

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 485**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/315** (2006.01)

**C12N 9/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2014 PCT/IB2014/062193**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14203133**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2014 E 14747982 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 3010932**

54 Título: **Hialuronidasa bacteriana y proceso para su producción**

30 Prioridad:

**17.06.2013 IT MI20130992**

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

**23.11.2017**

73 Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)**

**Via Ponte della Fabbrica 3/A**

**35031 Abano Terme (PD), IT**

72 Inventor/es:

**MESSINA, LUCIANO;**

**MUSUMECI, LUCA y**

**VACCARO, SUSANNA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 643 485 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

Hialuronidasa bacteriana y proceso para su producción

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a una hialuronidasa derivada de *S. koganeiensis*, a sus aplicaciones y a un método para su producción.

Actualmente, la hialuronidasa utilizada en el campo clínico es de origen animal. Aunque este producto se purifica adecuadamente, contiene una serie de contaminantes que pueden inducir respuestas inmunógenas o alérgicas.

10 El ácido hialurónico es un componente esencial de la matriz extracelular y un componente cuantitativamente significativo de la barrera intersticial. La hialuronidasa es una enzima hidrolítica que escinde el ácido hialurónico en ácido D-glucurónico y N-acetil glucosamina, aumentando la permeabilidad de la matriz intersticial. De manera variable, también es capaz de degradar otros ácidos mucopolisacáridos del tejido conectivo. Las altas concentraciones de hialuronidasa pueden encontrarse, por ejemplo, en el aparato oral de las sanguijuelas, en el veneno de las serpientes, las abejas, los escorpiones y en el sobrenadante del cultivo de bacterias patógenas tales como los neumococos, estreptococos hemolíticos y *Staphylococcus aureus*. En el cuerpo humano, la hialuronidasa se encuentra en la córnea, en el cuerpo ciliar, en el bazo, en la piel y en los testículos. También se encuentran altas cantidades de hialuronidasa en los espermatozoides, a los que la enzima permite ir más allá de la barrera del ácido hialurónico que protege el óvulo.

20 La hialuronidasa se utiliza en medicina en el tratamiento del edema, la inflamación local, las hemorroides y en los sabañones. Además, se utiliza en el campo farmacéutico para facilitar el transporte y aumentar la dispersión y difusión de ciertos ingredientes activos de alto peso molecular (anticuerpos, nanopartículas portadoras de fármacos, ADN para terapia génica, proteínas recombinantes) administrados localmente por inyección subcutánea, aumentando la biodisponibilidad del mismo en cantidades comparables a la administración intravenosa. [1] Estudios anteriores han demostrado que las nanopartículas con diámetros de hasta 200 nm pueden experimentar un fuerte aumento en su transporte a través del espacio intersticial cuando se administran concurrentemente o secuencialmente con la enzima hialuronidasa [1]. Los estudios hasta ahora considerados muestran cómo las nanopartículas son capaces de expresar, in vitro, sus funciones, mostrando así un gran potencial en los campos terapéutico y diagnóstico. Sin embargo, se debe considerar, in vivo, la capacidad de las nanopartículas para ir más allá de las barreras debido al tipo de administración que se va a utilizar en la práctica clínica (administración subcutánea o gastrointestinal o toxicidad por administración intravenosa), su volumen de distribución y su toxicidad. El uso de formulaciones de nanopartículas e hialuronidasas podría, por tanto, representar un punto de partida excelente e innovador para el futuro terapéutico y de diagnóstico con la perspectiva de que las nanopartículas de fármaco portador puedan finalmente utilizarse en la práctica clínica común por administración local subcutánea para el tratamiento, por ejemplo, en oncología, oftalmología y osteoartritis.

35 Algunos tipos de cáncer, incluyendo los cánceres de páncreas, mama, colon y próstata, se ha demostrado que acumulan altos niveles de ácido hialurónico (HA). Esta acumulación de HA de una manera anormal genera una red de protección que rodea ciertos tipos de cánceres y los soporta. Esta acumulación patológica de HA con otros componentes de la matriz también aumenta la presión del líquido intersticial del tumor, la constricción del vaso tumoral y crea un microambiente único que favorece el crecimiento de las células cancerosas en comparación con las células normales. Estos mecanismos generan obstáculos a la administración de fármacos, inhibiendo la eficacia potencial de muchos agentes anticancerígenos. Al dismantelar el componente HA que determina la arquitectura del tumor, la hialuronidasa destruye este microambiente tumoral al abrir vasos, previamente restringidos, que aumentan el flujo sanguíneo al tumor. Esto puede permitir que los agentes terapéuticos contra el cáncer sean transportados más eficazmente al objetivo del tumor, aumentando su eficacia terapéutica.

45 La hialuronidasa también se usa en cosméticos para el tratamiento de reacciones granulomatosas o colocaciones incorrectas, es decir indeseadas, de ácido hialurónico, causadas por cargas, y para mejorar dramáticamente la condición de fibrosis presente en la celulitis.

50 La hialuronidasa, al segmentar el componente fibrótico de la celulitis, la hace más suave con la reducción del efecto de piel naranja, dando así un aspecto más natural y agradable a la porción de piel sometida al tratamiento. Hasta la fecha, la hialuronidasa es el único tratamiento real, con fines terapéuticos o no terapéuticos, que puede combatir la celulitis con resultados satisfactorios.

Estudios anteriores han demostrado la eficacia de la hialuronidasa en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares tales como la aterosclerosis [2], pero el potencial que la hialuronidasa puede tener sobre la presión arterial era desconocido hasta el momento [3].

55 Los estudios clínicos han demostrado con pruebas electrocardiográficas que estas aplicaciones son científicamente apoyadas, llevando a estudiar los efectos que el suero humano tiene en la actividad de WYDase, una hialuronidasa testicular bovina que ha sido ampliamente utilizada en muchos estudios clínicos.

De estos estudios clínicos se desprenden las siguientes conclusiones:

- Sólo el uso de una hialuronidasa altamente purificada tiene un alto valor clínico para la reducción de la extensión del infarto de miocardio [4].

5 - Muchos grupos han demostrado que la sangre humana contiene un inhibidor termolábil de la hialuronidasa bovina [5, 6].

10 Estas conclusiones, a pesar de que los estudios clínicos han demostrado la eficacia de la hialuronidasa, no han llevado hasta el momento al desarrollo de una hialuronidasa y/o nuevos agentes terapéuticos basados en hialuronidasa capaces de asegurar una administración intravenosa para el manejo de enfermedades cardio-cerebrovasculares, limitando el uso de algunas terapias cardiovasculares, debido al alto valor de las impurezas, con las ya disponibles en el mercado.

En el campo veterinario, la hialuronidasa se utiliza en soluciones que comprenden sustancias antibióticas para el tratamiento de enfermedades animales, tales como la mastitis bovina. Hasta la fecha, la producción de hialuronidasa bacteriana o animal a escala industrial ha sido difícil, tanto por la baja producción como por el hecho de que la enzima se vuelve inestable en solución acuosa y pierde actividad después de la purificación.

15 Además, muchas de las hialuronidasas producidas industrialmente provienen de extractos animales (de testículos bovinos y ovinos) con alto riesgo de transmisión de encefalopatía esponjiforme animal (la llamada "enfermedad de las vacas locas"). Otras producciones industriales han producido hialuronidasa (PH20 humana) en forma recombinante soluble a partir de células de mamíferos, mejorando la pureza y reduciendo el riesgo de infecciones virales. [7] El objeto de la presente invención es proporcionar una hialuronidasa bacteriana recombinante que tenga alta pureza para aplicaciones farmacéuticas y/o cosméticas.

20 Un objeto de la presente invención es proporcionar una enzima que sea estable en una solución acuosa incluso durante largos tiempos y en presencia de enzimas proteolíticas, que esté completamente desprovista del riesgo de transmitir encefalopatía esponjiforme animal y que tenga una alta actividad de hialuronidasa en el torrente sanguíneo sin posibilidad de inhibición o contaminación vírica o bacteriana, para permitir su uso también por vía intravenosa. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para la preparación de hialuronidasa que sea eficiente, con un alto rendimiento y sea aplicable sin dificultad a escala industrial.

25 De acuerdo con la presente invención, estos objetivos y otros que serán más evidentes a continuación, se consiguen por un método para la producción de hialuronidasa aislada de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ. ID. N° 21 que comprende las siguientes etapas:

30 a) inocular un medio de cultivo bacteriano en un biorreactor con un inóculo de células recombinantes que contienen al menos un vector que comprende la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 41;

b) someter el contenido del biorreactor de la etapa a) a fermentación a un pH entre 6,7 y 7,1 en presencia de una solución nutritiva;

c) añadir un inductor de los genes lac a la mezcla de la etapa b);

35 d) someter la mezcla de la etapa b) a un periodo de inducción de entre 8 y 24 horas;

e) centrifugar las células bacterianas obtenidas en la etapa d);

f) volver a suspender los gránulos obtenidos en la etapa e) y someter la suspensión resultante a choque osmótico;

g) extraer las proteínas periplásmicas por centrifugación de la suspensión de la etapa f);

40 h) purificar la fracción proteica que tiene actividad enzimática de hialuronidasa obtenida en la etapa g) mediante una secuencia de:

i. cromatografía de intercambio iónico fuerte y aislamiento de la fracción de la actividad enzimática de hialuronidasa;

ii. cromatografía de intercambio catiónico débil y aislamiento de la fracción de la actividad enzimática de hialuronidasa; y

45 iii. cromatografía de interacción hidrofóbica aromática y aislamiento de la fracción de la actividad enzimática de hialuronidasa.

Los objetivos de la invención también se consiguen mediante una hialuronidasa de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 que comprende la secuencia SEQ ID No: 21, obtenible mediante dicho método.

50 Los objetos de la invención también se han conseguido mediante una hialuronidasa de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 en una forma purificada y que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ. ID. No. 21.

Los objetivos de la invención también se han conseguido mediante un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N° 17, que codifica una hialuronidasa bacteriana que comprende la secuencia de aminoácidos en SEQ. ID. No. 21. Los objetivos de la invención se han conseguido también mediante un vector recombinante genéticamente modificado que comprende dicho polinucleótido.

- 5 Los objetivos de la invención se han conseguido mediante una célula huésped que comprende dicho vector recombinante modificado genéticamente.

Los objetivos de la invención también se consiguen mediante una composición adecuada para uso farmacéutico o cosmético que comprende dicha hialuronidasa de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 en una forma purificada y que comprende la secuencia de aminoácidos N-terminal mostrada en la SEQ. ID. N° 21, dicha hialuronidasa para uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno o enfermedad, opcionalmente en combinación con al menos otro ingrediente activo, y el uso no terapéutico del mismo para aplicaciones cosméticas y/o para mejorar el aspecto estético.

10

Dentro del alcance de la presente invención, por "composición adecuada para uso farmacéutico o cosmético" se entiende una preparación sólida, semisólida o líquida, tal como una suspensión o solución, que comprende al menos un ingrediente activo y al menos un excipiente como es conocido por los expertos en la técnica.

15

La definición de "secuencia polipeptídica" o "secuencia polinucleotídica" también incluye secuencias con un alto grado de homología con la secuencia indicada. Ejemplos no limitativos, son polipéptidos que tienen al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% % o más de identidad con la secuencia mostrada en la SEQ. ID. NO: 21, polinucleótidos que tienen una identidad de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con la secuencia mostrada en SEQ. ID. NO: 17, y polinucleótidos que tienen una identidad de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con la secuencia mostrada en la SEQ. ID. NO: 41.

20

Dentro del alcance de la presente invención, por "hialuronidasa de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394" se entiende hialuronidasa con un alto grado de homología con la hialuronidasa originalmente aislada del organismo *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394, que se puede producir mediante técnicas biotecnológicas también a partir de otros microorganismos distintos de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 (tales como *E. coli* o *B. subtilis*).

25

Si no se indica de otro modo, dentro del alcance de la presente invención, los porcentajes se refieren al peso de un componente sobre el peso total de la composición.

Las siguientes figuras se proporcionan para describir mejor la invención, sin la intención de limitar su alcance.

30 **Figuras.**

FIG. 1: curva de producción de hialuronidasa del sobrenadante del cultivo de *Streptomyces koganeiensis* en relación con el intervalo de tiempo (T). Ensayo en gel de agarosa al 1% del perfil de ARN total y ADN extraído de células de *S. koganeiensis* durante la etapa de producción.

FIG. 2: secuencia del amplicón de aproximadamente 550 pb obtenida con los cebadores internos MesFor2 y MesRev2 y traducción in silico de la secuencia de nucleótidos obtenida en la secuencia de la proteína.

35

FIG. 3: diagrama del método de la reacción en cadena de polimerasa inversa (IPCR) utilizado para identificar las secuencias que flanquean en 5' y 3' la región interna del gen de *S. koganeiensis* que codifica la hialuronidasa.

FIG. 4: identificación completa de toda la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la porción de hialuronidasa CDS de *S. koganeiensis*.

FIG. 5: secuencia del gen completo que codifica la porción de hialuronidasa de CDS *S. koganeiensis* como clonada en el vector pCR-BluntII-MOUSE (Invitrogen).

40

FIG. 6: (A) Ensayo BLAST para homologías de secuencia entre la secuencia de aminoácidos determinada por la hialuronidasa de *S. koganeiensis* ATCC 31394 y las secuencias de aminoácidos informadas en la base de datos de la web. Las secuencias resaltadas por el rectángulo describen un dominio funcional de la familia de las hialuronidasas bacterianas. (b) Ensayo BLAST para homologías de secuencia entre la secuencia de nucleótidos determinada por la hialuronidasa de *S. koganeiensis* ATCC 31394 y las secuencias de nucleótidos reportadas en la base de datos de la web.

45

FIG. 7: (a) caracterización funcional de la secuencia proteica de la hialuronidasa de *S. koganeiensis*. (b) caracterización funcional de la secuencia proteica de la hialuronidasa de *Actinoplanes* sp. SE 50/110, *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486, *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488.

50

FIG. 8: el fragmento de ADN que codifica la hialuronidasa y sus plásmidos de expresión utilizados para la clonación se cortaron ambos con las enzimas de restricción establecidas. Los fragmentos obtenidos se analizaron en gel de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio. Después de la tinción, el gel fue adquirido por un dispositivo de

captura de imagen de laboratorio ImageQuant 300 TL (GE Healthcare), mientras que los ensayos (cuantitativos y cualitativos) se realizaron utilizando el software de análisis ImageQuant TL (GE Healthcare).

5 FIG. 9: Detección por PCR y digestión con enzimas de restricción del fragmento de ADN que codifica la hialuronidasa clonada en plásmidos de expresión. Los fragmentos obtenidos se analizaron en gel de agarosa al 1% con el software de análisis de imágenes ImageQuant TL (GE Healthcare) después de tinción con bromuro de etidio y adquisición.

10 FIG. 10: la figura muestra el mapa del plásmido pHTsk\_HYAL: promotor P<sub>grac</sub>, gen *lacI* (represor *lacI*), gen *Amp<sup>R</sup>* para la resistencia a la ampicilina, gen *Cm<sup>R</sup>* para la resistencia al cloranfenicol, origen de replicación de ColEI de *E. coli*, el péptido señal SamyQ de *amyQ* y el gen de hialuronidasa que codifica los sitios de restricción únicos de hialuronidasa de *S. koganeiensis*, *BamHI* y *XbaI* utilizados para la clonación de hialuronidasa.

FIG. 11: la figura muestra el mapa del plásmido pHyal\_sk: el origen de replicación *ori* de *E. coli*, el gen *Ap* para la resistencia a la ampicilina, el promotor T7, el gen *lacI* (represor *lacI*), el péptido señal *pelB*, el gen de hialuronidasa que codifica los sitios de restricción únicos de la hialuronidasa de *S. koganeiensis*, *NcoI* y *EcoRI* utilizados para la clonación de la hialuronidasa.

15 FIG. 12: la figura muestra el mapa del plásmido pHyal\_sk\_SL: origen *ori* de replicación de *E. coli*, el gen *Ap* para la resistencia a la ampicilina, el promotor T7, el gen *lacI* (represor *lacI*), el gen de hialuronidasa que codifica los sitios de restricción únicos de hialuronidasa de *S. koganeiensis*, *NdeI* y *EcoRI* usados para clonar la hialuronidasa.

20 FIG. 13: (a) la figura muestra la secuencia de nucleótidos del Marco de Lectura Abierta (ORF) que codifica la proteína hialuronidasa de *S. koganeiensis* clonada en el vector pHT43 (MOBITEC). (b) la figura muestra la secuencia de nucleótidos del ORF que codifica la proteína hialuronidasa de *S. koganeiensis* clonada en el vector pET22b (+) (Novagen). (c) la figura muestra la secuencia de nucleótidos del ORF que codifica la proteína hialuronidasa de *S. koganeiensis* clonada en el vector pET21b (+) (Novagen).

25 FIG. 14: evaluación en SDS-PAGE al 12% de la expresión de la hialuronidasa recombinante (*E. coli*, BL21 (DE3) que contiene el plásmido pHyal\_sk) después de la inducción con IPTG 1 mM en comparación con el perfil proteico de la muestra preinducida.

