCTTTAATGACCCAACCTGTTTTTGCTGC
GACGGGTCACCTTAATGTCAGAAATAGACAAACCAATCTCTTAACACGCTTGACAGATATTC
GCTATGATAATGCTTTTTGGCGTTGAACGAGCTGCCAATCCGTTACAGGTAATATTCTCGTT
TGCTCAGGCCCGCTTAGCGTTTTACAGACGCGAGGTGGTTGTTCTAACATAGATAGATACAT
CAACCAGACCTTCCTGGGTATTCTGTAAAGTATCGGTGATGACAGGTGCTTGACCAACTATG
CAACTGATTTAGGAAAGACTGTTTATCAATCCACTGCTAAATGTATTACAGATGTTCTCTGAC
AAGATGTCTACTTACTTGAAGCAGCAAACCGCTGGAACAAGTCCTTCTTTAGAGAGTCCAT
TATTTCTGTTAAGAAAATCATGAACAATCCTTTTTGTAGCCCTATGGACCATACTTGAGGTGT
CTATGTTTATGATGCTTGTATTCTGTGGTGGATTTCTTTGTAGGCAATGTCAGAGAATTT
GATTGGCTCAGGGTTTTGGCCTTCTGGTGATTATCTTCATTGTTGCTCTTTGTGTAATATT
CACTATATGCTTAAGCACCCGCTGTCTTCTTGTATCTCCGTTTTATGGGGTACTGCTTTGT
TTGTCTACAGCCCTTGAAATTGTATTCTTTTTACTATTAGAAATGCTGACTGGGGAACAC
GTAAAAAATTATTATAATCTAGAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG
AAAAAATAGCTGTCATTGGAACAGGTTATGTAGGACTCGTATCAGGCACCTTGCTTTGCGGA
GATCGGCAATAAAGTTGTTTGCTGTGATATCGATGAATCAAAAATCAGAAGCCTGAAAAATG
GGGTAATCCAATCTATGAACCAGGGCTTGCAGACTTAGTTGAAAAAATGTGCTGGATCA
GCGCCTGACCTTTACGAACGATATCCCGTCTGCCATTGGGCCTCAGATATTATTTATATTG
CAGTCGGAACGCCTATGTCCAAAACAGGTGAAGCTGATTTAACGTACGTCAAAGCGGCGGC

GAAAAAATCGGTGAGCATCTTAACGGCTACAAAAGTGATCGTAAATAAAAAGCACAGTCCCG
GTTGGAACAGGGAAACTGGTGCAATCTATCGTTCAAAAAGCCTCAAAGGGGAGATACTCAT
TTGATGTTGTATCTAACCTGAATTCCTTCGGGAAGGGTCAGCGATTCATGACACGATGAAT
ATGGAGCGTGCCGTGATTGGTTCAACAAGTCATAAAGCCGCTGCCATCATTGAGGAACTTCA
TCAGCCATTCCATGCTCCTGTCAATTAACAACCTAGAAAAGTGCAGAAATGATTAATAACG
CCGCGAATGCATTTCTGGCGACAAAGATTTCTTTATCAACGATATCGCAAACATTTGTGAG
CGAGTCGGCGCAGACGTTTCAAAGTTGCTGATGGTGTGGTCTTGACAGCCGTATCGGCA
GAAAGTTCCTTAAAGCTGGTATTGGATTCCGGCGTTTCATGTTTTCCAAAGGATACAACCGCG
CTGCTTCAAATCGCAAATCGGCAGGCTATCCATTCAAGCTCATCGAAGCTGTCATTGAAAC
GAACGAAAAGCAGCGTGTTCATATTGTAGATAAACTTTTTGACTGTTATGGGAAGCGTCAA
GGGAGAACCATTTAGTCCTGGGATTAGCCTTCAAACCGAATACGAACGATGTGAGATCCG
CTCCAGCGCTTGATATTATCCCAATGCTGCAGCAGCTGGGCGCCCATGTAAAAGCATAACGAT
CCGATTGCTATTCTGAAGCTTCAGCGATCCTTGGCGAACAGGTCGAGTATTACACAGATGT
GTATGCTGCGATGGAAGACACTGATGCATGCCTGATTTTAACGGATTGGCCGGAAGTGAAA
GAAATGGAGCTTGTA AAAAGTGAAAACCCTCTTAAAACAGCCAGTCATCATTGACGGCAGAA
ATTTATTTTCACTTGAAGAGATGCAGGCAGCCGGATAACATTTATCACTCTATCGGCCGTCC
GCTGTTCCGGGAACGGAACCCTCTGACAAGTATTTCCGGGCTTGCCGCTTGAAGAATTGG
CTAAAGACTTGGGAAGCGTCAATTTATAAGGATCCGGCCGCATGCCGGCTAATCGCGACCG
GTAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTAAAAGGAG
GAACTATATCCGGTCCAAGAATTGGAGCCAATCAATTCTTGCGGAGAACTGTGAATGCGCAA
ACCAACCCTTGGCAGAACATATCCATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGCACGCGGCGCAT
CTCGGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAAT
CGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTTCCC
CTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCC
TTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGT

GTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGC
 GCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGC
 AGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTG
 AAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGA
 AGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAAACCACCGCTGGT
 AGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAG
 ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATT
 TTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTT
 TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTG
 AGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGT
 AGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGA
 CCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGC
 AGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAG
 AGTAAGTAGTTCCGCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGG
 TGTCACGCTCGTCGTTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGCGAGTT
 ACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAG
 AAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTG
 TCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAA
 TAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCAC
 ATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGG
 ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGC
 ATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAA
 AGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATGA
 AGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATAACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA
 ACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTA

TTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTC
 CTGTTATAAAAAAAGGATCAATTTTGAAGTCTCTCCCAAAGTTGATCCCTTAACGATTTAGA
 AATCCCTTTGAGAATGTTTATATACATTCAAGGTAACCAGCCAATAATGACAATGATTCTCT
 GAAAAAAGTAATAACAAATTAAGTATAACAGATAAGTTGACTGATCAACTTCCATAGGTAACAA
 CCTTTGATCAAGTAAGGGTATGGATAATAAACCACTACAATTGCAATACCTGTTCCCTCTG
 ATAAAAAGCTGGTAAAGTTAAGCAAACCTCATTCCAGCACCAGCTTCTGCTGTTTCAAGCTA
 CTTGAAACAATTGTTGATATAACTGTTTTGGTGAACGAAAGCCCACCTAAAACAATAACGAT
 TATAATTGTCATGAACCATGATGTTGTTTCTAAAAGAAAGGAAGCAGTTAAAAAGCTAACAG
 AAAGAAATGTAAGTCCGATGTTTAAACACGTATAAAGGACCTCTTCTATCAACAAGTATCCCA
 CCAATGTAGCCGAAAATAATGACACTCATTGTTCCAGGGAAAATAATTACACTTCCGATTTCC
 GGCAGTACTTAGCTGGTGAACATCTTTCATCATATAAGGAACCATAGAGACAAAACCTGCTA
 CTGTTCCAAATATAATTCCCCCACAAGAACTCCAATCATAAAAGGTATATTTTTCCCTAATC
 CGGGATCAACAAAAGGATCTGTTACTTTCTGATATGTTTTACAAATATCAGGAATGACAGC
 ACGCTAACGATAAGAAAAGAAATGCTATATGATGTTGTAAACAACATAAAAAATACAATGCC
 TACAGACATTAGTATAATTCTTTGATATCAAAATGACCTTTTATCCTTACTTCTTTCTTTAAT
 AATTTCATAAGAAACGGAACAGTGATAATTGTTATCATAGGAATGAGTAGAAGATAGGACC
 AATGAATATAATGGGCTATCATTCCACCAATCGCTGGACCGACTCCTTCTCCCATGGCTACT
 ATCGATCCAATAAGACCAAATGCTTTACCCCTATTTTCTTTGGAATATAGCGCGCAACTACA
 ACCATTACGAGTGTGCTGGAAATGCAGCTGCACCAGCCCCTTGAATAAAAACGAGCCATAATAAG
 TAAGGAAAAGAAAGAAATGGCCAACAAACCAATTACCGACCCGAAACAATTTATTATAATTC
 CAAATAGGAGTAACCTTTTGTATGCCTAATTGATCAGATAGCTTTCCATATACAGCTGTTCCA
 ATGGAAAAGGTTAACATAAAGGCTGTGTTACCCAGTTTGTACTCGCAGGTGGTTTATTTAAA
 ATCATTGCAATATCAGGTAATGAGACGTTCAAACCATTTTCAATTAATACGCTAAAAAAG
 ATAAAATGCAAAGCCAAATTTAAAATTTGGTTGTGTCGTAAATTCGATTGGAATAGGATGTA
 TTCACATTTACCCCTCCAATAATGAGGGCAGACGTAGTTTATAGGGTTAATGATACGCTTCC

CTCTTTTAATTGAACCCTGTTACATTCATTACACTTCATAATTAATTCCTCCTAAACTTGATTA
AAACATTTTACCACATATAAACTAAGTTTTAAATTCAGTATTCATCACTTATAACAACATAT
GGCCCGTTTGTTGAACTACTCTTTAATAAAAATAATTTTTCCGTTCCCAATTCACATTGCAAT
AATAGAAAATCCATCTTCATCGGCTTTTTTCGTATCATCTGTATGAATCAAATCGCCTTCTTC
TGTGTCATCAAGGTTTAATTTTTTATGTATTTCTTTTAACAAACCACCATAGGAGATTAACCT
TTTACGGTGTAACCTTCTCCAAATCAGACAAACGTTTTCAAATTCTTTTCTTCATCATCGGT
CATAAAATCCGTATCCTTTACAGGATATTTTGCAGTTTCGTCAATTGCCGATTGTATATCCGA
TTTTATTTTATTTTTTCGGTTCGAATCATTTGAACTTTTACATTTGGATCATAGTCTAATTTTAT
TGCCTTTTTCCAAAATTGAATCCATTGTTTTTGATTACAGTAGTTTTCTGTATTCTTAAAATA
AGTTGGTTCCACACATACCAATACATGCATGTGCTGATTATAAGAATTATCTTTATTTATTTAT
TGTCACTTCCGTTGCACGCATAAAACCAACAAGATTTTTATTAATTTTTTTATATTGCATCAT
TCGGCGAAATCCTTGAGCCATATCTGACAAACTCTTATTTAATTCTTCGCCATCATAAACATT
TTTAACTGTTAATGTGAGAAACAACCAACGAAGTGTGGCTTTTGTTAATAACTTCAGCAA
CAACCTTTTGTGACTGAATGCCATGTTTCATTGCTCTCCTCCAGTTGCACATTGGACAAAGCC
TGGATTTACAAAACCACACTCGATACAACTTTCTTTTCGCCTGTTTCACGATTTTGTTTATACT
CTAATATTTTCAGCACAATCTTTTACTCTTTCAGCCTTTTTAAATTCAAGAATATGCAGAAGTT
CAAAGTAATCAACATTAGCGATTTTCTTTTCTCTCCATGGTCTCACTTTTCCACTTTTTGTCTT
GTCCACTAAAACCCTTGATTTTTTTCATCTGAATAAATGCTACTATTAGGACACATAATATTA
AGAAACCCCATCTATTTAGTTATTTGTTTGGTCACTTATAACTTTAACAGATGGGGTTTTTC
TGTGCAACCAATTTTAAGGGTTTTCAATACTTTAAAACACATACATACCAACACTTCAACGCA
CCTTTCAGCAACTAAAATAAAAATGACGTTATTTCTATATGTATCAAGATAAGAAAGAACAA
GTTCAAACCATCAAAAAAAGACACCTTTTCAGGTGCTTTTTTTATTTTATAAACTCATCCC
TGATCTCGACTTCGTTCTTTTTTACCTCTCGGTTATGAGTTAGTTCAAATTCGTT

SEQ ID NO:1

5 15. Vector plásmido de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicha secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa es el gen hasA a partir de *Streptococcus zooepidemicus*, dicha secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa es el gen tuaD a partir de *Bacillus subtilis*, dicha secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa es el gen gtaB a partir de *Bacillus subtilis* y dicha secuencia que codifica para la enzima glucosa 6 fosfato isomerasa es el gen pgi a partir de *Bacillus subtilis*.

16. Vector plásmido de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende o consiste en la siguiente secuencia de nucleótidos:

CTTTTTAGGTTCTAAATCGTGTTTTTCTTGGAATTGTGCTGTTTTATCCTTTACCTTGTC
 TACAAACCCCTTAAAAACGTTTTTAAAGGCTTTTAAGCCGTCTGTACGTTCCCTTAAGGCG
 AAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTTCCGAATATTAATTAACCAAG
 GAGGTGAAATGTACAATGAGAACATTAAAAAACCTCATAACTGTTGTGGCCTTTAGTATT
 TTTTGGGTA CTGTTGATTTACGTCAATGTTTATCTCTTTGGTGCTAAAGGAAGCTTGTC A
 ATTTATGGCTTTTTGCTGATAGCTTACCTATTAGTCAAAAATGTCCTTATCCTTTTTTTTAC
 AAGCCATTTAAGGGAAGGGCTGGGCAATATAAGGTTGCAGCCATTATTCCCTCTTATAAC
 GAAGATGCTGAGTCATTGCTAGAGACCTTAAAAAGTGTTTCAGCAGCAAACCTATCCCCTA
 GCAGAAATTTATGTTGTTGACGATGGAAGTGCTGATGAGACAGGTATTAAGCGCATTGAA
 GACTATGTGCGTGACACTGGTGACCTATCAAGCAATGTCATTGTTACCGGTCAGAAAAA
 AATCAAGGAAAGCGTCATGCACAGGCCTGGGCCTTTGAAAGATCAGACGCTGATGTCTTT
 TTGACCGTTGACTCAGATACTTATATCTACCCTGATGCTTTAGAGGAGTTGTTAAAAACC
 TTTAATGACCCA ACTGTTTTTGGCTGCGACGGGTCACCTTAATGTCAGAAATAGACAAAACC
 AATCTCTTAACACGCTTGACAGATATTGCTATGATAATGCTTTTTGGCGTTGAACGAGCT
 GCCCAATCCGTTACAGGTAATATTCTCGTTTGCTCAGGCCCGCTTAGCGTTTACAGACGC
 GAGGTGGTTGTTCTAACATAGATAGATACATCAACCAGACCTTCCTGGGTATTCTTGTA
 AGTATCGGTGATGACAGGTGCTTGACCAACTATGCAACTGATTTAGGAAAGACTGTTTAT

CAATCCACTGCTAAATGTATTACAGATGTTCCCTGACAAGATGTCTACTTACTTGAAGCAG
 CAAAACCGCTGGAACAAGTCCTTCTTTAGAGAGTCCATTATTTCTGTTAAGAAAATCATG
 AACAATCCTTTTGTAGCCCTATGGACCATACTTGAGGTGTCTATGTTTATGATGCTTGTT
 TATTCTGTGGTGGATTTCTTTGTAGGCAATGTCAGAGAATTTGATTGGCTCAGGGTTTTG
 GCCTTTCTGGTGATTATCTTCATTGTTGCTCTTTGTCGTAATATTTACTATATGCTTAAG
 CACCCGCTGTCCCTTCTTGTATCTCCGTTTTATGGGGTACTGCTTTGTTTGCCTACAGC
 CCTTGAAATTGTATTTCTTTTTACTATTAGAAATGCTGACTGGGGAACACGTAAAAAAT
 TATTATAATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAAAA
 TAGCTGTCATTGGAACAGGTTATGTAGGACTCGTATCAGGCACTTGCTTTGCGGAGATCG
 GCAATAAAGTTGTTTGTGTGATATCGATGAATCAAAAATCAGAAGCCTGAAAAATGGGG
 TAATCCCAATCTATGAACCAGGGCTTGCAGACTTAGTTGAAAAAATGTGCTGGATCAGC
 GCCTGACCTTTACGAACGATATCCCGTCTGCCATTCGGGCCTCAGATATTATTTATATTG
 CAGTCGGAACGCCTATGTCCAAAACAGGTGAAGCTGATTTAACGTACGTCAAAGCGGCGG
 CGAAAACAATCGGTGAGCATCTTAACGGCTACAAAGTGATCGTAAATAAAAGCACAGTCC
 CGGTTGGAACAGGGAAACTGGTGCAATCTATCGTTCAAAAAGCCTCAAAGGGGAGATACT
 CATTTGATGTTGTATCTAACCCCTGAATTCCTTCGGGAAGGGTCAGCGATTCATGACACGA
 TGAATATGGAGCGTGCCGTGATTGGTTCAACAAGTCATAAAGCCGCTGCCATCATTGAGG
 AACTTCATCAGCCATCCATGCTCCTGTCATTTAAAACAAACCTAGAAAGTGCAGAAATGA
 TTAAATACGCCGGAATGCATTTCTGGCGACAAAGATTTCTTTATCAACGATATCGCAA
 ACATTTGTGAGCGAGTCGGCGCAGACGTTTCAAAGTTGCTGATGGTGTGGTCTTGACA
 GCCGTATCGGCAGAAAGTTCTTAAAGCTGGTATIGGATTCGGCGGTTTCATGTTTTCCAA
 AGGATAACAACCGCGCTGCTTCAAATCGCAAATCGGCAGGCTATCCATTCAAGCTCATCG
 AAGCTGTCATTGAAACGAACGAAAAGCAGCGTGTTCATATTGTAGATAAACTTTTGACTG
 TTATGGGAAGCGTCAAAGGGAGAACCATTTTCAGTCCTGGGATTAGCCTTCAAACCGAATA
 CGAACGATGTGAGATCCGCTCCAGCGCTTGATATTATCCCAATGCTGCAGCAGCTGGGCG