FIG. 15: evaluación en SDS-PAGE al 12% de la expresión de la hialuronidasa recombinante (*E. coli*, BL21 (DE3) que contiene el plásmido pHyal\_sk\_SL) después de la inducción con IPTG 1 mM en comparación con el perfil proteico de la muestra preinducida.

30 FIG. 16: perfil de proteína en SDS - PAGE al 12% de las fracciones obtenidas después de cada etapa de purificación de acuerdo con la invención.

FIG. 17: (a) comparación de espectros en el dicroísmo circular de hialuronidasa autóloga y recombinante. (b) se muestran los espectros UV respectivos para el recombinante purificado. Los espectros UV se analizaron antes (línea superior) y después de la centrifugación (línea inferior) para eliminar cualquier agregado presente.

35 FIG. 18: determinación del peso molecular por espectrometría de masas de la hialuronidasa recombinante obtenida de acuerdo con la invención.

FIG. 19: determinación del punto isoeléctrico de la hialuronidasa recombinante obtenida de acuerdo con la invención.

FIG. 20: electroferograma de electroforesis capilar de la muestra de hialuronidasa recombinante purificada de acuerdo con la invención. La concentración calculada fue de aproximadamente 1 mg/ml con una pureza del 100%.

40 FIG. 21: análisis de la pureza de la hialuronidasa recombinante purificada de acuerdo con la invención por medio de (a) HPLC en una columna de filtración en gel Bio-Sil SEC, (b) RP-HPLC en una columna de fase hidrófoba (invertida).

45 FIG. 22: SDS-PAGE 12% - la hialuronidasa recombinante producida y purificada de acuerdo con la invención se cargó con 1000, 500, 250, 100 y 50 unidades por carril y se comparó con 50, 25 y 10 unidades por carril de hialuronidasa de testículos bovinos. El análisis Western blot sobre la preparación de 25 unidades de la hialuronidasa bovina utilizando el anticuerpo policlonal anti-hialuronidasa (Abnova), que reveló una única banda de hialuronidasa inmunoreactiva.

50 FIG. 23: la electroforesis en gel de agarosa al 1% muestra la despolimerización del ácido hialurónico purificado con 1 unidad de hialuronidasa recombinante producida de acuerdo con la invención en los tiempos indicados que oscilan entre 5 minutos y 24 horas.

FIG. 24: Estabilidad de la hialuronidasa recombinante producida según la invención y de la hialuronidasa de testículos bovinos frente a enzimas proteolíticas.

FIG. 25: evaluación in vitro del efecto de inhibición que el suero humano y animal tiene sobre la actividad enzimática de la hialuronidasa (recombinante producido de acuerdo con esta invención y hialuronidasa bovina).

En una realización, la presente invención se refiere a un método para la producción de hialuronidasa aislada de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ. ID. N° 21 que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) inocular un medio de cultivo bacteriano en un biorreactor con un inóculo de células recombinantes que contienen al menos un vector que comprende la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 41;
- b) someter el contenido del biorreactor de la etapa a) a fermentación a un pH entre 6,7 y 7,1 en presencia de una solución nutritiva;
- 10 c) añadir un inductor de los genes lac a la mezcla de la etapa b);
- d) someter la mezcla de la etapa b) a un periodo de inducción de entre 8 y 24 horas;
- e) centrifugar las células bacterianas obtenidas en la etapa d);
- f) volver a suspender los gránulos obtenidos en la etapa e) y someter la suspensión resultante a choque osmótico;
- g) extracción de las proteínas periplásmicas por centrifugación de la suspensión de la etapa f);
- 15 h) purificar la fracción proteica que tiene actividad enzimática de hialuronidasa obtenida en la etapa g) mediante una secuencia de:
  - i. cromatografía de intercambio iónico fuerte y aislamiento de la fracción de actividad enzimática de hialuronidasa;
  - ii. cromatografía de intercambio catiónico débil y aislamiento de la fracción de actividad enzimática de hialuronidasa; y
  - 20 iii. cromatografía de interacción hidrofóbica aromática y aislamiento de la fracción de actividad enzimática de hialuronidasa.

Para eliminar completamente el riesgo de transmisión de la encefalopatía espongiforme animal, y dado que existen fuentes limitadas de hialuronidasa de origen microbiano, se seleccionó una cepa bacteriana y se aisló en estudios previos capaces de producir una alta actividad de la enzima hialuronidasa [8].

25 La misma cepa bacteriana se utilizó con éxito ([9]) para la producción de hialuronidasa que tiene todas las características enzimáticas peculiares, pero sobre todo un grado de pureza (> 98%) mucho mayor que el descrito en [8]. Estudios comparativos han demostrado de hecho que lo que se obtiene de [8] es, en realidad, una mezcla de 68 fracciones diferentes, de las cuales sólo una tiene una actividad hialuronidasa. La mayor pureza de [9] va acompañada de una mayor actividad enzimática, evaluada a la misma concentración y valores de T y pH.

30 Por otra parte, estudios comparativos adicionales han demostrado que la hialuronidasa descrita en [9], en contraste con lo descrito en [8], conserva su estabilidad en el tiempo hasta 24 meses, incluso a diferentes temperaturas (5°C y -20°C), y prácticamente no se ve afectada por la actividad de las enzimas proteolíticas con las que entra en contacto después de la administración.

35 Con el fin de garantizar una mayor seguridad en el uso de esta enzima bacteriana en aplicaciones farmacéuticas, la hialuronidasa aislada y caracterizada de la cepa bacteriana original en [9] se produjo en forma recombinante utilizando una cepa bacteriana no patógena como célula huésped definida como "generalmente considerado como segura" (GRAS). La producción del recombinante bacteriano del microorganismo "GRAS" conserva una eficacia comparable a la de la hialuronidasa autóloga pero con una mayor producción por litro y con un perfil sustancialmente mejor de pureza y seguridad, incluyendo la ausencia completa del riesgo de transmisión viral.

40 El método de la presente invención permite obtener altas cantidades de una hialuronidasa bacteriana recombinante de alta calidad para aplicaciones farmacéuticas. La alta producción de hialuronidasa recombinante en microorganismos no patógenos tiene la misma eficacia que la hialuronidasa tradicional pero con una seguridad y perfil significativamente mejores, incluyendo la ausencia completa del riesgo de transmisión de encefalopatía espongiforme animal.

45 La presente invención describe el aislamiento de todo el gen que codifica la hialuronidasa de la bacteria grampositiva *Streptomyces koganeiensis*, con la subsiguiente clonación y expresión del fragmento CDS (secuencia codificante, SEQ ID NO: 22). Además, la presente invención proporciona un método para la preparación en el fermentador, la purificación y caracterización de la hialuronidasa recombinante codificada y secretada en la porción de célula periplásmica en una forma soluble.

La proteína recombinante así obtenida tiene una alta actividad de hialuronidasa y tiene una alta estabilidad a las enzimas proteolíticas, es capaz de realizar la actividad total con su biodisponibilidad máxima en el torrente sanguíneo sin posibilidad de inhibición y contaminación bacteriana y viral. En su forma soluble recombinante, demuestra ser eficaz para su uso en aplicaciones no sólo para la preparación de composiciones farmacéuticas para facilitar la administración subcutánea de ingredientes activos o fluidos inyectables, sino también en aplicaciones terapéuticas, por ejemplo en el tratamiento de patologías tales como la hipertensión, el infarto de miocardio, eventos trombóticos, eventos cardiovasculares y cerebrovasculares y tumores, ya que es único con las características descritas por la invención con referencia a todas las demás hialuronidasas disponibles hasta la fecha.

Las producciones de la hialuronidasa conocida proceden de fuentes animales que tienen un alto riesgo de transmitir la encefalopatía esponjiforme animal; debido a este riesgo y a la alta inestabilidad de la hialuronidasa derivada de animales, se investiga, selecciona y aísla una cepa bacteriana capaz de producir una hialuronidasa con una elevada actividad enzimática.

En un aspecto, la presente invención se refiere al aislamiento del gen completo que codifica la hialuronidasa bacteriana (SEQ ID NO: 17) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21, procedente de la bacteria grampositiva *S. koganeiensis*, la consiguiente clonación y la expresión de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 22 que codifica la proteína madura que tiene la secuencia SEQ ID NO: 21 en un huésped bacteriano específico (por ejemplo, *E. coli*), reconocido como un organismo seleccionado para la expresión de proteínas recombinantes utilizadas en aplicaciones terapéuticas, diagnósticas e industriales. La invención describe la producción de la proteína usando el método alimentado por lotes para obtener, en un fermentador, una alta cantidad de hialuronidasa recombinante secretada en la porción de células periplásmicas en una forma soluble. La hialuronidasa recombinante así producida se somete a purificación usando tres etapas cromatográficas reproducibles (intercambio de dos iones y un intercambio hidrófobo). La enzima es una innovadora enzima bacteriana recombinante soluble adecuadamente purificada con una elevada actividad de hialuronidasa producida por la fermentación de bacterias inocuas sin el uso de células y materias primas derivadas de animales.

Además, la enzima según esta invención se caracteriza por una secuencia de 217 aminoácidos, por un punto isoeléctrico (pI) de  $5,2 \pm 0,5$ , por una alta estabilidad frente a enzimas proteolíticas, por la estabilidad in vitro frente a sangre animal y humana, por un alto grado de pureza y seguridad, y por la ausencia completa de la posibilidad de contaminación viral.

La hialuronidasa de acuerdo con la invención puede obtenerse como sigue: inicialmente, la cepa de *S. koganeiensis* se sometió a fermentación y el material extracelular se obtuvo a partir de células bacterianas como se ha descrito previamente [9]. Durante el proceso de fermentación, las fracciones celulares se recogen cada 3-4 horas para evaluar los niveles de ADN y ARN producidos por métodos estándar (Figura 1), mientras que la otra parte de la fracción se almacena a  $-80^{\circ}\text{C}$  en Reactivo de Bacterias RNAprotect™ (Qiagen), después de ser analizado. Al final de la fermentación, el sobrenadante que contenía la hialuronidasa se clarificó, se concentró, se dializó, se purificó y luego se enriqueció con el único componente de hialuronidasa como se describió previamente [9].

La hialuronidasa de *S. koganeiensis* así aislada se digirió con enzimas proteolíticas (tripsina, quimotripsina, Glu-C) y los fragmentos obtenidos después de la digestión se separaron por HPLC. De este modo, la información relativa a la estructura primaria de la hialuronidasa aislada se obtuvo secuenciando la porción N-terminal de los fragmentos obtenidos después de la digestión enzimática.

Se obtuvieron las siguientes secuencias de aminoácidos a partir de la secuenciación N-terminal realizada:

- AGENGATTTDFGPVA (SEQ ID NO: 1)
- RFSADTTIEAAFIKTTSETIHAATIYK (SEQ ID NO: 2)
- GYADGSDKDAAALSLDLR (SEQ ID NO: 3)
- AQVHIVQR (SEQ ID NO: 4)
- IGNAATVPTSVDSSGGG (SEQ ID NO: 5)

A partir de la investigación realizada en una base de datos, se identificó la homología de la hialuronidasa de *S. koganeiensis* ATCC 31394 con una proteína anteriormente mencionada (protein\_id = ZP\_06911952.1) de *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486. Sobre la base de la secuencia N-terminal de los péptidos obtenidos a partir de la proteína aislada según esta invención, fue posible sintetizar los correspondientes oligonucleótidos, que sirvieron para aislar el gen que codifica la hialuronidasa del genoma de *S. koganeiensis*.

Los gránulos de las células bacterianas de la fermentación [9] en el período de producción exponencial de hialuronidasa (Fig. 1) se trataron para la extracción y purificación de ADN y ARN. Los productos así obtenidos se analizan cualitativamente utilizando un espectrofotómetro y cuantitativamente mediante electroforesis en geles de agarosa [12]. Las regiones de aminoácidos identificadas e idénticas entre *S. koganeiensis* y *S. pristinaespiralis* sirvieron para diseñar los oligonucleótidos usados para aislar una porción interna del gen que codifica la

hialuronidasa a partir del ADN genómico utilizado como molde, produciendo un producto de PCR con una única banda específica de aproximadamente 550 pb. La secuenciación de nucleótidos del fragmento proporcionó la secuencia (SEQ ID NO: 8) mostrada en la Fig. 2.

5 La técnica de PCR inversa (IPCR) se desarrolló y realizó para identificar las regiones nucleotídicas flanqueando la secuencia génica así identificada (Fig. 3). El método IPCR que utiliza el par de cebadores SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 permitió obtener productos de PCR, respectivamente de aproximadamente 700 y 1400 pb, que, una vez secuenciados, proporcionaron información exacta sobre el gen completo que codifica la hialuronidasa de *S. koganeiensis*. Con este paso, se completa la identificación de la secuencia de nucleótidos de interés (SEQ ID NO: 13), mostrada en (figura 4).

10 Se utilizan un par de cebadores diseñados sobre las secuencias no codificantes (SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15) y flanqueando el gen completo que codifica la hialuronidasa para la amplificación del gen completo (SEQ ID NO: 16) y el producto de PCR (figura 5) se clonó directamente en el vector pCR®-BluntII-TOPO® (Invitrogen) en células de *E. coli*. A partir de los resultados obtenidos del análisis bioinformático se observó que toda la longitud del gen que codifica la hialuronidasa de *S. koganeiensis* era de 744 pb (SEQ ID NO: 17) y que la longitud de la secuencia peptídica se estimaba en 247 aminoácidos (SEQ ID NO: 18). El gen contiene un dominio putativo (SEQ ID NO: 19) de proteínas pertenecientes a la familia de hialuronidasas (Hyaluronidase\_1), como se evidencia mediante la búsqueda de homologías en una base de datos. Además, el análisis de la secuencia (SEQ ID NO: 18) utilizando una herramienta específica indicó la presencia de una secuencia señal (péptido señal) de 30 aminoácidos (aminoácidos 1 a 30 (SEQ. ID. NO: 47), con el sitio de escisión entre el aminoácido 30 y 31). Por lo tanto, la proteína madura (SEQ ID NO: 21) tiene 217 aminoácidos de longitud (secuencia de nucleótidos correspondiente 651bp (SEQ ID NO: 22)) y su peso molecular predicho ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) es 21679.96 Da.

15 Finalmente, el análisis BLAST para las homologías de secuencia muestra una homología parcial entre la secuencia de aminoácidos determinada de hialuronidasa de *S. koganeiensis* ATCC 31394 (SEQ ID NO:27) con algunas de las secuencias de aminoácidos de proteínas hipotéticas pertenecientes a la familia Aactinobacteria informada en la base de datos de la web.

25 Existe una homología de secuencia entre una región de la secuencia (SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 52) de la hialuronidasa de *S. koganeiensis* (de acuerdo con la invención) y uno de los módulos presentes en el dominio de aminoácidos de CD44 murino que une el ácido hialurónico (Figura 7 (a)).

30 El ADNc que codifica la hialuronidasa de *S. koganeiensis* de acuerdo con la invención (SEQ ID NO: 41) se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pCR-BluntII-TOPO [sk\_HYAL] y se ligó, después de ser digerido con enzimas de restricción, en los diferentes plásmidos usados de acuerdo con a esta invención, por ejemplo:

Vector	Cebadores usados	Enzimas de restricción	Longitud del nucleótido clonado de (SEQ ID NO: 41)	Plásmido obtenido
pHT43	SEQ ID NO: 28 5'-gttGGATCCGCGGG GAAACGGCGGACGACGA-3'	BamHI	672bp	pHTsk_HYAL (figura 13a)
	SEQ ID NO: 29 5'-gacTCTAGATCACGCC GGTGGATCGTCGTGACC-3'	XbaI		
pET22b (+)	SEQ ID NO: 32 5'-tggCCATGGCCGGGG AGAACGGCGGACGACGA + 3'	NcoI	671bp	pHyal sk (+) (Fig. 13, b)
	SEQ ID NO: 33 5'-ctcGAATTCtaCGCC GGTGGATCGTCGTGACC-3'	EcoRI		
pET21b (+)	(SEQ ID NO: 36) 5'-aCATATGGCCGGGGA GAACGGCGGACGACGA-3'	NdeI	672bp	pHyal sk SL (Fig. 13, c)



Vector	Cebadores usados	Enzimas de restricción	Longitud del nucleótido clonado de (SEQ ID NO: 41)	Plásmido obtenido
	(SEQ ID NO: 37) 5'-ctcGAATTCtcaCGCCGGTGCGATCGTCGTGACC-3'	EcoRI		
pET24b (+)	(SEQ ID NO: 36) 5'-ataCATATGGCCGGGA GAACGGCGGACGACGA-3'	NdeI	672bp	pRH_sk
	(SEQ ID NO: 37) 5'-ctcGAATTCtcaCGCCGGTGCGATCGTCGTGACC-3'	EcoRI		

Después de la clonación y la amplificación en células de la cepa de E. coli DH5a, los vectores genéticamente modificados fueron extraídos y purificados para ser transformados por separado en células de expresión bacteriana.

- 5 El vector pHTsk\_HYAL se transforma en células, hechas competentes, de Bacillus subtilis (WB800N-MOBITEC) mientras que los vectores pHyal\_sk, pHyal\_sk\_SL y pRH\_sk se transforman en células, hechas competentes, de E. coli, cepa BL21 (DE3) y/o MG1655. Todas las transformaciones se llevaron a cabo por procesamiento químico [13]. Los clones, tanto de B. subtilis como de E. coli, que resultaron ser positivos para la presencia de vectores que contienen el fragmento nucleotídico de hialuronidasa que tiene la secuencia clonada genéticamente correcta (SEQ ID NO: 41) se ensayan en cuanto a la capacidad para expresar la hialuronidasa recombinante en cultivos de 500 ml (ejemplo: 10.11).

10 Preferiblemente, en el método según la presente invención, la célula recombinante de la etapa a) se selecciona de una célula de Escherichia coli y una de Bacillus subtilis.

Master Cell Bank y Working Cell Bank se desarrolló sobre las cepas recombinantes productoras y las alícuotas de estos clones de 2 ml con glicerol al 15% se introdujeron en viales criogénicos almacenados inmediatamente a -80°C.

- 15 La hialuronidasa de acuerdo con la invención se puede producir en grandes cantidades a partir de pequeños fermentadores usando tanto métodos de cultivo por lotes (ejemplo 13) como por lotes alimentados (ejemplo 14) como se describe en esta invención (tabla 1).

Tabla 1: Plásmidos y estrategias de clonación utilizados en la presente invención

Cepa	Plásmido	Descripción de plásmido/Estrategia de clonación	Localización de la proteína	Producción de hialuronidasa soluble (g/l)
B. subtilis WB800N	pHTsk_HYAL	pHT43 (+) SamyQ - (BamHI/XbaI) - Hialuronidasa	Sobrenadante	N.D.
E. Coli BL21DE3	PHyal_sk	pET22b (+) -pelB - (NcoI/EcoRI) - Hialuronidasa	Periplasma celular	~0,1
E. Coli BL21DE3	PHyal_sk_SL	pET21b (+) - (NdeI/EcoRI) - Hialuronidasa	Periplasma celular	≥ 2
E. Coli BL21DE3	PETsk_Hyal	pET21b (+) - (BamHI/HindIII) - Hialuronidasa His	Cuerpos incluidos	≤0,001
E. Coli BL21DE3	pET22Hyal	pET22b (+) -pelB - (MscI/EcoRI) - periplasma celular de hialuronidasa	Periplasma celular	~0,35
E. coli MG1655	PHyal_sk	pET22b (+) -pelB - (NcoI/EcoRI) - hialuronidasa	Periplasma celular	N.D.

Sin embargo, los mejores resultados en términos de producción, estabilidad y repetibilidad, se encontraron usando fermentaciones con el método del lote alimentado. La ampicilina, la neomicina, la canamicina o el cloranfenicol pueden utilizarse como antibióticos de acuerdo con las características de los vectores específicos.

5 Por ejemplo, se inoculó el clon de *E. coli* "BL21 (DE3) - pHyal\_sk\_SL" a partir de un vial (procedente del banco de células de trabajo almacenado a -80°C) en medio de cultivo LB Miller fresco (relación 1/20 con respecto al volumen de fermentación) que contiene 50 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C a 150 rpm durante 16-18 horas. El clon procedente del inóculo se cultivó en el fermentador en un medio de cultivo mínimo a pH 6,8.

10 Preferentemente se administró una solución de glicerol como alimento. Durante el proceso de fermentación, *E. coli* genera ácido acético (acetato) como un subproducto indeseable que tiene numerosos efectos negativos sobre la producción de proteínas recombinantes. La cantidad de acetato que se forma durante la fase de fermentación está directamente relacionada con la cantidad de glucosa consumida por las células en crecimiento de *E. coli* [15]. En la presente invención, se encontró que al usar glicerol como una fuente de carbono (fuente de carbono de bajo coste no fermentable) en lugar de glucosa, se obtiene un aumento aproximadamente de 3 veces en el proceso de producción alimentado por lote para la producción de hialuronidasa recombinante. Como ejemplo no limitativo, la alimentación se puede proporcionar 6 horas después de la inoculación hasta la decimonovena hora (tiempo de inducción) con una relación de adición exponencial. Después de la inducción con isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), solución final de 1 mM, la alimentación se puede administrar al cultivo cada hora y en la misma cantidad que la última adición durante 5 horas. La inducción tiene lugar 24 horas después de la inoculación y continúa durante 8-24 horas, típicamente 12 horas. Las células bacterianas se recogen después del período de inducción, por centrifugación, y se almacenan a -80°C. Las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pHyal\_sk\_SL producen la forma recombinante en el periplasma celular con una concentración máxima alcanzada de aproximadamente 2 g por litro de cultivo y una actividad enzimática superior a 87000 U/ml de cultivo ( $7,5 \times 10^7$  -  $8,7 \times 10^7$  UI/l de cultivo) obtenido después de 12 horas de inducción con IPTG 1 mM a 37°C (Tabla 2).

Tabla 2: Resultado de los lotes de fermentación del clon rHyal\_Sk, llevado a cabo para la presente invención

Lote	5C11	7C11	9C11	10C11	11C12
Método de fermentación	Lote	Lote alimentado	Lote alimentado	Lote alimentado	Lote alimentado
Hialuronidasa producida en el final de la fermentación (g/l)	0,5	1	1,5	1,2	2,1
Biomasa final (O.D. <sub>600nm</sub> )	32,7	42	51,6	64	55
Volumen de fermentación	8	10	10	10	10
Gránulos celulares (g/l)	81,2	83	116	115	149
Volumen del inóculo	0,4	0,5	0,5	0,5	1
Biomasa del inóculo (O.D. <sub>600nm</sub> )	3	3	3	2	2,2
Volumen de alimentación (L)	0	1,5	1,5	1,5	2,5
Inicio de alimentación (h)	/	6	6	6	6
Tiempo de inducción (h)	16	12	12	12	12
Estabilidad del plásmido en el final de la fermentación (%)	100	95	100	100	100
Duración total de la fermentación (h)	~22	36	36	36	36

25 La cantidad de hialuronidasa producida de acuerdo con esta invención fue aproximadamente 670-750 veces mayor que la hialuronidasa autóloga producida en el fermentador como se describe en la patente anterior [9].

30 La proteína recombinante expresada por *E. coli*, en los diferentes parámetros de fermentación, se analizó por electroforesis en SDS-PAGE (12%) después de tinción con Azul Brillante de Coomassie G-250 (BIO-RAD, 161-0406) que tenía un peso molecular de 24 kDa, mientras que la actividad enzimática se analizó por ensayo turbidimétrico [16].

La hialuronidasa recombinante producida en el fermentador por el método alimentado por lote se puede purificar mediante un proceso que comprende al menos tres etapas cromatográficas.

- 5 En la preparación de la primera purificación, se colocan los gránulos almacenados a -80°C (procedentes de la fermentación alimentada por lotes de E. coli BL21 (DE3) transformada con el vector pHyal\_sk\_SL) en una cantidad equivalente a 0,6 litros de producto de fermentación (aproximadamente equivalente al intervalo de 80-90 g de gránulos celulares que refleja aproximadamente una producción de 1-1,2 g/l de hialuronidasa recombinante) para equilibrar durante 45 minutos a temperatura ambiente.
- 10 Una vez equilibrados, los gránulos se trataron con una solución fresca (5°C) para la dispersión del gránulo. Los sedimentos resuspendidos se trataron con una solución para que el choque osmótico favoreciera la extracción de las proteínas periplásmicas. Después de la etapa del choque osmótico, el producto obtenido se centrifugó y el sobrenadante resultante, una vez homogeneizado, se llevó a pH 8 y se filtró mediante filtros de gravedad con filtros de 0,65 µl. La concentración de la hialuronidasa extraída se evaluó en SDS-PAGE, resultando ser aproximadamente 750-900 mg/total (16-22% del total de proteínas periplásmicas). La actividad de la hialuronidasa recombinante extraída se evaluó por el método turbidimétrico de Dorfman.
- 15 La fracción proteica con la actividad enzimática de hialuronidasa así obtenida se somete a cromatografía de intercambio aniónico fuerte (ejemplo: Q sepharose XL).
- La fracción proteica con actividad enzimática de hialuronidasa así obtenida se concentra a 100 ml utilizando filtros de polietersulfona (PES) con un corte de 5 kDa y se diluye 10 veces con tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 4.
- 20 La fracción de proteína con actividad enzimática de hialuronidasa así obtenida se sometió a cromatografía de intercambio catiónico débil (ejemplo: CM-Sepharose® Fast Flow).
- La fracción proteica con actividad enzimática de hialuronidasa así obtenida se concentró a 100 ml utilizando filtros de polietersulfona (PES) con un corte de 5 kDa y se diluyó 10 veces con tampón de fosfato sódico 50 mM con sulfato de amonio 1,5 mM, pH 7.
- 25 La fracción proteica con actividad enzimática de hialuronidasa así obtenida se somete a cromatografía de interacción hidrofóbica aromática (ejemplo: fenilsefariosa HP) y las proteínas eluidas de esta última etapa cromatográfica se recogieron en una única fracción que tenía un volumen de aproximadamente 730 ml y se sometieron a ensayo de actividad de hialuronidasa. Después del análisis de la actividad enzimática, la fracción eluida se sometió a ultrafiltración y diálisis con 10 volúmenes de PBS 1x (Sigma-P4417) se llevó a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml y se filtró con filtros de 0,2 µl, la concentración de proteína se determinó mediante el Kit de Reactivos de Ensayo de Proteínas BCA (PIERCE).
- 30 Al final del proceso de purificación aplicado sobre aproximadamente 1 l del producto de fermentación, se obtuvieron aproximadamente 600-650 mg de hialuronidasa recombinante y una actividad enzimática superior a  $2,6 \times 10^7$  por litro de producto purificado de la fermentación (Tabla 3).

Tabla 3: Resultado de la hialuronidasa recombinante purificada de acuerdo con la presente invención

Muestra		Hialuronidasa (U/ml)	Volumen (ml)	Hialuronidasa (total U)	Producción (%)	Hialuronidasa Total mg
Producto de fermentación	Carga	48000	600	$4,8 \times 10^7$	100	1000
Extracción periplásmica	Eluida	7600	5000	$3,8 \times 10^7$	80	800
Q-Sepharose® XL	Carga	7600	5000	$3,8 \times 10^7$	100	800
	Eluido	23100	950	$2,2 \times 10^7$	57,8	462
Flujo rápido CM Sepharose®	Carga	23100	1000	$2,2 \times 10^7$	100	462
	Eluido	57900	380	$2,2 \times 10^7$	100	462
Fenil Sepharose® HP	Carga	22000	1000	$2,2 \times 10^7$	100	462
	Eluido	26000	730	$1,9 \times 10^7$	88,8	410
DIA/Filtración	Carga	26000	730	$1,9 \times 10^7$	100	410

	Conc. y DIA/Filtr.	48570	350	$1,7 \times 10^7$	93	381
DIA/Filtración 5k	Carga	45300	375	$1,7 \times 10^7$	100	381
Filtr. 0,22µm	Eluido	45000	375	$1,69 \times 10^7$	99,5	378
Producción total por litro de cultivo (%)			35			
Cantidades totales por litro de cultivo (UI)			$2,8 \times 10^7$			
Cantidades totales por litro de cultivo (mg)			630			
Cantidades totales por gramo de gránulos (UI)			$2,1 \times 10^7$			
Cantidades totales por gramo de gránulos (mg)			4,8			

5 En todas las fracciones con actividad de hialuronidasa había una banda de proteína marcada a aproximadamente 24 kDa (figura 16), la banda se sometió a electroforesis SDS-PAGE con gel al 12% y a continuación se sometió a transferencia sobre membrana de difluoruro de polivinilideno (BIO-RAD) y se tiñó de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el proveedor. La banda de hialuronidasa se escindió con un escalpelo y se cargó en la cámara de reacción del secuenciador.

10 La secuenciación del extremo N-terminal así llevada a cabo permitió establecer que la hialuronidasa recombinante producida de acuerdo con la invención a partir de la muestra de E. coli transformada con el vector pHyal\_sk\_SL de acuerdo con la invención proporcionó cromatogramas en los que una sola secuencia de aminoácidos N-terminal estaba significativamente presente, lo que permite reconstruir la secuencia experimental mostrada a continuación: AGENGA (SEQ ID NO: 42).

15 El potencial enzimático de la hialuronidasa producida de acuerdo con la invención (E. coli transformada con el vector pHyal\_sk\_SL) se evaluó por comparación con la actividad enzimática de la hialuronidasa autóloga [9], utilizando el ensayo enzimático descrito [9] y se informó que el valor de la actividad era en ambos casos mayor que  $4 \times 10^4$  UI/mg de proteína.

Además, en el análisis realizado por dicroísmo circular (DC), la línea negra de los archivos de superposición (hialuronidasa autóloga [9]) y la línea gris (hialuronidasa heteróloga de acuerdo con la invención) tienen un perfil comparable, confirmando la misma estructura proteica para ambos muestras (Fig. 17-a).

En comparación con la técnica anterior [9], el método de acuerdo con la presente invención permite:

20 - obtener una hialuronidasa de origen bacteriano de una cepa de E. coli bien caracterizada como segura, más que de Streptomyces koganeiensis, por tecnología recombinante (en lugar de la de extracción) adecuada para la producción a escala industrial, con producción en el periplasma (en lugar de en la matriz extracelular);

25 - alcanzar una actividad de hialuronidasa máxima sorprendentemente alta, superior a 80000 U por mililitro de cultivo, frente, por ejemplo, a 130 U por mililitro de sobrenadante de cultivo en el método de [9] y, en cualquier caso, claramente superior a los obtenibles con otros conocidos procesos;

- obtener hialuronidasa de alta pureza (> 99%) con solo 3 pasos cromatográficos (en lugar de 5), con beneficios económicos significativos y tiempos de procesamiento reducidos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una hialuronidasa de Streptomyces koganeiensis ATCC 31394 en una forma purificada y que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ. ID. No. 21.

30 La proteína de la presente invención puede ser aislada y producida a partir de Streptomyces koganeiensis o producida de forma recombinante, por ejemplo, a partir de cultivos de E. coli o Bacillus subtilis.

Se encontró sorprendentemente que, en comparación con la proteína conocida de Streptomyces koganeiensis [9], la enzima de la presente invención tiene:

- un mayor nivel de pureza (99% frente a 98%)
- 35 • un nivel inferior de endotoxinas (<0,5 U/mg en lugar de > 0,5 U/mg);
- presencia de toda la secuencia peptídica (y la correspondiente secuencia de nucleótidos), que no tiene cisteína (reduciendo así la posibilidad de producir agregados);

- mayor estabilidad en la solución a 5°C (100% de estabilidad a los 24 meses versus 94% a los 24 meses de la proteína [9]);
- excelente estabilidad a 20°C (100% a los 24 meses), a pH 3-11,5 (probado hasta 24 horas);
- máxima actividad a pH fisiológico (alrededor de 7) y temperatura corporal (alrededor de 37°C);

5 • estabilidad en la sangre superior al 90%.

La hialuronidasa según la presente invención es un producto derivado de la ingeniería genética; hasta el momento, no hubo disponibilidad de todo el gen que codifica la proteína, ya que no había banco genómico o de proteínas de la cepa de *S. koganeiensis*. Sólo con el método desarrollado por los inventores descritos en la presente memoria se ha identificado y aislado la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína. Este fragmento de nucleótidos es la primera secuencia de ADN aislada y documentada de esta cepa bacteriana. A nivel industrial, la posibilidad de poder obtener toda la secuencia del gen que codifica esta hialuronidasa con alta actividad enzimática permite su uso en diferentes sistemas tales como: vectores, sistemas de integración genómica y en células, ventajosos para la producción y el uso de la enzima en la industria farmacéutica.

10

Otro resultado sorprendente de la presente invención es el muy alto rendimiento del procedimiento reivindicado, que se desarrolló a través de una actividad de cribado compleja con diferentes vectores de expresión, diferentes tipos de inserción del fragmento nucleotídico que codifica la proteína en el vector de expresión (es decir, la inserción del fragmento con algunos sitios de restricción con respecto a otros) y el cribado de la producción en diferentes líneas celulares. Esta actividad, aún más compleja puesto que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína no estaba disponible; por lo tanto, no permitiendo aplicar lo que era conocido por el experto en la técnica, ha permitido la identificación del tipo más adecuado de clonación, tipo de vector y células de expresión para obtener una producción tan inesperadamente alta. La expresión y el modelo de producción de la proteína recombinante de acuerdo con la invención permite obtener, al final del proceso de purificación, una proteína pura con un nivel de endotoxina < 0,5 U/mg de proteína, usando solo tres etapas cromatográficas en lugar de 5 como se encuentra en el proceso conocido (endotoxinas > 0,5 U/mg de proteína) [9].