CCCATGTAAAAGCATAACGATCCGATTGCTATTCCTGAAGCTTCAGCGATCCTTGGCGAAC
AGGTCGAGTATTACACAGATGTGTATGCTGCGATGGAAGACACTGATGCATGCCTGATTT
TAACGGATTGGCCGGAAGTGAAAGAAATGGAGCTTGTAAGAGTGAAAACCCTCTTAAAC
AGCCAGTCATCATTGACGGCAGAAATTTATTTCACTTGAAGAGATGCAGGCAGCCGGAT
ACATTTATCACTCTATCGGCCGTCCCGCTGTTTCGGGGAACGGAACCCTCTGACAAGTATT
TTCCGGGCTTGCCGCTTGAAGAATTGGCTAAAGACTTGGGAAGCGTCAATTTATAAGCTA
GAATAATAAGGAAGGTGCCTTTTAAATGAAAAAGTACGTAAAGCCATAATTCCAGCAGC
AGGCTTAGGAACACGTTTTCTTCCGGCTACGAAAGCAATGCCGAAAGAAATGCTTCCTAT
CGTTGATAAACCTACCATTCAATACATAATTGAAGAAGCTGTTGAAGCCGGTATTGAAGA
TATTATTATCGTAACAGGAAAAAGCAAGCGTGCATTGAGGATCATTTTGATTACTCTCC
TGAGCTTGAAAGAAACCTAGAAGAAAAAGGAAAAACTGAGCTGCTTGAAAAAGTGAAAA
GGCTTCTAACCTGGCTGACATTCATATATCCGCCAAAAAGAACCTAAAGGTCTCGGACA
TGCTGTCTGGTGCACGCAACTTTATCGGCGATGAGCCGTTTTCGGTACTGCTTGGTGA
CGATATTGTTTCAGGCTGAAACTCCAGGGTTGCGCCAATTAATGGATGAATATGAAAAAC
ACTTTCTTCTATTATCGGTGTTTCAGCAGGTGCCCGAAGAAGAAACACACCGCTACGGCAT
TATTGACCCGCTGACAAGTGAAGGCCGCGTTATCAGGTGAAAAACTTCGTTGAAAAACC
GCCTAAAGGCACAGCACCTTCTAATCTTGCCATCTTAGGCCGTTACGTATTCACGCCTGA
GATCTTCATGTATTTAGAAGAGCAGCAGGTTGGCGCCGGCGGAGAAATTCAGCTCACAGA
CGCCATTCAAAGCTGAATGAAATTCAAAGAGTGTTTGCTTACGATTTTGAAGGCAAGCG
TTATGATGTTGGTGAAGGCTCGGCTTTATCACAACAACCTTTGAATTTGCGATGCAGGA
TAAAGAGCTTCGCGATCAGCTCGTTCCATTTATGGAAGGTTTACTAAACAAAGAAGAAAT
CTAAGCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACATATGACGCATGTACG
CTTGACTACTCCAAAAGCGTTGACTTTCTTTCCAACGGAACATGAACTTACATACCTGCG
GGACTTTGTAAAAACAGCACACCATAATATCCATGAGAAAACAGGCGCGGGCAGCGATTT
TCTAGGCTGGGTGGACCTCCCTGAACATTATGATAAAGAAGAATTCGCGCGCATCCAAA

AAGCGCGGAAAAAATCCAATCTGACTCTGATGTCTTGCTTGTTGTTCGGCATCGGCGGTTT
 TTATCTTGAGCGCGGGCAGCGATTGAAGCGCTGAATCACGCGTTTTATAACACTTTGCC
 AAAAGCCAAACGCGGCAATCCGCAAGTCATTTTTAACTTCTCTATTAATGTGATTTCTAA
 ATCAGGTACGACAACCTGAACCTGCAATCGCTTTCCGTATTTCCGCAAGCTTCTTGAAGA
 GAAATACGGTAAAGAAGAAGCGAAAAGCGCGGATTTATGCAACAACCTGATAAAGAGCGCGG
 CGCATTAAAAACGCTTTCTAACGAAGAAGGCTTTGAATCATTTCGTAATTCCTGACGATGT
 CGGCGGCCGTTATTCAGTTTTAACAGCTGTAGGTCTCTTGCCGATTGCTGTCAGCGGCCGT
 CAACATTGACGACATGATGAAAGGCGCCCTGGATGCGAGCAAAGATTTTGCAACATCTGA
 ACTGGAAGATAACCCAGCATAACCAATATGCGGTTGTTTCGCAATGTCCTTTATAATAAGGG
 CAAAACAATTGAAATGCTCATCAACTACGAACCGGCGTTCAATACTTTGCGGAATGGTG
 GAAGCAGCTGTTCCGAGAAAAGCGAAGGGAAAGATGAGAAGGGCATTATCCTTCTTCAGC
 GAACTATTCAACAGACCTTCATTCTTTAGGCCAGTATGTACAAGAAGGCCGCAGAGATTT
 ATTCGAAACGGTCTGAAACGTAGAGAAGCCTAAACATGAACTGACAATTGAGGAAGCGGA
 TAACGATCTTGACGGCTTGAACCTATTTAGCCGGTAAAACTGTTGATTTTCGTTAACAAAA
 AGCATTCCAAGGTACAATGCTTGCCATACAGACGGAAATGTTCCGAACTTAATCGTTAA
 CATTCTGAGCTGAATGCATATACTTTTGGATACCTTGTATATTTCTTCGAAAAAGCCTG
 CGCGATGAGCGGTTACCTCCTTGGCGTCAATCCGTTTGACCAGCCTGGTGTAGAAGCGTA
 TAAAGTCAATATGTTTTCGTTACTCGGCAAACCTGGCTTTGAAGAGAAAAAGCAGAGCT
 TGAAAAACGTCTGGAAGATTATAAATGAGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCG
 GGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGGTACCGGCCGCATGCCGGCTAATCGCGAC
 CGGTTAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTAAA
 GGAGGAACTATATCCGGTCCAAGAATTGGAGCCAATCAATTCTTGCGGAGAACTGTGAAT
 GCGCAAACCAACCCCTTGGCAGAACATATCCATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGCACG
 CGGCGCATCTCGGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCA
 TCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCA

GGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCGCGCTTACCGG
ATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAG
GTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGT
TCAGCCCAGCCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACA
CGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG
CGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATT
TGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATC
CGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCG
CAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG
GAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTA
GATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTG
GTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCG
TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACC
ATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATC
AGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGC
CTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAG
TTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTAT
GGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTG
CAAAAAGCGGTTAGTCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGT
GTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAG
ATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCG
ACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTT
AAAAGTGCTCATCATTGGAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCT
GTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTCAGCATCTTTTAC
TTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAAT

AAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCAT
TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACA
AATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTAT
TATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATT
CCTGTTATAAAAAAAGGATCAATTTTGAAGTCTCTCCAAAGTTGATCCCTTAACGATTT
AGAAATCCCTTTGAGAATGTTTATATACATTCAAGGTAACCAGCCAATAATGACAATGA
TTCCTGAAAAAAGTAATAACAAATTACTATACAGATAAGTTGACTGATCAACTTCCATAG
GTAACAACCTTTGATCAAGTAAGGGTATGGATAATAAACACCTACAATTGCAATACCTG
TCCCTCTGATAAAAAGCTGGTAAAGTTAAGCAAACTCATTCCAGCACCAGCTTCTGCT
GTTTCAAGCTACTTGAAACAATTGTTGATATAACTGTTTTGGTGAACGAAAGCCCACCTA
AAACAAATACGATTATAATTGTCATGAACCATGATGTTGTTTCTAAAAGAAAGGAAGCAG
TTAAAAGCTAACAGAAAGAAATGTAAGTCCGATGTTTAAACACGTATAAAGGACCTCTTC
TATCAACAAGTATCCCACCAATGTAGCCGAAAATAATGACACTCATTGTTCCAGGGAAAA
TAATTACACTTCCGATTTCCGGCAGTACTTAGCTGGTGAACATCTTTCATCATATAAGGAA
CCATAGAGACAAACCCTGCTACTGTTCCAAATATAATTCCCCACAAAGAACTCCAATCA
TAAAAGGTATATTTTTCCCTAATCCGGGATCAACAAAAGGATCTGTTACTTTCCTGATAT
GTTTTACAAATATCAGGAATGACAGCACGCTAACGATAAGAAAAGAAATGCTATATGATG
TTGTAAACAACATAAAAAATACAATGCCTACAGACATTAGTATAAATTCCTTTGATATCAA
AATGACCTTTTATCCTTACTTCTTTCTTTAATAATTTCATAAGAAACGGAACAGTGATAA
TTGTTATCATAGGAATGAGTAGAAGATAGGACCAATGAATATAATGGGCTATCATTCCAC
CAATCGCTGGACCGACTCCTTCTCCCATGGCTACTATCGATCCAATAAGACCAAATGCTT
TACCCCTATTTTCTTTGGAATATAGCGCGCAACTACAACCATTACGAGTGCTGGAAATG
CAGCTGCACCAGCCCCTTGAATAAAACGAGCCATAATAAGTAAGGAAAAGAAAGAATGGC
CAACAAACCCAATTACCGACCCGAAACAATTTATTATAATTTCAAATAGGAGTAACCTTT
TGATGCCTAATTGATCAGATAGCTTTCCATATACAGCTGTTCCAATGGAAAAGGTTAACA

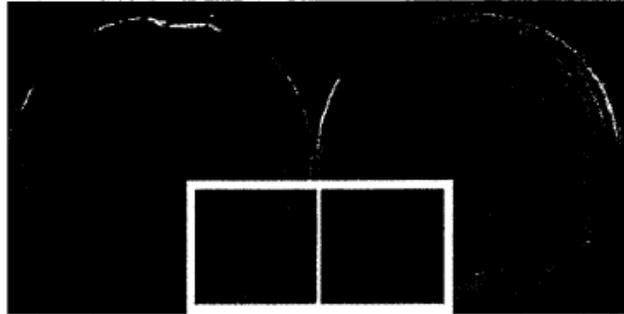
TAAAGGCTGTGTTACCCAGTTTGTACTCGCAGGTGGTTTATTA AAAATCATTGCAATAT
CAGGTAATGAGACGTTCAAACCATTTCAATTAATACGCTAAAAAAGATAAAATGCAAA
GCCAAATTA AAAATTTGGTTGTGTCGTAAATTCGATTGTGAATAGGATGTATTCACATTC
ACCTCCAATAATGAGGGCAGACGTAGTTTATAGGGTTAATGATACGCTTCCCTCTTTTA
ATTGAACCCTGTTACATTCATTACACTTCATAATTAATTCCTCCTAAACTTGATTAAAAC
ATTTTACCACATATAAACTAAGTTTTAAATTCAGTATTTTCATCACTTATAACAATATG
GCCCCTTTGTGAACTACTCTTTAATAAAAATAATTTTTCCGTTCCCAATCCACATTGCA
ATAATAGAAAATCCATCTTCATCGGCTTTTTTCGTCATCATCTGTATGAATCAAATCGCCT
TCTTCTGTGTCATCAAGGTTTAATTTTTTATGTATTTCTTTTAACAAACCACCATAGGAG
ATTAACCTTTTACGGTGTAACCTTCCTCCAAATCAGACAAACGTTTCAAATTCTTTTTCT
TCATCATCGGTCATAAAATCCGTATCCTTTACAGGATATTTGCAGTTTCGTCAATTGCC
GATTGTATATCCGATTTATATTTATTTTTCGGTCGAATCATTGAACTTTTACATTTGGA
TCATAGTCTAATTTCAATTGCCTTTTTCCAAAATTGAATCCATTGTTTTTGATTCACGTAG
TTTTCTGTATTCCTAAAATAAGTTGGTTCCACACATACCAATACATGCATGTGCTGATTA
TAAGAATTATCTTTATTATTTATTGTCACTTCCGTTGCACGCATAAAACCAACAAGATTT
TTATTAATTTTTTATATTGCATCATTCCGGCGAAATCCTTGAGCCATATCTGACAAACTC
TTATTTAATTCCTCGCCATCATAAACATTTTTAACTGTTAATGTGAGAAACAACCAACGA
ACTGTTGGCTTTTTGTTAATAACTTCAGCAACAACCTTTTTGTGACTGAATGCCATGTTTC
ATTGCTCTCCTCCAGTTGCACATTGGACAAAGCCTGGATTTACAAAACCACACTCGATAC
AACTTTCTTTGCCTGTTTTACGATTTTGTTTATACTCTAATATTTTCAGCACAACTTTTT
ACTCTTTCAGCCTTTTTAAATTC AAGAATATGCAGAAGTTCAAAGTAATCAACATTAGCG
ATTTTCTTTTTCTCTCCATGGTCTCACTTTTCCACTTTTTGTCTTGTCCACTAAAACCTT
GATTTTTCATCTGAATAAATGCTACTATTAGGACACATAATATTA AAAAGAAACCCCATC
TATTTAGTTATTTGTTTGGTCACTTATAACTTTAACAGATGGGGTTTTTCTGTGCAACCA
ATTTTAAGGGTTTTCAATACTTTAAAACACATACATACCAACACTTCAACGCACCTTTCA