15

20

25 La enzima adecuadamente purificada se caracteriza por los ensayos cuyos resultados se enumeran en la tabla 4.

Tabla 4. Resultado de los ensayos de caracterización de la hialuronidasa recombinante producida según la presente invención a partir del clon rHyal\_Sk.

Análisis	Hialuronidasa recombinante
Secuenciación de N-terminal	1 mg/ml AGENGA
Ensayo de Proteínas Método (Lowry/BCA)	
ISDS-Page	> 99%
Enfoque Isoeléctrico Teórico I. P.5.5	90% (I. P. 5,2 + 0,4)
SEC - HPLC	100%
RP – HPLC	> 99%
Cartografía de péptidos (por LC - MS) Identidad con secuencia de aminoácidos de referencia	94% (<90%)
Ensayos patentados de HCP para Límite de <i>E. coli</i> <100 ppm	6,5-8,8 ppm
Sistema Umbral (Ensayos de ADN patentado para Límite de <i>E. coli</i> <300 pg/mg)	19 pg/mg
Chromo-LAL	< 0,5 U/mg
Coeficiente de Extinción Molar	12383 L*mol <sup>-1</sup> *cm <sup>-1</sup> ABS 280 (= 1 g/l) 0,570
Espectrometría de Masa de MW Teórico de Proteínas 21679,96	21679,98 ± 0,82

Análisis	Hialuronidasa recombinante
Electroforesis de Pureza En Capilar (Zona)	100%
Agregados moleculares (análisis UV250- 350 nm)	Sin agregado
Solución pH en (1x PBS)	~7,5

- 5 La hialuronidasa de acuerdo con la presente invención tiene la actividad y características de alta pureza que son necesarias para su uso en aplicaciones industriales, diagnósticas y terapéuticas. Además, en comparación con otras hialuronidasas conocidas hasta ahora, la hialuronidasa producida de acuerdo con la presente invención ha demostrado ser una enzima que es capaz de hidrolizar el ácido hialurónico presente en la matriz intersticial, incrementando la permeabilidad del tejido conectivo y favoreciendo la difusión y dispersión del fármaco, administrado localmente por vía subcutánea, en los tejidos circundantes con extrema estabilidad sin la posibilidad de ser digerido por las enzimas proteolíticas presentes en el tejido conectivo, lo que fácilmente podría degradarlo una vez inyectado, inhibiendo así su acción (figura 24).
- 10 En esta invención, gracias a la provisión de un modelo experimental in vitro utilizando el método turbidimétrico, se confirmó lo que ya había surgido de estudios clínicos previos, esto es, la actividad enzimática de hialuronidasa bovina (PH20 bovina) es inhibida por sangre humana y/o animal, pero se encontró, sin embargo, que la sangre humana y/o animal no inhibe la hialuronidasa a partir de *S. koganeiensis* recombinante (Fig. 25).
- 15 Por lo tanto, a partir de los estudios presentados en este documento se encontró que la hialuronidasa recombinante de la invención (producida de acuerdo con el método anterior o de *S. koganeiensis*) tiene una elevada actividad hialuronidasa, tiene una alta estabilidad frente a las enzimas proteolíticas y es capaz de realizar, con su biodisponibilidad máxima, la actividad total en el torrente sanguíneo sin posibilidad de infecciones bacterianas y virales. Por lo tanto, puede encontrar uso, solo o en combinación con otros principios activos, en la preparación de composiciones farmacéuticas o veterinarias destinadas al tratamiento de patologías donde es necesario o ventajoso
- 20 degradar el ácido hialurónico presente en el órgano o tejido afectado por la patología.
- Gracias a su alta estabilidad en solución acuosa, la hialuronidasa de la invención también puede formularse en forma de composiciones a base de agua tales como soluciones, cremas hidrófilas, hidrogeles, así como en forma de productos lipófilos tales como ungüentos o cremas aceitosas.
- 25 En un aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N° 17 que codifica la hialuronidasa bacteriana de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ. ID. No. 21.
- En otra realización, la presente invención se refiere a un vector recombinante modificado genéticamente que comprende dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. No. 17.
- Preferiblemente, dicho vector es un plásmido.
- 30 En otra realización, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende dicho vector.
- En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico o cosmético que comprende la hialuronidasa de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 en una forma purificada y que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ. ID. N° 21, obtenible a partir del método anterior o por extracción de *Streptomyces koganeiensis*.
- 35 En una realización adicional, la presente invención se refiere a la hialuronidasa de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 en una forma purificada y que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ. ID. No. 21, obtenible por el método anterior o por extracción de *Streptomyces koganeiensis*, para uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o trastorno, opcionalmente en combinación con al menos otro principio activo.
- 40 La hialuronidasa de la presente invención se puede aplicar tanto en el campo médico como en el campo veterinario. Preferentemente, la hialuronidasa de acuerdo con la invención es para uso en el tratamiento y/o la prevención de al menos uno de entre edemas, estados inflamatorios, sabañones, tumores sólidos, alergias mediadas por IgE, enfermedades de la cavidad oral, hemorragias vítreas espontáneas, arteriosclerosis, trastornos de la presión de la sangre, trastornos cardio-cerebrovasculares, tales como estenosis arterial cerebral o accidente cerebrovascular o mastitis bovina.
- 45 En lo que respecta al uso humano, sin pretender limitarse a él, la hialuronidasa de la invención puede utilizarse para la preparación de composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento de edemas, en particular edemas sobre una base traumática, o afecciones inflamatorias tales como el síndrome hemorroide; además, puede utilizarse para la preparación de composiciones destinadas al tratamiento de los sabañones. La hialuronidasa de la invención

también se puede usar en combinación con otros fármacos de los que es necesario o ventajoso aumentar la biodisponibilidad.

Por ejemplo, para el tratamiento de edemas sobre una base traumática, son particularmente ventajosas las combinaciones de la hialuronidasa de acuerdo con la invención con agentes anticoagulantes y/o fibrinolíticos. Tales combinaciones pueden contener también posiblemente uno o más agentes antiinflamatorios esteroideos o no esteroideos. Además, estas composiciones se pueden asociar ventajosamente con ácido hialurónico sulfatado, que se sabe que tiene, además de propiedades antiinflamatorias, también propiedades antitrombóticas y anticoagulantes. Las asociaciones de la hialuronidasa de acuerdo con la invención con otros principios activos son ventajosas también en el caso de preparaciones inyectables que contienen principios activos con un peso molecular particularmente alto, por ejemplo anticuerpos monoclonales, citoquinas, enzimas, ADN y nanopartículas de vehículo de fármaco que usualmente se administran por vía intravenosa; esta hialuronidasa permite la administración subcutánea de la misma, de acuerdo con el denominado procedimiento EASI (Infusión Subcutánea Enzimáticamente Aumentada), que se utiliza especialmente para la sustitución de fluidos en pacientes terminales, con el fin de restringir o evitar el cuidado de enfermería. La hialuronidasa según la invención también se puede utilizar para la preparación de composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento de tumores sólidos resistentes. De hecho, al degradar el ácido hialurónico, disminuye la presión de los fluidos intersticiales en la masa tumoral, aumentando así el flujo sanguíneo al tumor y aumentando así la eficiencia del transporte de agentes terapéuticos hacia su objetivo, lo que ralentiza o inhibe el crecimiento del tumor de manera más efectiva. Por la misma razón, también aumenta la eficacia de los principios activos anticancerosos posiblemente asociados a la misma. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen hialuronidasa en combinación con uno o más ingredientes activos contra el cáncer, tales como alcaloides Vinca (vinblastina, vincristina, vinorelbina) y taxanos (paclitaxel).

Otro uso terapéutico de la hialuronidasa de acuerdo con la invención se refiere al uso en el tratamiento de formas alérgicas mediadas por IgE con EPD ("Enzyme Potentiated Desensitization"), que consiste en la administración de dosis muy bajas de alérgenos para desensibilizar individuos sensibles a ellos. Al asociar la hialuronidasa con un alérgeno, es posible aumentar la eficacia del tratamiento, ya que el alérgeno alcanza más fácilmente el sitio de acción. Por lo tanto, un objeto adicional de la invención consiste en composiciones farmacéuticas que contienen hialuronidasa en asociación con uno o más alérgenos que inducen reacciones alérgicas mediadas por IgE. La hialuronidasa también se utiliza como factor de difusión de fármacos para uso dental en el tratamiento de enfermedades orales, tales como anestésicos locales y antibióticos; por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen hialuronidasa de acuerdo con la invención en asociación con uno o más anestésicos locales o antibióticos.

En oftalmología, la hialuronidasa permite acelerar en gran medida el tratamiento de hemorragias vítreas espontáneas y puede utilizarse, sola o en combinación con otros ingredientes activos, en la preparación de formas farmacéuticas para uso oftálmico tales como soluciones, suspensiones, geles, cremas y ungüentos, destinados para el tratamiento de tales hemorragias.

Estudios anteriores han demostrado la eficacia de la hialuronidasa en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares tales como la aterosclerosis [2] y en el control de la presión arterial [3]. Además, gracias a la capacidad de la hialuronidasa, producida de acuerdo con esta invención, de realizar la actividad total en el torrente sanguíneo sin ser inhibida, puede utilizarse también para terapias cardio-cerebrovasculares.

Por otra parte, en cuanto al uso veterinario, una enfermedad que puede ser tratada eficazmente con la hialuronidasa de la invención es la mastitis bovina; en este caso, la hialuronidasa se puede administrar en combinación con antibióticos, tales como penicilina G, cefalosporinas de generación I-IV y aminopenicilina mejorada. Gracias a su estabilidad en solución acuosa, la hialuronidasa de acuerdo con la invención se puede formular en productos acuosos; la elección entre una formulación de base acuosa y una formulación basada en aceite puede ser hecha por cualquier experto en la técnica basándose en el conocimiento común en el campo de la tecnología farmacéutica, según los otros ingredientes en la composición.

En una realización, la presente invención se refiere al uso no terapéutico de hialuronidasa en una forma purificada y que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ. ID. N° 21 u obtenible de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 o por el método anterior para aplicaciones cosméticas y/o para mejorar el aspecto estético.

La hialuronidasa también se usa en cosméticos para el tratamiento de reacciones granulomatosas o colocaciones incorrectas y no deseadas de ácido hialurónico, causadas por rellenos.

Además, hoy en día, después de estudios e investigaciones, se ha desarrollado un producto inyectable basado en hialuronidasa que puede mejorar drásticamente la afección de fibrosis presente en la celulitis. La hialuronidasa, al segmentar el componente fibrótico de la celulitis, la hace más suave con la reducción del efecto de piel naranja, dando así un aspecto más natural y agradable a la porción de piel tratada. En este caso, la hialuronidasa es apropiada para todas aquellas personas que sufren de celulitis o con poca presencia de masa grasa. Y hasta la

fecha, es la única terapia real capaz de oponerse a la celulitis con resultados satisfactorios en términos estéticos y/o terapéuticos.

La presente invención incluye hialuronidasa como se ha descrito anteriormente para el tratamiento y/o la prevención de la celulitis para fines tanto terapéuticos como no terapéuticos.

- 5 Finalmente, la hialuronidasa según la invención se puede usar como reactivo en ensayos bioquímicos para la determinación cualitativa/cuantitativa del ácido hialurónico.

Una realización de la presente invención se describe a continuación en un ejemplo dado con fines ilustrativos y no limitativos.

#### Ejemplo 1: Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

- 10 La cepa de *S. koganeiensis* se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC 31394). El material extracelular se obtuvo de las células de la bacteria como se describe anteriormente [9]. En resumen, se transfirió una colonia del microorganismo de placas de agar de medio 2 de ISP y se cultivó en 500 ml de medio de cultivo [20 g/l de extracto de levadura (Organotechnie) y 5 g/l de peptona de soja (Solabia) a pH 6,9] a 30°C, agitando a 150 rpm durante aproximadamente 16 horas. Después del crecimiento, se utilizó el cultivo para inocular un fermentador de 20 litros (Biostat U, B.BRAUN) que contenía 10 litros de tierra especial [(10 g/l de extracto de levadura (Organotechnie), 5 g/l de soja peptona (Solabia), 3 g/l de extracto de malta (Constantine), 3 g/l de dextrina de tipo I (Sigma), 0,2 g/l de antiespumante (Sigma)]. Antes de llevar a cabo la inoculación, el pH se llevó a 7,0 con NaOH; durante la fermentación, se monitorizó el pH, pero no se controló, y se mantuvo la temperatura a 30°C a lo largo de la fermentación, manteniéndose la agitación a 300 rpm, con una aireación de 1,6 VVM (litros de aire/litro de medio de fermentación/minuto). La fermentación tuvo una duración de 48 h, tiempo que coincidió con la máxima producción de actividad de la enzima hialuronidasa en el sobrenadante del cultivo. El cultivo se muestreó diariamente para evaluar el crecimiento, la viabilidad y la concentración de la hialuronidasa producida en el sobrenadante del cultivo mediante la determinación de la actividad enzimática por el método de Dorfman [10]. En varias etapas, se determinó la densidad celular por recuento bajo un microscopio, midiendo la densidad óptica a 600 nm y contando las colonias en placas de agar de medio 2 de ISP (Difco).

- 15 Las fracciones celulares se recogen cada 3-4 horas, donde se utiliza una parte para evaluar los niveles de ARN y ADN (Figura 1) por métodos estándar, utilizando el espectrofotómetro T60 UV-Vis (PG Instruments), la otra parte de la fracción se almacena a -80°C en Reactivo de Bacterias RNAprotect (Qiagen). Al final de la fermentación, el cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos a 4°C (Sorvall Evolution RC) y se filtró con filtros de polietileno de flujo tangencial de 0,2 µl para eliminar la biomasa de *Streptomyces oganeiensis* (que estaba en forma de agregados de hifa redondeados de 1-4 mm de diámetro) y para obtener un sobrenadante clarificado que contenga hialuronidasa. Posteriormente, el sobrenadante se concentró y se dializó por filtración tangencial como se describe anteriormente [9].

#### Ejemplo 2: Aislamiento en FPLC de hialuronidasa autóloga

- 35 El sobrenadante concentrado y dializado se purificó y se enriqueció con hialuronidasa sola como se describió previamente [9]. En pocas palabras, el aislamiento y la caracterización de la proteína se produjo utilizando un enfoque proteómico apoyado por un proceso basado en el uso de una combinación de columnas de cromatografía de intercambio iónico (GE Healthcare), en secuencia: CM-Sepharose FF, HiTrap Q XL y HiTrap SP FF, Resource Q. Las fracciones individuales eluidas de las columnas cromatográficas se ensayaron para determinar su actividad hialuronidasa más alta usando una dosificación enzimática y se analizaron en paralelo para determinar su contenido en proteínas mediante SDS-PAGE.

- 40 Determinación de la actividad de hialuronidasa. La actividad hialuronidasa se midió con el método de Dorfman modificado [10]. En resumen, el producto obtenido por el proceso cromatográfico se diluyó en tampón de fosfato 0,03 M, NaCl al 0,82%, pH 6,3 y se mezcló 1 ml de la solución así obtenida con 1 ml de tampón de sustrato (tampón de fosfato 0,03 M, NaCl 10,82%, pH 6,3) que contenía 0,5 mg de ácido hialurónico. La digestión enzimática se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos y al final del proceso de incubación, se generó turbidez mediante la adición de 4 ml de una solución ácida de suero de caballo (SIGMA). La densidad óptica a 640 nm se midió exactamente 30 minutos después de la adición de la solución ácida de suero de caballo. Se usó un patrón de hialuronidasa de testículos de mamífero (EDQM, FIP Hyaluronidase, H1115000) que contenía 328 UI/mg para construir una curva estándar y la actividad (en unidades) de las muestras se calculó usando esta curva.

#### Electroforesis y análisis en SDS-PAGE.

- 55 Los ensayos electroforéticos sobre gel de poli(acrilamida) en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) se llevaron a cabo usando el método de Laemmli [11] en gel de poli(acrilamida) al 12%, utilizando un Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El peso molecular de la proteína purificada se evaluó mediante comparación con proteínas estándar de bajo peso molecular (BIO-RAD). Los geles de poli(acrilamida) adecuadamente teñidos con Silver Stain Plus (BIO\_RAD) o Coomassie (BIO-RAD) después del proceso electroforético, fueron adquiridos por un dispositivo de captura de imágenes de laboratorio ImageQuant 300 TL (GE



Healthcare), mientras que los ensayos (cuantitativos y cualitativos) fueron realizados usando el software de análisis de imágenes ImageQuant TL (GE Healthcare).

#### Ejemplo 3: Secuenciación del N-terminal de fragmentos de proteínas internos

5 La secuenciación de aminoácidos N-terminal se llevó a cabo según el método de degradación de Edman utilizando un secuenciador de proteínas automatizado en fase líquida pulsada (ABI-Perkin Elmer Mod. 477A). Las búsquedas de homología se realizaron utilizando el software BLAST (Centro Nacional de Información de Biotecnología en la Biblioteca Nacional de Medicina (Bethesda, MD) [28], el servidor de búsqueda Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/>) y el software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Se utilizaron respectivamente el signalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>) y el Interproscan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) para realizar el análisis del sitio de escisión del péptido señal y para el análisis del dominio proteico.

10 La información relativa a la estructura primaria de la hialuronidasa aislada se determinó secuenciando la porción N-terminal de la proteína completa y los fragmentos obtenidos después de la digestión con tripsina, quimotripsina, Glu-C y la separación de los fragmentos producidos por HPLC.

15 A partir de la secuenciación N-terminal llevada a cabo, se identificaron la secuencia de aminoácidos N-terminal y la secuencia de aminoácidos de fragmentos internos, y se muestran a continuación en una secuencia:

- AGENGATTTFDGPVA (SEQ ID NO: 1)
- RFSADTTIEAAFIKTTSETIHAATYK (SEQ ID NO: 2)
- GYADGSDKDAAALSLDLR (SEQ ID NO: 3)
- AQVHIVQR (SEQ ID NO: 4)
- 20 - IGNAATVPTSVDSSGGG (SEQ ID NO: 5)

25 Se realizó una búsqueda en la base de datos con las secuencias identificadas y se identificó la homología de hialuronidasa de *S. koganeiensis* ATCC 31394 con una proteína predicha (protein\_id = ZP\_06911952.1) de *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486. Sobre la base de la secuencia N-terminal de los péptidos obtenidos a partir de la proteína aislada de acuerdo con esta invención, fue posible sintetizar los correspondientes oligonucleótidos, que sirvieron para aislar el gen que codificaba la hialuronidasa del genoma de *S. koganeiensis*.

#### Ejemplo 4: Identificación del nuevo gen de hialuronidasa

30 Se aisló el gen que codificaba la hialuronidasa a partir del ADN de células bacterianas de *Streptomyces koganeiensis*. En pocas palabras, los gránulos de las células bacterianas de la fermentación en el período de producción exponencial de hialuronidasa (Figura 1), se tratan para la extracción y purificación del ADN genómico usando el Kit DNeasy Tissue (Qiagen), mientras que el ARN se extrajo con el Mini Kit RNeasy (Qiagen). Se obtuvo una biblioteca de cDNA a partir del ARN total usando el kit MICROBExpress y el kit Poly (A) Tailing (Applied Biosystems) para aislar el ARNm (ARN mensajero) del ARN total y el kit de amplificación de cDNA SMART RACE (Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos así obtenidos se analizan cuantitativamente utilizando un espectrofotómetro T60 UV-Vis (PG Instruments) y cualitativamente mediante electroforesis en geles de agarosa [12].

35 Como se ha descrito en el párrafo anterior, se identificaron las regiones de aminoácidos idénticas entre *S. koganeiensis* y *S. pristinaespiralis*; se diseñaron los siguientes oligonucleótidos en regiones nucleotídicas que codifican estos residuos de aminoácidos idénticos mediante el uso de herramientas en línea y un codón de uso bacteriano genérico: MesFor2 (5'-GGAGAACGGGGCGACGACGACGTTTCG-3' (SEQ ID NO: 6)) correspondiente al péptido presente en el área N-terminal (ENGATTTF), el MesRev2 antisentido (5'-GTCGGCACCGTCGCCGCGTCCCGAT-3' (SEQ ID NO: 7)) correspondiente al péptido presente en el área C-terminal (IGNAATVP).

40 Con estos dos oligonucleótidos y sólo en el ADN genómico como molde, se realizaron varias reacciones de PCR con la polimerasa KOD (Toyobo), experimentando diferentes condiciones de temperatura y utilizando o no DMSO al 4%. Al final de las diversas etapas de procesamiento, se obtuvo un producto de PCR específico (condiciones: desnaturalización inicial 95°C 5 min, 96°C 40 s, 55°C, 30 s de recocido, 72°C 1 min de extensión, durante 40 ciclos y 72°C 10 min), de hecho, la PCR sólo amplifica una banda específica de aproximadamente 550 pb. El contiguo de los dos procesos de secuenciación del fragmento dio la secuencia (SEQ ID NO: 8) mostrada en la Fig. 2. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Dada la homología entre las secuencias de nucleótidos de *S. koganeiensis* y *S. pristinaespiralis*, se prestó atención a las regiones no codificantes que flanqueaban el gen que se analizaba.

De la fuente en línea [http://www.broadinstitute.org/annotation/genoma/streptomyces\\_group/GenomeDescriptions.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genoma/streptomyces_group/GenomeDescriptions.html), se identificaron las regiones flanqueantes del gen de *S. pristinaespiralis*, en el que se diseñaron dos oligonucleótidos (MesExrF: 5'-

cgggagaagggtgaacgc-3' (SEQ ID NO: 9) y MesExtR: 5'-ctccgcgaccagtcttcg-3' (SEQ ID NO: 10)) que se utilizarán en la PCR sobre la plantilla de ADN genómico de *S. koganeiensis*. Las condiciones de PCR se definieron a partir del paso anterior, manteniendo una temperatura de desnaturalización más alta (96°C) debido al alto contenido de GC de los genomas bacterianos.

5 Dados los resultados no específicos, se decidió tratar de utilizar estos oligonucleótidos en combinación con MesFor2 (SEQ ID NO: 6) y MesRev2 (SEQ ID NO: 7) usados previamente y que dieron el producto de PCR esperado. Se encontró que sólo la amplificación con el oligo MesFor2 y MesExtR dio un producto claro del tamaño esperado; por secuenciación con los dos cebadores usados en la amplificación, se identificó la región 3' del gen analizado. Se desarrolló y realizó la técnica de PCR inversa (IPCR) para identificar las regiones nucleotídicas cadena arriba de la secuencia génica identificada hasta la fecha (Fig. 3). El método IPCR se realizó mediante las siguientes etapas de procesamiento:

a) Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción. Se establecieron tres reacciones diferentes de digestión enzimática con las enzimas KpnI NARI y NotI, de aproximadamente 100 ng de ADN genómico de *S. koganeiensis*.

b) Ligadura del ADN digerido.

15 c) Amplificación mediante PCR usando las reacciones de ligación como molde, con oligonucleótidos que se hibridan dentro de la región conocida hasta la fecha que codifica la hialuronidasa de *S. koganeiensis*.

Los oligonucleótidos utilizados son los siguientes:

MesINTf (5'-GGCATCTACGTCACGGCGACGAAC-3' (SEQ ID NO: 11)) y el MesINTR antisentido (5'-CGTACCCGCGGTGGGTGATCTTCAG-3' (SEQ ID NO: 12)).

20 Las preparaciones digeridas con KpnI y Nari dieron productos de PCR, respectivamente, de aproximadamente 700 y 1400 pb, que una vez secuenciados proporcionan información exacta sobre la región 5' que flanquea el gen de la hialuronidasa de *S. koganeiensis*. Con este paso, se completa la identificación de la secuencia de nucleótidos de interés (SEQ ID NO: 13), mostrada en (figura 4).

25 Un par de cebadores diseñados sobre las secuencias no codificantes (directo: 5'-accattcggagtgatcggtg-3' (SEQ ID NO: 14), inverso: 5'-gtcaactgcactgttctctcc-3' (SEQ ID NO: 15)) y que flanquean todo el gen que codifica la hialuronidasa se utilizan para la amplificación de todo el gen. El producto de PCR obtenido cuya secuencia obtenida después de la secuenciación (SEQ ID NO: 16) se muestra en (figura 5), se escinde del gel después de la electroforesis, se purifica usando el sistema Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega) y se clona directamente en el vector pCR®-BluntII-TOPO® (Invitrogen) en células de *E. coli*. Posteriormente, los clones que se encontraron positivos (pCR-BluntII-TOPO [skJHYAL]) en la PCR para detectar la presencia del plásmido que contenía el gen de la hialuronidasa se analizaron por secuenciación.

Análisis de la secuencia de proteínas deducida.

35 Se utilizó el software BLAST para realizar búsquedas de homología en la base de datos GenBank. Mientras que el software ExpASY Translate Tool, disponible en la web, se utilizó para permitir la traducción in silico de la secuencia de nucleótidos del gen aislado que codifica la hialuronidasa de *S. koganeiensis* en la secuencia de proteínas. Finalmente, el dominio conservado para la actividad de hialuronidasa se verificó mediante el software InterProScan disponible en el sitio web (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) (Figura 7 (a)). A partir de los resultados obtenidos se observó que toda la longitud del gen que codificaba la hialuronidasa de *S. koganeiensis* era de 744 pb (SEQ ID NO: 17) y se estimó que la longitud de la secuencia peptídica en 247 aminoácidos (SEQ ID NO: 18). El gen contiene un dominio putativo (SEQ ID NO: 19) de proteínas pertenecientes a la familia de hialuronidasas (Hyaluronidase\_1), como se evidencia por la búsqueda de homologías en la base de datos Pfam. Además, el análisis de la secuencia (SEQ ID NO: 18) usando la herramienta específica <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-1.1/> indicó la presencia de una secuencia señal (péptido señal) de 30 aminoácidos (aminoácidos de 1 a 30 (SEQ ID NO: 47)) con el sitio de escisión entre los aminoácidos 30 y 31). La proteína madura (SEQ ID NO: 21) tiene entonces 217 aminoácidos de longitud (correspondiente a la secuencia de nucleótidos 651bp (SEQ ID NO:22)) y se predice su peso molecular (utilizando las herramientas disponibles en el sitio [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) en 21679,96 Da. Por último, el análisis de BLAST para homologías de secuencia muestra una homología entre la secuencia de aminoácidos determinada para la hialuronidasa *S. koganeiensis* ATCC 31394 (SEQ ID NO:18) y las secuencias de aminoácidos informadas en la base de datos en la red: homología con la secuencia de aminoácidos de la proteína Hialuronoglucosaminidasa (predicha a partir del análisis de los marcos de lectura abiertos partiendo del locus genómico descrito en la red con el código YP\_006266806.1) de *Actinoplanes* sp. mostrando una identidad del 68%/similitud del 78%, homología con la secuencia de aminoácidos de la proteína predicha ZP\_06911952.1 (predicha por el análisis de los marcos de lectura abiertos partiendo del locus genómico descrito en el código web ZP\_06911952.1) de *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486 con 66% de identidad/77% de similitud (SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 48) y homología con la secuencia de aminoácidos de la proteína hipotética STSU\_30255 (predicha a partir del análisis de los marcos de lectura abiertos partiendo del locus genómico descrito en la web con el código ZP\_10072726.1) de *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488 (SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 49) con un 66% de identidad/80% de similitud (Figura 6a, b). Dada la similitud significativa del dominio funcional (SEQ ID NO:

25 y SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 51) observado con la hialuronidasa descrita por esta invención (SEQ ID NO: 19), la totalidad de la secuencia de nucleótidos de CDS que codifica estas proteínas, que se definen en la red con la terminología de "hipotética o "predicha", se aisló del locus genómico original y se caracterizó, permitiendo identificarlos, por primera vez, en esta invención como hialuronidasa (figura 7 (b)). Sin embargo, ninguno de estos análisis encontró la secuencia completa de nucleótidos exacta y la secuencia de aminoácidos de la hialuronidasa aislada según la patente descrita en la bibliografía.

Una homología de secuencia estaba presente entre una región de la secuencia (SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 52) de hialuronidasa de *S. koganeiensis* de acuerdo con la invención y uno de los módulos presentes en el dominio de aminoácidos de Cd44 murino que se une al ácido hialurónico (Fig.7 (a)).

#### 10 Ejemplo 5: Clonación del gen que codifica la hialuronidasa en pHT43 (+)

El ADNc que codifica la hialuronidasa de *S. koganeiensis* (SEQ ID NO: 41) se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pCR-BluntII-TOPO [sk\_HYAL] extraído y purificado a partir de células de *E. coli* con DNA Purification System Wizard Plus SV Minipreps y usando los siguientes cebadores: sentido (5'-gtaGGATCCGCCGGGAGAACGGCGCGACGACGA-3' SEQ ID NO: 28); antisentido (5'-gacTCTAGATCACGCCGGTGCATCGTCGTGACC-3' SEQ ID NO: 29). Los ciclos de PCR realizados para la amplificación fueron: desnaturalización inicial a 96°C durante 5 minutos; 30 ciclos de hibridación a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto y después la desnaturalización a 96°C durante 40 segundos. La Taq ADN polimerasa utilizada para la amplificación fue DyNAzyme II DNA Polymerase (Finnzymes) (Fig. 8). El producto amplificado (672 pb) se purificó mediante el Kit Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega), digerido con BamHI (BioLabs) y XbaI (BioLabs) y se ligaron usando ligasa T4 (Ambion) con el vector pHT43 (+) previamente digerido con BamHI y XbaI (Fig. 8). Una vez que tuvo lugar la ligasa, el vector se transformó dentro de las células DH5a de la cepa *E. coli* (código Invitrogen 12297-016) por tratamiento químico. Las células después de la transformación se sembraron en agar LB que contenía ampicilina (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante 16 h. Se analizaron las colonias obtenidas para verificar la ligasa correcta producida entre el fragmento del gen de la hialuronidasa y el vector por PCR (desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, durante 30 ciclos: recocado a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 60 segundos y después la desnaturalización a 94°C durante 1 minuto), gracias a la ayuda de cebadores específicos del vector (Directo: 5'-TGTGGAATTGTGAGCGGATA-3' (SEQ ID NO: 30), Inverso: 5'-TTTCAACCATTTGTTCCAGGT-3' (SEQ ID NO: 31)). El producto de la PCR obtenido (927 pb) junto con los productos obtenidos por digestión del vector pHTsk\_HYAL [vector con inserto] (Figura 10) con enzimas de restricción (BamHI, XbaI) se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 9), utilizando las normas de referencia para el peso molecular (ΦX174 DNA y λDNA/HindIII de Fermentas). Para el análisis del marco correcto del gen que codifica la hialuronidasa después de haber sido ligada con el vector, se secuenció la secuencia del producto de PCR. La secuencia de nucleótidos obtenida (SEQ ID NO: 38) después de la secuenciación (Figura 13, a) se analiza utilizando herramientas bioinformáticas tales como ClustalW, Traslate (ExpASY) y Chromas life.

#### 35 Ejemplo 6: Clonación del gen que codifica la hialuronidasa en pET22b (+)

El ADNc que codifica la hialuronidasa de *S. koganeiensis* (SEQ ID NO: 41) se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pCR-BluntII-TOPO [sk\_HYAL] extraído y purificado a partir de células de *E. coli* con DNA Purification System Wizard Plus SV Minipreps y utilizando los cebadores siguientes: sentido (5'-tggCCATGGCCGGGAGAACGGCGCGACGACGA-3' (SEQ ID NO: 32)); antisentido (5'-ctcGAATTCtcaCGCCGGTGCATCGTCGTGACC-3' (SEQ ID NO: 33)). Los ciclos de la PCR realizados para la amplificación fueron: desnaturalización inicial a 96°C durante 5 minutos; 30 ciclos de recocado a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto y después la desnaturalización a 96°C durante 40 segundos. La Taq ADN polimerasa utilizada para la amplificación fue DyNAzyme II DNA Polimerasa (Finnzymes) (Fig. 8). El producto amplificado (671 pb) se purificó mediante el Kit Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega), digerido con NcoI (BioLabs) y EcoRI (BioLabs), y se ligó usando ligasa T4 (Ambion) con el vector pET22b (+) previamente digerido con NcoI y EcoRI (Fig. 8). Una vez que la ligasa tuvo lugar, el vector se transformó en células DH5a de la cepa de *E. coli* (Código Invitrogen 12297-016) por tratamiento químico. Las células después de la transformación se sembraron en agar LB que contenía ampicilina (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante 16 h. Se analizaron las colonias obtenidas para verificar la ligasa correcta producida entre el fragmento del gen de la hialuronidasa y el vector por PCR (desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, durante 30 ciclos: recocado a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 60 segundos y después la desnaturalización a 94°C durante 1 minuto), gracias a la ayuda de cebadores específicos del vector (T7-promotor: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO: 34), T7-terminador: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (SEQ ID NO: 35)). El producto de la PCR obtenido (940 pb) junto con los productos obtenidos por digestión del vector pHyal\_sk [vector con inserto] (Fig. 11) con enzimas de restricción (NcoI, EcoRI), se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 9), utilizando los patrones de referencia para el peso molecular (ΦX174 DNA y λDNA/HindIII de Fermentas). Para el análisis del marco correcto del gen que codifica la hialuronidasa después de haber sido ligada con el vector, se secuenció la secuencia del producto de PCR. La secuencia de nucleótidos obtenida (SEQ ID NO: 39) después de la secuenciación (Figura 13, b) se analiza utilizando herramientas bioinformáticas tales como ClustalW, Traslate (ExpASY) y Chromas life.