GCAACTAAAATAAAAATGACGTTATTTCTATATGTATCAAGATAAGAAAGAACAAGTTCA
AAACCATCAAAAAAAGACACCTTTTCAGGTGCTTTTTTTTATTTTATAAACTCATTCCCTG
ATCTCGACTTCGTTCTTTTTTTACCTCTCGGTTATGAGTTAGTTCAAATTCGTT

SEQ ID NO:2

17. Vector plásmido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-16, en donde la secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa, hialuronano sintasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y glucosa 6 fosfato isomerasa comprende una secuencia Shine-Dalgarno en dirección 5'.
- 5 18. Uso de al menos un vector plásmido como se define de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-17 para la transformación de una célula bacteriana huésped de *Bacillus megaterium* previamente transformado de manera estable con el sistema de la ARN polimerasa T7 para la producción de ácido hialurónico por estas células mediante inducción con xilosa, después de la selección en placa en el gradiente de xilosa.
- 10 19. Célula bacteriana recombinante huésped que es *Bacillus megaterium* previamente transformada de manera estable con el sistema de la ARN polimerasa T7, que comprende al menos un vector plásmido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11-17.
20. Uso de las células bacterianas huésped como se define en la reivindicación 19, para la producción de ácido hialurónico por inducción con xilosa, después de la selección en placa en un gradiente de xilosa.
- 15 21. Método para la obtención de células bacterianas huésped recombinantes, como se define de acuerdo con la reivindicación 19, que son capaces de producir altos niveles de ácido hialurónico, que comprende la selección en placa sobre un gradiente de xilosa.

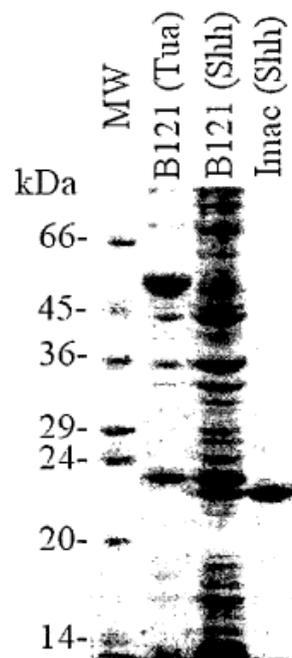
Expresión de HAS1 y TUAD en E. coli TOP-10



Células que incorporan el plásmido HT01 son más grandes con BS5 (dificultad para crecer)

(Células que incorporan BS5 son más amarillas que las células madre)

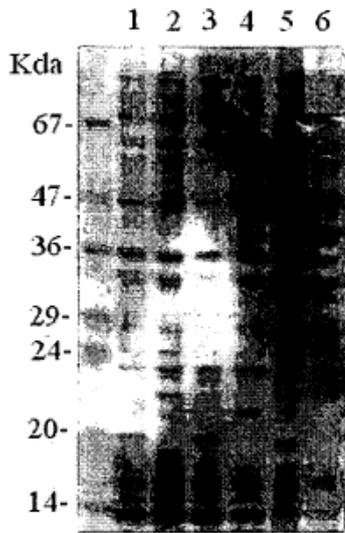
Fig. 1



Expresión de TUAD en E. coli BL21 DE3

Fig. 2

Expresión constitutiva de hialuronano sintasa (Streptococcus) en *E. coli*



equisimilis. La proteína codificada designada seHAS tiene 417 aminoácidos de longitud (peso molecular calculado 47,778, PI calculado 9.1) y es el miembro más pequeño de la familia HAS identificado hasta el momento; la enzima migra anómalamente rápido en la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (aproximadamente 42000 Da). La proteína seHAS muestra no sim-