#### 60 Ejemplo 7: Clonación del gen que codifica la hialuronidasa en pET21b +

El ADNc que codifica la hialuronidasa de *S. koganeiensis* (SEQ ID NO: 41) se amplificó por PCR a partir del plásmido pCR-BluntII-TOPO [sk\_HYAL] extraído y purificado de células de *E. coli* con DNA Purification System Wizard Plus SV Minipreps y utilizando los cebadores siguientes: sentido (5'-aCATATGGCCGGGAGAACGGCGCGACGACGA-3' (SEQ ID NO: 36)); antisentido (5'-ctcGAATTcCaCGCCGGTGCATCGTCGTGACC-3' (SEQ ID NO: 37)). Los ciclos de la PCR realizados para la amplificación fueron: desnaturalización inicial a 96°C durante 5 minutos; 30 ciclos de recocido a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto y después la desnaturalización a 96°C durante 40 segundos. La Taq ADN polimerasa utilizada para la amplificación fue DyNAzyme™ II DNA Polimerasa (FINNZYME) (Fig. 8). El producto amplificado (672 pb) se purificó mediante el Kit Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega), digerido con NdeI (BioLabs) y EcoRI (BioLabs), y se ligó usando T4 ligasa (Ambion) con el vector pET21b (+) (Novagen) previamente digerido con NdeI y EcoRI (Fig. 8). Una vez que tuvo lugar la ligasa, el vector se transformó dentro de las células DH5a de la cepa *E. coli* (código Invitrogen 12297-016) por tratamiento químico. Las células después de la transformación se sembraron en agar LB que contenía ampicilina (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante 16 h. Las colonias obtenidas se analizaron para verificar la ligasa correcta producida entre el fragmento del gen de la hialuronidasa y el vector por PCR (desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, para 30 ciclos: recocido a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 60 segundos y después la desnaturalización a 94°C durante 1 minuto), gracias a la ayuda de cebadores específicos de vector (promotor T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO: 34), terminador T7: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (SEQ ID NO: 35)). El producto de la PCR obtenido (874 pb) junto con los productos obtenidos por digestión del vector pHyal\_sk\_SL [vector con inserto] (figura 12) con enzimas de restricción (NdeI, EcoRI), se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Fig. 9), utilizando las normas de referencia para el peso molecular (ΦX174 DNA y λDNA/HindIII de Fermentas). Para el análisis del marco correcto del gen que codifica la hialuronidasa después de haber sido ligada con el vector, se secuenció la secuencia del producto de PCR. La secuencia de nucleótidos obtenida (SEQ ID NO: 40) después de la secuenciación (Figura 13, c) se analiza utilizando herramientas bioinformáticas tales como ClustalW, Traslate (ExpASY) y Chromas life.

Ejemplo 8: Cepas bacterianas hospedantes usadas para la clonación y la expresión del gen de hialuronidasa de *S. koganeiensis*.

Se utilizó DH5α de la cepa *Escherichia coli* (Invitrogen, Genotipo: F-φ80lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA (confiere resistencia al fago T1) [22], como huésped para la amplificación del plásmido del sistema de clonación. Esta cepa es proporcionada por Invitrogen (One Shot Max Efficiency DH5α-T1R, *E. coli* químicamente competente, 12297-016). Las células se descongelaron y se cultivaron en medio sólido agar LB (10 g/l de peptona de caseína, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl, 15 g/l de agar bacteriológico) que contenía MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se cultivaron durante 18 h a 37°C. A partir del cultivo resultante, se toma una sola colonia y se cultiva en caldo TYM (triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, 20 ml de NaCl 5 M, MgSO<sub>4</sub> 1 mM) a 37°C. A partir del cultivo, las células resultantes se tratan químicamente para obtener células químicamente competentes. Las células obtenidas se reparten y se almacenan a -80°C en un tampón de almacenamiento apropiado que contiene 15% de glicerol. Las transformaciones se realizan sobre este stock de alícuotas.

*B. subtilis* WB800N (Genotipo: nprE aprE epr bpr mpr :: ble nprB :: bsr vpr wprA :: hyg cm :: neo; NeoR [23]), proporcionado por MOBITEC, es una cepa bacteriana gram-positiva caracterizada por un déficit de ocho proteasas, como resultado es una cepa bacteriana que se utiliza para la producción de proteínas heterólogas secretadas. El gen de resistencia a la neomicina también se insertó en este gen, tomando la nomenclatura de WB800N. Las células de esta cepa bacteriana después de una producción apropiada se hicieron competentes, se repartieron y se almacenaron a -80°C en un tampón de almacenamiento apropiado que contenía glicerol al 15%. Las transformaciones se realizan sobre este stock de alícuotas.

La cepa MG1655 de *Escherichia coli* (número ATCC: 12297-016, genotipo: F-lambda- [24, 25]), se usó como huésped en el sistema de expresión del gen de hialuronidasa de *S. koganeiensis*. La cepa bacteriana es proporcionada por la American Type Culture Collection (ATCC). Las células liofilizadas se cultivaron en primer lugar en pocos ml de medio líquido y luego en medio sólido LB agar (10 g/l de peptona de caseína, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl) que contenía MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se cultivó durante 18 h a 37°C. A partir del cultivo resultante, se toma una sola colonia y se cultiva en caldo TYM a 37°C. A partir del cultivo, las células resultantes se tratan químicamente para obtener células químicamente competentes. Las células obtenidas se reparten y se almacenan a -80°C en un tampón de almacenamiento apropiado que contiene 15% de glicerol. Las transformaciones se realizan sobre este stock de alícuotas.

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (*E. coli* BF-dcm ompT HSDS (rB-mB-) gal λ (DE3) [26, 27]), como huésped para el sistema de expresión del gen que codifica la hialuronidasa de *S. koganeiensis*. La cepa bacteriana es proporcionada por Novagen con el código 69450-3. Las células se cultivaron en primer lugar en pocos ml de medio líquido y luego en medio sólido agar LB (10 g/l de peptona de caseína, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl) que contenía MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se cultivó durante 18 h a 37°C. A partir del cultivo resultante, se toma una sola colonia y se cultiva en caldo TYM a 37°C. A partir del cultivo, las células resultantes se tratan químicamente para obtener células químicamente competentes. Las células obtenidas se reparten y se almacenan a -80°C en un

tampón de almacenamiento apropiado que contiene 15% de glicerol. Las transformaciones se realizan sobre este stock de alícuotas.

Ejemplo 9: Transformación de plásmidos pHTsk\_HYAL, pHyal\_sk y pHyal\_sk\_SL en células de expresión.

5 Las células DH5a que contenían respectivamente los vectores pHTsk\_HYAL, pHyal\_sk y pHyal\_sk\_SL se pusieron en cultivo en aproximadamente 6 ml de caldo LB con ampicilina (50 µg/ml) y se cultivaron durante 16-18h. Los cultivos respectivos después del crecimiento de las células modificadas se centrifugaron a aproximadamente 5000 g durante 10 minutos. Los plásmidos respectivos pHTsk\_HYAL, pHyal\_sk y pHyal\_sk\_SL se extrajeron y purificaron a partir del gránulo obtenido utilizando el kit Wizard Plus SV minipreps DNA Purification System (Promega). Los vectores purificados pHTsk\_HYAL, pHyal\_sk y pHyal\_sk\_SL se transforman por separado en células de expresión.

10 El primer vector se transforma en células, hechas competentes, de *Bacillus subtilis* (WB800N-MOBITEC) mientras que los otros dos vectores se transforman en células, hechas competentes, de *E. coli*, cepa BL21 (DE3) y/o MG1655. Todas las transformaciones se llevaron a cabo mediante el tratamiento químico [13]. Las células de *B. subtilis* y *E. coli* después de la transformación, respectivamente, se colocan en agar LB que contiene cloranfenicol (10 µM) más neomicina (10 µM) y en agar LB que contiene ampicilina (50 µg/ml) para desarrollar resistencia al antibiótico, y se incuban a 37°C durante 16 h. Las colonias obtenidas después de las respectivas transformaciones se analizaron para verificar la presencia del plásmido correcto dentro de las células de expresión, mediante PCR (desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, durante 30 ciclos: recocado a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 60 segundos y después la desnaturalización a 94°C durante 1 minuto), gracias a la ayuda de cebadores específicos de especie (Directo: 5'-TGTGGAATTGTGAGCGGATA-3' (SEQ ID NO: 30), Inverso: 5'-TTTCAACCATTGTTCCAGGT-3' (SEQ ID NO: 31)) para el análisis de la transformación exitosa en *B. subtilis* y para verificar la transformación exitosa en *E. coli*. (Promotor T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO:34), terminador T7: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (SEQ ID NO: 35)). Los productos de la PCR obtenidos para las células transformadas con pHTsk\_HYAL (927 pb), pHyal\_sk (940 pb) y pHyal\_sk\_SL (874 pb) se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% usando patrones de referencia para el peso molecular (ΦX174 DNA y λDNA/HindIII de Fermentas). Para el análisis del marco correcto del gen que codifica la hialuronidasa después de enlazarse al vector, se secuenció la secuencia de los productos de la PCR. La secuencia de nucleótidos obtenida después de la secuenciación se analiza utilizando herramientas bioinformáticas tales como el Vector NTI Advance 9 (Invitrogen), ClustalW, Traslate (ExpASy) y Chromas life. (Figura 13a, b, c).

20

25

Ejemplo 10: Evaluación del nivel de expresión de la hialuronidasa recombinante.

30 Los clones de *B. subtilis* resultaron ser positivos para la presencia de vectores que contienen el fragmento de nucleótidos de hialuronidasa encontrado genéticamente con la secuencia de marco para la expresión correcta (SEQ ID NO: 41), se ensayan para el nivel de expresión y luego las células así modificadas se inoculan en frascos que contienen 500 ml de caldo LB con cloranfenicol (10 µM, Sigma) y neomicina (10 µM, Sigma), y se incuban a 37°C a 250 rpm. Cuando el valor del crecimiento celular alcanza una OD600nm de 0,8, se llevan con IPTG (Sigma, 16758) a una concentración final de 1 mM. Después de 12 horas de inducción, el cultivo bacteriano se centrifuga a 7500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante del cultivo se recoge para evaluar la expresión en *B. subtilis*.

35

Posteriormente, el sobrenadante de los ensayos de expresión en *B. subtilis* se concentró (20 veces) y se dializó en tampón fosfato 1x mediante ultrafiltración en filtros especiales de polietersulfona con un corte de 5 kD.

40 En SDS-PAGE, el recombinante expresado tenía un peso molecular de aproximadamente 24 kDa con la expresión máxima después de la inducción con IPTG 1 mM a OD600nm 0,8 después de 12 horas a 37°C.

La expresión y localización de la expresión de hialuronidasa en las células de *B. subtilis* (SEQ ID NO: 21), en los diferentes clones analizados, se determinó por electroforesis en SDS-PAGE (12%) después de tinción con Azul de Coomassie Brilliant G-250 (BIO-RAD, 161 - 0406) y con un ensayo enzimático apropiado, por ejemplo, el ensayo de Dorfman.

45 Ejemplo 11: Evaluación del nivel de expresión de hialuronidasa recombinante en *E. coli*

Los clones de *E. coli* resultaron ser positivos para la presencia respectiva de vectores que contienen el fragmento nucleotídico de hialuronidasa encontrado genéticamente con la secuencia de marco (SEQ ID NO: 41) para la expresión correcta (SEQ ID NO: 21) se analizaron para detectar el nivel de expresión, se inocularon en matraces que contenían 500 ml de caldo LB con ampicilina (50 g/ml, Sigma) y se incubaron a 37°C a 250 rpm. Cuando el valor de crecimiento celular alcanza OD600nm 0,8, se llevan con IPTG (Sigma, 16758) a una concentración final de 1 mM. Las células bacterianas se cosechan después de 3-4 horas de inducción, por centrifugación a 7500 rpm durante 10 minutos. Después de la centrifugación, el sedimento bacteriano se recoge para la evaluación de la expresión en células modificadas de *E. coli* y para verificar en qué porción de la célula se produce el recombinante.

50

Posteriormente, los gránulos procedentes de las células de *E. coli* inducidas con IPTG se trataron con la Proteína Bacteriana B-PER (PIERCE) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el proveedor, para evaluar la expresión de hialuronidasa en la porción periplásmica y/o citoplásmica y/o para formar cuerpos de inclusión. Ambos clones de *E. coli* que contenían respectivamente los plásmidos pHyal\_sk y pHyal\_sk\_SL expresaron el recombinante en forma soluble en la porción periplásmica:

55

E. coli BL21 (DE3) que contiene pHyal\_sk. En SDS-PAGE, el recombinante expresado tiene un peso molecular de aproximadamente 24 kDa, constituyendo aproximadamente 40% de las proteínas bacterianas totales después de la inducción a OD<sub>600nm</sub> 0,8 con IPTG 1 mM durante 3-4 horas a 37°C. Sin embargo, de la cantidad de recombinante expresado, sólo el 18% (sólo 7,2% en total) está presente en forma soluble en el periplasma, el 82% restante tiene

5 cuerpos de inclusión (sólo 32,8% en total). La porción soluble periplásmica resulta estar presente a una concentración máxima de 52 µg/ml de cultivo, con una actividad enzimática igual a aproximadamente 2100 U/ml de cultivo.

E. coli BL21 (DE3) que contiene pHyal\_sk\_SL. En SDS-PAGE, el recombinante expresado tiene un peso molecular de aproximadamente 24 kDa, que constituye aproximadamente el 15% de las proteínas bacterianas totales después de la inducción a DO 600 nm 0,8 con IPTG 1 mM durante 3-4 horas a 37°C. Además, toda la proteína expresada está presente en forma soluble en el periplasma. La porción soluble periplásmica resultó estar presente a una concentración de aproximadamente 125 µg/ml de cultivo, con una actividad enzimática mayor que 5000 U/ml de cultivo.

10

Tanto la expresión como la localización de la expresión de hialuronidasa en las células de E. coli en los diferentes clones analizados se determinó por electroforesis en SDS-PAGE (12%) después de tinción con Azul de Coomassie Brilliant G-250 (BIO-RAD, 161 -0406) y con un ensayo enzimático apropiado, por ejemplo el ensayo de Dorfman.

15

Ejemplo 12 Desarrollo del banco de células maestras y el banco de células de trabajo de cepas recombinantes

Banco de Células Maestras (MCB)

Bajo esterilidad, se tomó una única colonia de las colonias pertenecientes a la cepa productora y se resuspendió en un matraz estéril que contenía 10 ml de medio líquido (caldo LB con cloramfenicol (10 µM, Sigma) y neomicina (10 µM, Sigma) con respecto a las células recombinantes de B. subtilis y caldo LB con ampicilina (50 µg/ml, Sigma) con respecto a las células recombinantes de E. coli) y se incubaron a 200 rpm a 37°C durante aproximadamente 16 horas. Después del periodo de incubación y después de los controles adecuados sobre la esterilidad del cultivo, se transfirieron respectivamente 10 ml de cada cultivo en 100 ml de medio líquido (caldo LB con cloramfenicol (10 µM, Sigma) y neomicina (10 µM, Sigma) en lo que respecta a las células recombinantes de B. subtilis y caldo LB con ampicilina (50 µg/ml, Sigma) con respecto a las células recombinantes de E. coli) y se incubaron durante 5-6 horas a 37°C a 200 rpm. De nuevo, después del período de incubación y después de los controles apropiados sobre la esterilidad del cultivo, se añadió una cantidad de glicerol estéril a cada cultivo hasta alcanzar una concentración final de glicerol igual al 15%. La mezcla se agita y se introducen alícuotas de 2 ml en viales criogénicos (CORNING, 430659) que se colocan inmediatamente a -80°C.

20

25

30

El desarrollo del banco de células maestras se realizó en condiciones estériles para las cepas: cepa B. subtilis (WB800N-MoBitec) que contenía el plásmido diseñado con pHTsk\_HYAL (clon 105), cepa E. coli (DH5α) que contenía el plásmido modificado con pHTsk\_HYAL (clon 105), la cepa E. coli (DH5 α) y E. coli (BL21 (DE3)) que contiene el plásmido diseñado con pHyal\_sk (clon 413), cepa E. coli (DH5α) y E. coli (BL21 (DE3)) que contiene el plásmido modificado con pHyal\_sk\_SL (clon 225) y cepa E. coli (DH5 α) y E. coli (BL21 (DE3)) que contiene el plásmido modificado con pRH\_sk (clon 600).

35

Banco de células de trabajo (WCB)

Bajo esterilidad, se tomó una alícuota de un vial del banco de células maestras y se ensayó en caldo LB de medio sólido con cloramfenicol (10 µM, Sigma) y neomicina (10 µM, Sigma) con respecto a las células recombinantes de B. subtilis y caldo LB con ampicilina (50 µg/ml, Sigma) o canamicina (30 µg/ml, SIGMA) con respecto a las células recombinantes de E. coli) y se incubaron a 200 rpm a 37°C durante aproximadamente 18 horas. Bajo cubierta estéril, se tomó una única colonia de las colonias pertenecientes a la cepa productora y se resuspendió en un matraz estéril que contenía 10 ml de medio líquido (caldo LB con cloramfenicol (10 µM, Sigma) y neomicina (10 µM, Sigma) con respecto a las células recombinantes de B. subtilis y caldo LB con ampicilina (50 µg/ml, Sigma) o canamicina (30 µg/ml, SIGMA) con respecto a las células recombinantes de E. coli) y se incubaron a 200 rpm a 37°C durante aproximadamente 16 horas. Después del período de incubación y después de controles adecuados sobre la esterilidad del cultivo, se transfirieron respectivamente 10 ml de cada cultivo en 100 ml de medio líquido (caldo LB con cloramfenicol (10 µM, Sigma) y neomicina (10 µM, Sigma) con respecto a las células recombinantes de B. subtilis y caldo LB con ampicilina (50 µg/ml, Sigma) o canamicina (30 µg/ml, SIGMA) en lo que respecta a las células recombinantes de E. coli) y se incubaron durante 5-6 horas a 37°C a 200 rpm. De nuevo, después del período de incubación y después de los controles apropiados sobre la esterilidad del cultivo, se añadió una cantidad de glicerol estéril a cada cultivo hasta alcanzar una concentración final de glicerol igual al 15%. La mezcla se agita y se introducen alícuotas de 2 ml en viales criogénicos (CORNING, 430659) que se colocan inmediatamente a -80°C.

40

45

50

El desarrollo del banco de células de trabajo se llevó a cabo con la máxima esterilidad y para las cepas: cepa B. subtilis (WB800N-MoBitec) que contenía el plásmido modificado con pHTsk\_HYAL (clon de hialuronidasa 105), E. coli (BL21 (DE3)) que contenía el plásmido diseñado con pHyal\_sk (clon de hialuronidasa 413), cepa E. coli (BL21 (DE3)) que contiene el plásmido modificado con pHyal\_sk\_SL (clon rHyal\_Sk) y para la cepa E. coli (BL21 (DE3)) que contiene el plásmido modificado genéticamente con pRH\_sk (clon rH\_sk).

55

Los ensayos siguientes se realizaron tanto en MCB como en WCB para evaluar su pureza: evaluación del número de copias del plásmido de las células de MCB y WCB, análisis del plásmido por enzimas de restricción y separación de los fragmentos digeridos con gel de agarosa al 1%, evaluación de la conservación del glicerol en células que contienen el plásmido de expresión en el MCB y WCB, evaluación de la estabilidad de las células que contienen el plásmido de expresión en el MCB y WCB, viabilidad de células recombinantes en placas LB, identidad de las cepas E. coli, pureza del cultivo, ensayo de fagos Coli, evaluación del producto de expresión en SDS-PAGE, secuenciación de la región que codifica la proteína recombinante.

Ejemplo 13: Fermentaciones discontinuas de hialuronidasa recombinante.

La capacidad de los clones de E. coli BL21 (DE3) - pHyal\_sk y BL21 (DE3) - pHyal\_sk\_SL para producir la hialuronidasa recombinante se evaluó por crecimiento en fermentadores por cultivo discontinuo.

El inóculo se prepara inoculando un vial (del banco de células de trabajo almacenado a -80°C) en 400 ml de medio LB fresco (relación 1/20 con respecto al volumen de fermentación) que contiene 50 µg/ml de ampicilina y se incuba a 37°C a 150 rpm durante 16 - 18 horas. Los clones de los respectivos inóculos (E. coli BL21 (DE3) -pHyal\_sk y BL21 (DE3) - pHyal\_sk\_SL) se cultivaron por separado en el fermentador en un medio de cultivo mínimo cuya composición por litro se proporcionó por: 2 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O, 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,8 g de ácido cítrico, 3,3 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40 ml de glicerol, 0,6 ml de antiespumante PPG 2000 (Fluka Code 81380). El pH se corrigió después de la esterilización a 121°C a 6,8°C con una solución al 25% de hidróxido de amonio % (SIGMA), y solo se añadieron los siguientes componentes por litro de medio, esterilizados por filtración a través de filtros de 0,2 µm: 0,49 g de MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O, 0,0147 g de CaCl<sub>2</sub>, 1 ml de FeCl<sub>2</sub> (0,2 M), 2 ml de oligoelementos (oligoelementos por litro: 0,96 g de ácido cítrico, 0,25 g de CoCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O, 1,5 g de MnCl<sub>2</sub> \* 4H<sub>2</sub>O, 0,15 g de CuCl<sub>2</sub> \* 2H<sub>2</sub>O, 1,5 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,25 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O, 1,3 g de Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> \* 2H<sub>2</sub>O, 0,01 g de tiamina, 5 g de glucosa, 3 g de extracto de levadura.

La inducción con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) ocurre 4-6 horas después de la inoculación y continúa durante aproximadamente 16-18 horas. Los parámetros de fermentación desarrollados fueron los siguientes: temperatura 37°C, agitación 600 rpm, flujo de aire 5-10 litros de aire por minuto y presión de cabeza de aproximadamente 0,8 bar.

Las células bacterianas se recogen después de un período de inducción de aproximadamente 16 horas por centrifugación a 7500 rpm durante 25 minutos. Después de la recogida, las células bacterianas se almacenan a -80°C, listas para ser utilizadas para la extracción y purificación de la hialuronidasa recombinante. La proteína recombinante expresada por E. coli, en los diferentes parámetros de fermentación, se analiza mediante electroforesis en SDS-PAGE (12%) después de tinción con Azul Brillante de Coomassie G-250 (BIO-RAD, 161-0406), mientras que la actividad de la enzima se analiza por ensayo turbidimétrico [16]. Las células de E. coli BL21 (DE3) transformadas con el vector pHyal\_sk se indujeron a expresar la proteína heteróloga soluble en el periplasma, en el fermentador con 8 litros de medio. En SDS-PAGE, el recombinante expresado tenía un peso molecular de aproximadamente 24 kDa y una cantidad de proteína expresada en el periplasma celular de aproximadamente 0,1 - 0,15 g/L de cultivo, la cantidad máxima alcanzada después de 16 horas de inducción con IPTG 1 mM a 37°C.

Las células de E. coli BL21 (DE3) transformadas con el vector pHyal\_sk\_SL son inducidas a expresar la proteína heteróloga soluble en el periplasma, en el fermentador con 8L de medio. La porción soluble periplásmica resultó estar presente a una concentración de aproximadamente 0,35-0,5 g/L de cultivo, con una actividad enzimática mayor que 15050 - 21495 U/ml de cultivo. En SDS-PAGE, el recombinante expresado tenía un peso molecular de aproximadamente 24 kDa, constituyendo aproximadamente 18% de las proteínas bacterianas totales, después de la inducción con IPTG 1 mM a la decimosexta hora a 37°C.

Para ambos clones, se encontró que la estabilidad del plásmido durante la fermentación era del 100% (Tabla 2). La estabilidad del plásmido se controla hasta el final de la fermentación mediante cribado con la técnica de revestimiento de replica [29] que permite la replicación de las colonias en placas que contienen el antibiótico.

Ejemplo 14: Fermentaciones en lotes alimentados de hialuronidasa recombinante.

La capacidad de los clones de E. coli BL21 (DE3) - pHyal\_sk y BL21 (DE3) - pHyal\_sk\_SL para producir la hialuronidasa recombinante se evaluó mediante el crecimiento en fermentadores mediante el cultivo de lotes alimentados.

El inóculo se prepara inoculando un vial (del banco de células de trabajo almacenado a -80°C) en 500 ml de medio LB fresco (relación 1/20 con respecto al volumen de fermentación) que contiene 50 µg/ml de ampicilina y se incuba a 37°C a 150 rpm durante 16 - 18 horas. Los clones de los respectivos inóculos (E. coli BL21 (DE3) -pHyal\_sk y BL21 (DE3) - pHyal\_sk\_SL), fueron cultivados de forma separada en el fermentador en un medio de cultivo mínimo, cuya composición por litro fue dada por: 2 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O, 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,8 g de ácido cítrico, 3,3 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,6 ml de antiespumante PPG 2000 (Código 81380 de Fluka). El pH se corrigió después de la esterilización a 121°C hasta 6,8 con una solución al 25% de hidróxido de amonio (SIGMA), y sólo después de haber añadido los siguientes componentes por litro de medio, esterilizado por filtración a través de filtros de 0,2 µm: 0,49 g de MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O, 0,0147 g de CaCl<sub>2</sub>, 1 ml de FeCl<sub>2</sub> (0,2 M), 2 ml de oligoelementos (oligoelementos por litro: 0,96 g

de ácido cítrico, 0,25 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,15 g de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,25 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,3 g de  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 g de tiamina, 5 g de glucosa, 3 g de extracto de levadura.

Se añadió una solución de glicerol (~1,2 kg por 10 l de fermentación) esterilizada en un autoclave como alimentación y se añadieron a continuación los siguientes componentes, previamente filtrados con filtros de 0,2  $\mu\text{m}$ , por litro de alimento: 2 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,4 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 3,8 g de ácido cítrico, 4 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 9 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,047 g de  $\text{CaCl}_2$ , 1 ml de  $\text{FeCl}_2$  (solución 0,2 M), 2 ml de elementos traza (oligoelementos por litro: 0,96 g de ácido cítrico, 0,25 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,15 g de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,25 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,3 g de  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y 0,01 g de tiamina. La alimentación se administra 6 horas después de la inoculación hasta la hora diecinueve con una relación exponencial de adición. La elección de utilizar el glicerol como fuente de carbono se debe al hecho de que las células de expresión de *E. coli* utilizadas generan ácido acético (acetato) como un subproducto no deseado que tiene numerosos efectos adversos sobre la producción de proteínas recombinantes [14]. En particular, las células de *E. coli* producen ácido acético como co-producto extracelular de la fermentación aerobia, la velocidad de formación de acetato está directamente relacionada con la velocidad a la que crecen las células o a la velocidad a la que consumen el sustrato sólido como fuente de carbono, la glucosa. En los sistemas de fermentación en lote alimentado común, la velocidad de crecimiento del cultivo se determina por la velocidad de alimentación del nutriente limitante "glucosa", lo que da como resultado un crecimiento celular por encima del umbral que conduce a una producción consiguiente de acetato y, por tanto, a una reducción de la expresión de proteínas recombinantes.

En esta invención, se han desarrollado diversas estrategias para limitar la acumulación de acetato con el fin de reducir los efectos negativos y aumentar la productividad de la proteína recombinante. Una estrategia que nos ha permitido obtener excelentes resultados fue utilizar el glicerol como fuente de carbono. El glicerol, a diferencia de la glucosa, no se fermenta al ácido acético. Los resultados obtenidos mostraron que el uso de glicerol, en lugar de glucosa, en el proceso de fermentación alimentada por lotes desarrollado en esta invención, ha mejorado el rendimiento de la proteína hialuronidasa recombinante soluble de aproximadamente 2 - 3 veces [15]. Además, a diferencia de la glucosa que tiene un efecto inhibidor sobre el promotor que regula la síntesis de la proteína recombinante de esta invención, el glicerol puede administrarse a la fermentación también después de la inducción con IPTG, permitiendo la reducción no sólo de la formación de acetato sino también el aumento de la formación soluble de hialuronidasa recombinante. Además, el bajo coste del glicerol comparado con la glucosa lo hace preferente como una fuente de carbono para la fermentación de *E. coli*, en el campo industrial.

Después de la inducción con isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), solución final 1 mM, se administra la alimentación al cultivo cada hora y en la misma cantidad que la última adición durante 5 horas. La inducción comenzó 24 horas después de la inoculación y continuó durante 12 horas. Los parámetros de fermentación desarrollados son los siguientes: temperatura 37°C, agitación 600 rpm, flujo de aire 5-10 litros de aire por minuto y presión de cabeza de aproximadamente 0,8 bar.

Las células bacterianas se recogen después del período de inducción de 12 horas por centrifugación a 7500 rpm durante 25 minutos. Después de la recolección, las células bacterianas se almacenan a -80°C, listas para ser utilizadas para la extracción y purificación de la hialuronidasa recombinante. La proteína recombinante expresada por *E. coli*, en los diferentes parámetros de fermentación, se analiza por electroforesis en SDS-PAGE (12%) después de tinción con Azul Brillante de Coomassie G-250 (BIO-RAD, 161-0406), mientras que la actividad de la enzima se analiza por ensayo turbidimétrico [16].

Las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pHyal\_sk se indujeron a expresar la proteína heteróloga soluble en el periplasma, en el fermentador con 10 l de medio. En SDS-PAGE, el recombinante expresado tenía un peso molecular de aproximadamente 24 kDa y una cantidad de proteína expresada en el periplasma de aproximadamente 0,4 g/L de cultivo, la cantidad máxima alcanzada después de 6 horas de inducción con IPTG 1 mM a 37°C (Figura 14).

Las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pHyal\_sk\_SL son inducidas a expresar la proteína heteróloga soluble en el periplasma, en el fermentador con 10 l de medio. La porción soluble periplásmica resultó estar presente a una concentración de aproximadamente 1,2 g/l de cultivo, con una actividad enzimática mayor que 48000 U/ml de cultivo. En SDS-PAGE, el recombinante expresado tenía un peso molecular de aproximadamente 24 kDa, constituyendo aproximadamente 16-18% de las proteínas bacterianas totales, después de la inducción con IPTG 1 mM a la duodécima hora a 37°C (Figura 15).

Ejemplo 15: Fermentación alimentada por lotes de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el vector pHyal\_sk\_SL en 20L de medio.

En pocas palabras, las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pHyal\_sk\_SL son inducidas a expresar la proteína heteróloga soluble en el periplasma, en el fermentador con 20L de medio. Se encontró que la porción soluble periplásmica estaba presente a una concentración de aproximadamente 2 g/l de cultivo (Tabla 2) con una actividad enzimática mayor que 87000 U/ml de cultivo ( $7,5 \times 10^{7-8}$ ,  $7 \times 10^7$  UI/l de cultivo), aproximadamente 670 - 750 veces superior en comparación con la hialuronidasa autóloga producida en el fermentador como se describe en la patente anterior [9]. En SDS-PAGE, el recombinante expresado tenía un peso molecular de aproximadamente



24 kDa, constituyendo aproximadamente 16-18% de las proteínas bacterianas totales, después de la inducción con IPTG 1 mM a la duodécima hora a 37°C.

5 La estabilidad del plásmido durante la fase de fermentación, para todos los clones ensayados con el método alimentado por lote, fue del 100% (Tabla 2). La estabilidad del plásmido se controla hasta el final de la fermentación mediante cribado con la técnica de revestimiento de replica [29] que permite la replicación de las colonias en placas que contienen el antibiótico.

Finalmente, se ensayaron los clones, manipulados genéticamente de una manera diferente, para determinar su capacidad para producir, en el fermentador, la hialuronidasa recombinante codificada por el gen aislado de acuerdo con esta invención. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

10 Ejemplo 16: Análisis de la actividad de la hialuronidasa recombinante en el caldo de fermentación

A partir de 0,1 ml de cultivo de tiempos de inducción específicos o del producto final, el gránulo se obtuvo después de la centrifugación a una centrifuga de 7500 RPM (centrifuga Eppendorf 5402, rotor F-45-18-11) durante 10 minutos. El sedimento de células se resuspendió en 500 µl de reactivo de extracción de proteínas bacterianas B-PER (PIERCE) y se mezcló mediante agitación con vórtex (Heidolph Reax top) a velocidad máxima durante aproximadamente 1 minuto o hasta la resuspensión completa del gránulo. El sedimento adecuadamente resuspendido se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos para separar las proteínas solubles de las proteínas insolubles. El sobrenadante recogido (proteínas solubles) se ensayó en cuanto a la presencia de la actividad de hialuronidasa utilizando el método turbidimétrico descrito por Di Ferrante [16] modificado para el análisis en placas de 96 pocillos. Brevemente, para un solo pocillo, se incorporaron 31 µl de tampón de incubación [17], 8 µl de BSA (0,2 mg/ml), 8 µl de ácido hialurónico (2 mg/ml), 13 µl de H<sub>2</sub>O y 10 µl del sobrenadante (proteínas solubles) diluido 10, 100 y 1000 veces con 1x PBS (Sigma-P4417). La placa se incubó a 37°C durante una hora. Después de una hora de incubación, se añadieron 200 µl de solución alcalina CTAB (2,5% (p/v) en NaOH 0,5 M) a cada pocillo para precipitar el ácido hialurónico no digerido y la placa se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. El grado de precipitación se midió a una densidad óptica de 640 nm.

25 Posteriormente, se obtuvo la actividad por ml de proteína recombinante en el caldo de cultivo utilizando el siguiente cálculo: actividad de ml obtenida del ensayo/2 x factor de dilución x 10 = actividad sobre ml de producto de fermentación.

Se utilizó un estándar de hialuronidasa (FIP) para construir una curva estándar y la actividad de la hialuronidasa recombinante en la porción periplásmica se calculó usando esta curva.

30 Ejemplo 17: Extracción a gran escala de la fracción soluble

A partir del gránulo almacenado a -80°C (derivado de la fermentación de E. coli BL21 (DE3) transformada con el vector pHyal\_sk\_SL), se coloca una cantidad equivalente a 0,6 litros de producto de fermentación (aproximadamente equivalente al intervalo de gránulos celulares de 80-90 g, que refleja aproximadamente una producción de 1-1,2 g/l de hialuronidasa recombinante) para equilibrar durante 45 minutos a temperatura ambiente.