Fig. 3

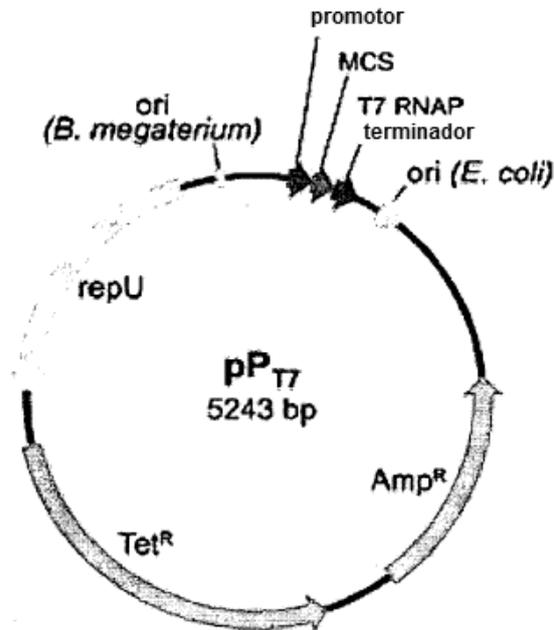


Fig. 4

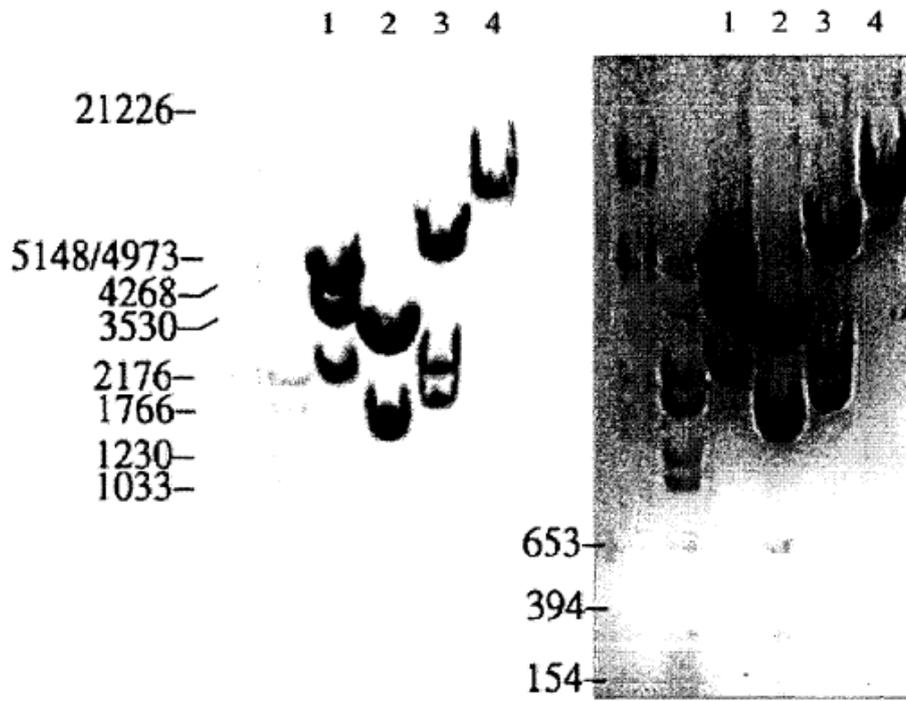


Fig. 5

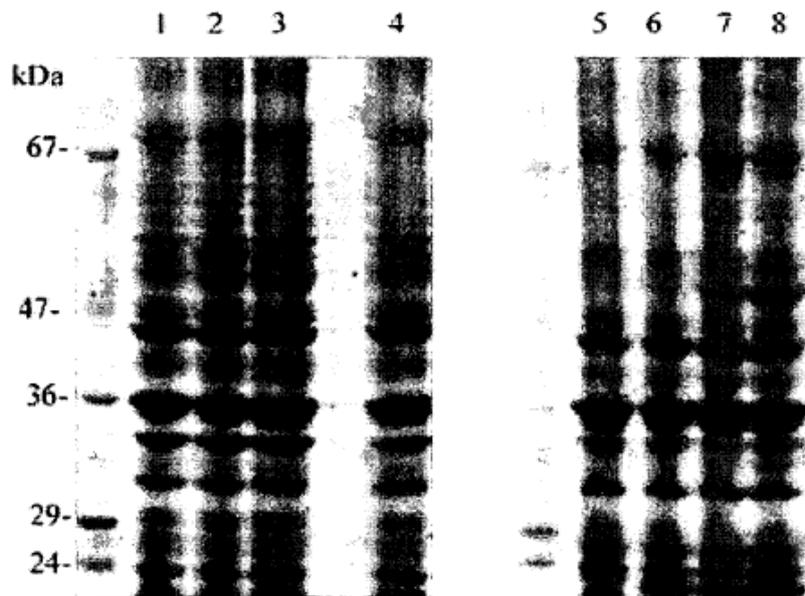


Fig. 6

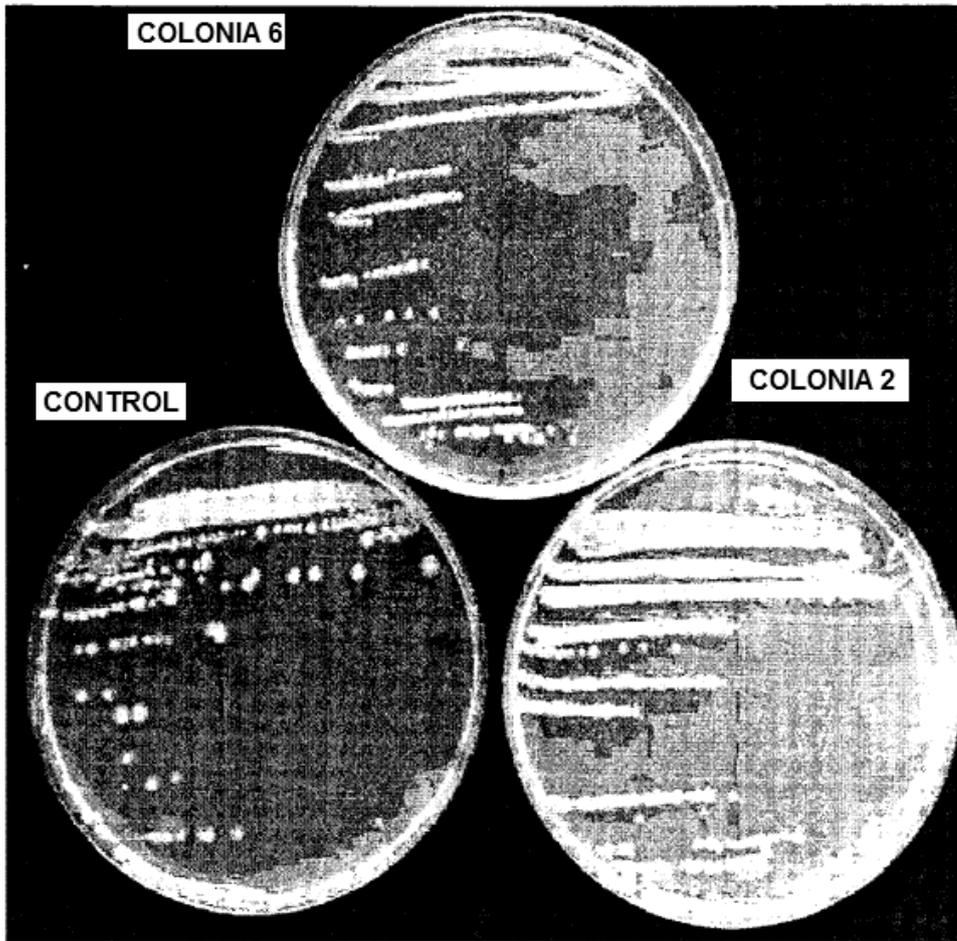


Fig. 7

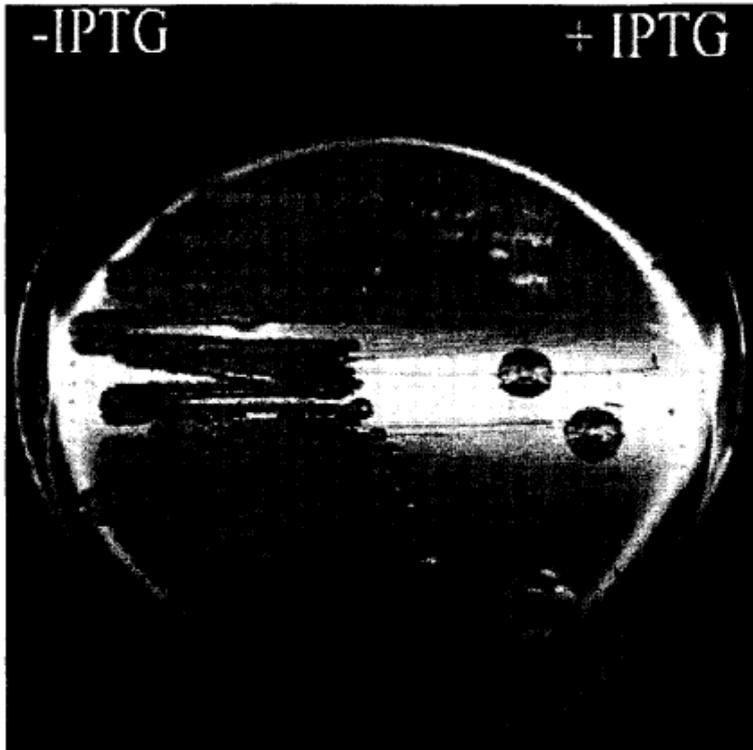


Fig. 8

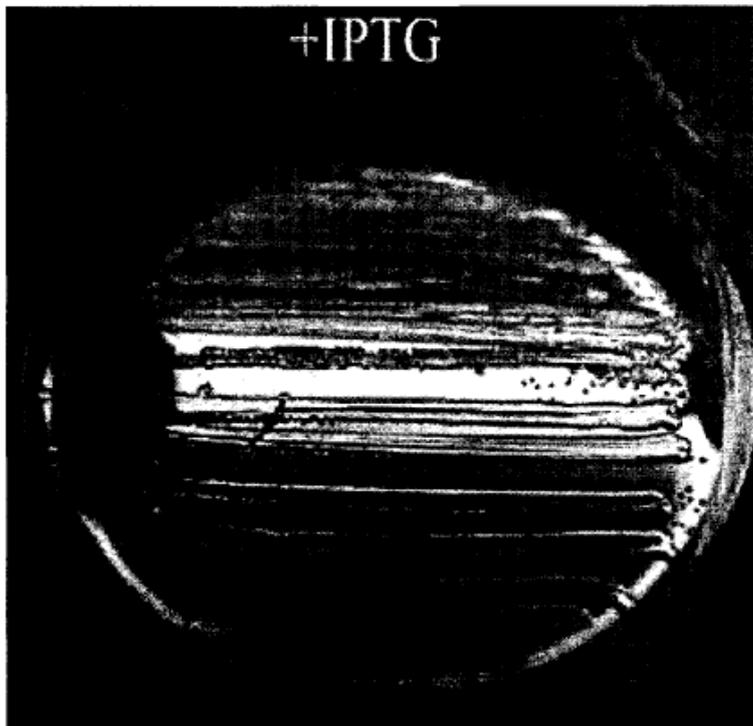


Fig. 9

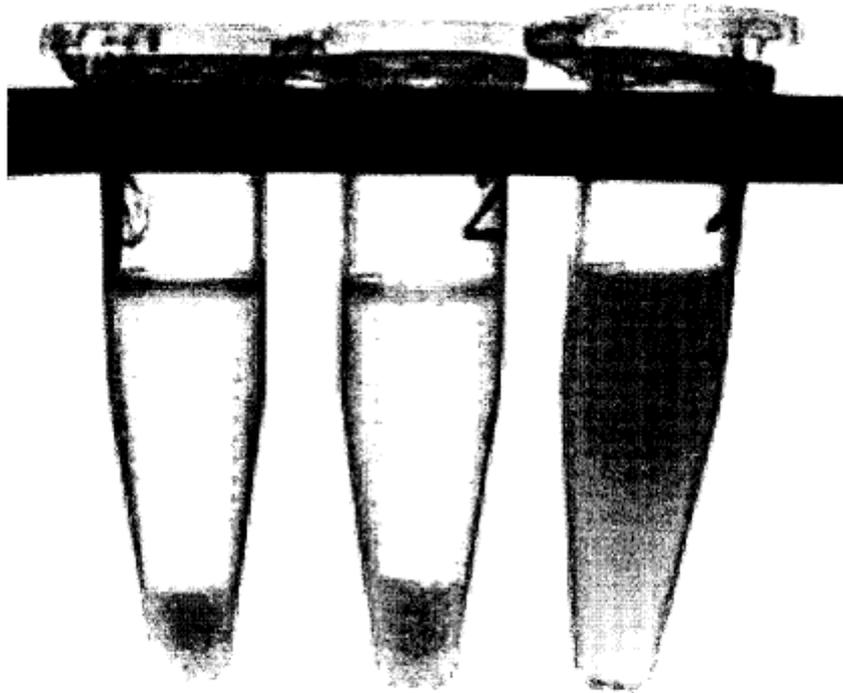


Fig. 10