35 Primer método: Una vez equilibrado, el gránulo se trató con 210 ml de solución fresca (5°C) para la dispersión del gránulo (205,2 g/l de glucosa, 5,6 g/l de EDTA). El gránulo se resuspende con la disolución de dispersión bajo agitación magnética durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente durante aproximadamente 1 hora a 5°C utilizando un agitador magnético Heidolph tipo MR2002 a una velocidad de 500 rpm. Después de aproximadamente 1 hora, el gránulo resuspendido se añade frío en una solución de 4,5 litros para el choque osmótico (1,2 g/l de TRIS, 4 ml/l de HCl 2N, 0,1 g/l de MgCl<sub>2</sub>) para la extracción de la proteína periplásmica. La mezcla obtenida se agita durante 4 horas a 4°C, utilizando un agitador magnético Heidolph tipo MR2002 a una velocidad de 500 rpm.

45 Después de la etapa del choque osmótico, el producto obtenido que contenía las células dispersas de E. coli se centrifugó a 5°C durante 45 minutos a velocidades de aproximadamente 7500 rpm usando una centrifugadora Sorval Evolution Rc con rotor SLC-6000. Después de la centrifugación, el sobrenadante se recoge mientras se elimina el gránulo. En este punto, el sobrenadante se homogeneizó usando el sistema "Ultra Turrax" con un nivel de velocidad 2 durante 15 segundos.

50 El sobrenadante, después del tratamiento con Ultra Turrax, se llevó a pH 8 y se filtró por gravedad con filtros de 0,65 µm. Después de la filtración, la concentración de Tris en el filtrado se llevó de 10 mM a 50 mM con una solución de Tris-HCl 3M y más tarde se llevó a pH 8. La concentración de la hialuronidasa extraída se evaluó en SDS-PAGE y se encontró que era de aproximadamente 750 - 850 mg/total (22 - 24% de las proteínas periplásmicas totales). La actividad de la hialuronidasa recombinante extraída se evalúa por el método turbidimétrico de Dorfman.

55 Segundo método: Una vez equilibrado, el gránulo se trató con la disolución de 500 ml de reactivo de extracción de proteínas bacterianas B-PER (PIERCE) para la liberación de las proteínas periplásmicas en el medio. El gránulo se resuspende con la solución de B-PER, bajo agitación magnética durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente durante otros 30 minutos a 5°C, utilizando un agitador magnético Heidolph tipo MR2002 a una

5 velocidad de 10000 rpm. Después de aproximadamente 1 hora, el gránulo resuspendido se centrifuga a 5°C durante 45 minutos a una velocidad de aproximadamente 11.000 rpm usando una centrífuga Sorval Rc-5B con rotor Sorvall. Después de la centrifugación, el sobrenadante resultante se añadió en frío en una solución de 5l de Tris-HCl 50 mM, pH 8. La solución obtenida se agita durante 10 minutos a 4°C, utilizando un agitador magnético Heidolph tipo MR2002 a una velocidad de 200 rpm. Después de agitar, la solución se homogeneizó usando el sistema "Ultra Turrax" con un nivel de velocidad 2 durante 15 segundos. El sobrenadante, después del tratamiento con Ultra Turrax, se llevó a pH 8 y se filtró por gravedad con filtros de 0,65 micrómetros. La concentración de la hialuronidasa extraída se evaluó en SDS-PAGE y se encontró que era de aproximadamente 0,9-1,1 g/total (16% -18% de las proteínas periplásmicas totales). La actividad de la hialuronidasa recombinante extraída se evalúa por el método turbidimétrico de Dorfman.

#### Ejemplo 18: Purificación recombinante

15 Las resinas y las columnas cromatográficas se adquirieron de GE Healthcare Life Sciences y se mantuvieron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El balance y las etapas de elución se llevaron a cabo con un sistema de cromatografía líquida de rápido rendimiento (FPLC, AKTA explorer 100, GE Healthcare) a un flujo de 40-50 ml/min para las 3 cromatografías. Al final de cada paso cromatográfico se controló la actividad hialuronidasa con el ensayo de Dorfman modificado descrito [9]. Una vez que la fracción soluble se extrae de la porción periplásmica, se carga en la primera cromatografía de intercambio iónico fuerte. Cromatografía de intercambio iónico fuerte (Q sepharose XL):

20 El extracto filtrado llevado a Tris-HCl 50 mM y pH 8 se cargó en 500 ml-600 ml de resina Q sepharose XL (GE Healthcare) envasada en una columna XK-50 (GE Healthcare) y equilibrada con 8 volúmenes de lecho (BVs) de tampón Tris-HCl a pH 8. Después de cargar, la columna se lavó, primero con 3 BV del mismo tampón y posteriormente con 8 BV de tampón Tris-HCl a pH 8 con NaCl 40 mM, después se eluyeron las proteínas unidas con 5 BV de una solución tampón Tris-HCl a pH 8 con NaCl 110 mM. Las proteínas eluidas se recogieron en una única fracción que tenía un volumen de aproximadamente 950 ml y se sometieron a un ensayo de actividad de hialuronidasa.

#### Diafiltración y cromatografía de intercambio iónico débil (CM-Sepharose® Fast Flow):

30 La fracción obtenida se concentra a 100 ml utilizando el sistema TFF de ultrafiltración tangencial (Millipore) y utilizando filtros de polietersulfona (PES) con un corte comprendido entre 3 y 8 kDa, preferiblemente de 5 kDa. Después de la concentración, la muestra se diluye 10 veces con tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 4. La fracción así obtenida se cargó en una resina CM-Sepharose® Fast Flow de 300 ml a 400 ml (GE Healthcare), se empaquetó en una columna XK-50 (GE Healthcare) y se equilibró con 6 volúmenes de lecho (BV) de tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 4,0. Después de cargar (preferiblemente a una temperatura de 4-5°C), la columna se lavó con 3 BV del mismo tampón, después se eluyeron las proteínas unidas con 8 BV de una solución tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 4,5. Las proteínas eluidas se recogieron en una única fracción que tenía un volumen de aproximadamente 380 ml y se sometieron a un ensayo de actividad de hialuronidasa.

#### Diafiltración y cromatografía de interacción hidrofóbica aromática (Phenyl-Sepharose HP).

40 La fracción obtenida y positiva a la dosificación enzimática se concentra a 100 ml usando el sistema de TFF de ultrafiltración tangencial (Millipore) y utilizando filtros de polietersulfona (PES) con un corte comprendido entre 3 y 8 kDa, preferiblemente de 5 kDa. Después de la concentración, la muestra se diluye 10 veces con tampón de fosfato de sodio 50 mM con sulfato de amonio 1,5 M, pH 7. La fracción así obtenida se cargó en 300 ml-400 ml de resina Phenyl-Sepharose HP (GE Healthcare), se empaquetó en una columna XK-50 (GE Healthcare) y se equilibró con 8 volúmenes de lecho (BV) de tampón fosfato sódico 50 mM con sulfato amónico 1,5M, pH 7. Después de cargar, la columna se lavó con 3 BV del mismo tampón, después se eluyeron las proteínas unidas con 5 BV de una solución de tampón de fosfato de sodio 50 mM con sulfato amónico 0,8 M, pH 7. Las proteínas eluidas se recogieron en una única fracción que tenía un volumen de aproximadamente 730 ml y se sometieron a ensayo de actividad de hialuronidasa. Después del ensayo de actividad enzimática, la fracción eluida se sometió a ultrafiltración y diálisis con 10 volúmenes 1x PBS (SIGMA-P4417), utilizando filtros de polietersulfona (PES) con un corte comprendido entre 3 y 8 kDa, preferiblemente de 5 kDa, llevados a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml y se filtró con filtros de 0,2 µm (la concentración de proteína se determinó mediante el Kit de Reactivos de Ensayo de Proteínas BCA, PIERCE). Durante las etapas de purificación para obtener una buena recuperación del producto purificado, la porción recombinante se carga en las columnas cromatográficas con una relación máxima de 1,5 mg de hialuronidasa por ml de resina. Todas las fracciones de proteína eluidas, tanto las enzimáticamente activas, como las inactivas o poco activas, se analizaron a continuación mediante SDS-PAGE al 12% y a continuación se tñeron con tinción de plata de acuerdo con las instrucciones del fabricante; en todas las fracciones que tenían actividad de hialuronidasa había una banda de proteína marcada de aproximadamente 24 kDa (Fig. 16). En las diferentes etapas de purificación, la concentración de proteína de la porción recombinante se estimó como la previamente descrita en SDS-PAGE (12%) y se encontró que era de 0,45-0,5 g/L total en la primera cromatografía (Q sepharose XL), 0,45-0,50 g/L total en la segunda cromatografía (CM-Sepharose® Fast Flow), 0,4-0,45 g/L total en la tercera cromatografía (Phenyl-Sepharose HP) y 0,35-0,4 g/L total después de la filtración con DIA. Al final del proceso de purificación aplicado sobre aproximadamente 1 l de producto de fermentación, se obtuvieron aproximadamente 600 -

650 mg (actividad enzimática mayor que  $2,6 \times 10^7$  U/L de producto de fermentación purificado) de hialuronidasa recombinante (Tabla 3).

#### Ejemplo 19: Análisis y caracterización

##### Determinación de la actividad de hialuronidasa

- 5 La actividad de hialuronidasa se midió con el método de Dorfman modificado [10]. En resumen, el producto obtenido mediante las diferentes etapas del procedimiento se diluyó en tampón fosfato 0,03 M, NaCl al 0,82%, pH 6,3 y se mezcló 1 ml de la solución así obtenida con 1 ml de tampón sustrato (tampón fosfato 0,03 M, NaCl 10,82%, pH 6,3) que contiene 0,5 mg de ácido hialurónico. La digestión enzimática se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos y al final del proceso de incubación, se generó turbidez mediante la adición de una solución ácida de 4 ml de suero de caballo (SIGMA). La densidad óptica a 640 nm se midió exactamente 30 minutos después de la adición de la solución ácida de suero de caballo. Se usó un patrón de hialuronidasa de testículos de mamífero (EDQM, FIP Hyaluronidase, H1115000) que contenía 328 UI/mg para construir una curva estándar y la actividad (en unidades) de las muestras se calculó usando esta curva.

##### Electroforesis SDS-PAGE

- 15 Los ensayos electroforéticos sobre gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) se llevaron a cabo usando el método de Laemmli [11] en gel de poliacrilamida al 12%, usando un Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD) según las instrucciones del fabricante. La concentración y el peso molecular de la hialuronidasa en el producto de fermentación y en diferentes etapas de purificación se estimaron mediante comparación con proteínas estándar de bajo peso molecular (GE Healthcare).
- 20 Los geles de poliacrilamida adecuadamente teñidos con Coomassie (BIO\_RAD) después de la operación electroforética, fueron adquiridos por un dispositivo de captura de imagen de laboratorio ImageQuant™ 300 TL (GE Healthcare), mientras que los ensayos (cuantitativos y cualitativos) se realizaron usando el software de análisis de imagen ImageQuant TL (GE Healthcare).

##### Secuenciación del extremo N-terminal

- 25 La secuenciación de aminoácidos N-terminal se llevó a cabo según el método de degradación de Edman utilizando un secuenciador de proteínas automatizado en fase líquida pulsada (ABI-Perkin Elmer Mod. 477A). El software BLAST [18] se utilizó para llevar a cabo la investigación de homología en la base de datos GenBank y en la del proyecto de genoma humano de las especies *Streptomyces* disponibles en la web. Las fracciones, obtenidas por las purificaciones de la cepa de *E. coli* transformada con el vector pHyal\_sk y la cepa de *E. coli* transformada con el vector pHyal\_sk\_SL de acuerdo con la invención, se sometieron a electroforesis SDS-PAGE sobre gel al 12%, como se ha descrito anteriormente, después a la transferencia de membrana de difluoruro de polivinilideno (BIO-RAD) y se tiñeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La banda relativa a la hialuronidasa para ambas producciones se separó con un bisturí, tratando de obtener una pieza lo más pequeña posible (3 mm x 10 mm) y se cargó en la cámara de reacción del secuenciador.
- 30
- 35 La secuenciación del extremo N-terminal, llevada a cabo como se ha descrito anteriormente, permite determinar que las dos hialuronidasas recombinantes producidas y procedentes de dos sistemas diferentes de ingeniería genética y expresión, contienen diferencias en la secuencia de aminoácidos N-terminal. En el caso de la muestra de *E. coli* transformada con el vector pHyal\_sk\_SL de acuerdo con la invención, el ensayo proporcionó cromatogramas en los que una única secuencia de aminoácidos N-terminal estaba significativamente presente, permitiendo reconstruir la secuencia de ensayo descrita a continuación: AGENGA (SEQ ID NO: 42). La secuencia experimentalmente determinada, mencionada anteriormente, se corresponde con el N-terminal de la proteína aislada en su forma autóloga descrita por [9] libre de metionina en la posición 1.

- 45 En el caso de la muestra de *E. coli* transformada con el vector pHyalsk de acuerdo con la invención, el ensayo detectó en cambio la presencia de al menos dos secuencias de aminoácidos N-terminales, a continuación se menciona el listado de los aminoácidos N-terminales detectados por la secuenciación: La secuencia más representada MAGENGA (SEQ ID NO: 43) que corresponde al extremo N de la proteína madura con metionina en la posición 1, y una secuencia menos representada AQPAMAMAGENGA (SEQ ID NO: 44) que corresponde a la proteína parcialmente madura (contiene la secuencia AQPAMAM (SEQ ID NO: 45) perteneciente al péptido señal aparentemente no totalmente privado de la proteína por el sistema celular).

- 50 Comparación de la actividad de hialuronidasa entre la forma heteróloga y autóloga.

El potencial enzimático de la hialuronidasa de acuerdo con la invención (*E. coli* transformada con el vector pHyal\_sk\_SL) se evaluó por comparación con la actividad enzimática de la hialuronidasa autóloga [9], utilizando el ensayo enzimático descrito [9] y se informa que el valor de la actividad era en ambos casos mayor que  $4 \times 10^4$  UI/mg (la concentración de proteína se determinó mediante el Kit de Reactivos de Ensayo de Proteínas BCA, PIERCE).

El resultado de este ensayo muestra que la hialuronidasa de acuerdo con la invención, en particular de la forma procedente de la cepa de *E. coli* modificada con el plásmido pHyal\_sk\_SL, tiene la misma actividad que la forma autóloga. Sin embargo, por medio de los métodos de producción y purificación descritos en la invención fue posible evaluar con precisión el valor de la actividad enzimática de la hialuronidasa recombinante de acuerdo con la invención, que se encontró que era mayor que 40.000 U/mg de proteína.

Análisis de espectros UV y comparación de espectros de dicroísmo circular de las formas heteróloga y autóloga.

Experimentos de dicroísmo circular (CD): Los espectros en el dicroísmo circular de Far-UV se recogieron a temperatura ambiente en un espectropolarímetro Jasco modelo J-715, con una celda de cuarzo con una longitud de trayectoria de 1 milímetro. Otras configuraciones de prueba fueron: velocidad de exploración, 10 nm/min, sensibilidad, 50 MDEG, constante de tiempo, 16 s, ancho de banda, 3 nm. Las mediciones de dicroísmo circular se llevaron a cabo sobre soluciones de proteínas (hialuronidasa autóloga, hialuronidasa recombinante de acuerdo con la invención) a una concentración de  $2,10^{-6}$  M. Todas las muestras se diluyeron a una concentración final de  $2,10^{-6}$  M usando agua ultra pura. Los espectros de CD se recogieron a 260-195 nm de blanco corregido y ajustado para dilución.

Los espectros de dicroísmo circular se presentan en la Figura 17. Los archivos de superposición coinciden: la línea inferior corresponde a la hialuronidasa autóloga [9] y la superior corresponde a la hialuronidasa heteróloga de acuerdo con la invención. Los dos espectros tienen un perfil superpuesto, confirmando la misma estructura para ambas muestras (Fig. 17-a). La pequeña diferencia que se observa puede atribuirse a la no coincidencia perfecta de las concentraciones de las dos soluciones.

A partir de los espectros UV, la muestra de hialuronidasa recombinante no muestra agregación. A partir de este estudio se puede inferir que la preparación de acuerdo con la invención tiene una estructura secundaria muy similar a la de la hialuronidasa autóloga [9] y que la proteína producida de acuerdo con la presente invención no muestra agregación (figura 17b).

Espectrometría de masas

Los ensayos de espectrometría de masas para determinar el peso molecular se llevaron a cabo utilizando el micro espectrómetro de masa Quattro (Waters), mientras que el ensayo de la cartografía de péptidos para confirmar la identidad de la estructura primaria de la porción recombinante se llevó a cabo usando los valores de masa precisos de los péptidos determinados mediante el sistema MALDI-MS Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, Farmingham MA, EE.UU.) después de la separación en RP-HPLC.

La fracción obtenida después de la purificación de la hialuronidasa recombinante de acuerdo con la invención se sometió a digestión con tripsina, después de la separación en RP-HPLC, la mezcla de péptidos producida para cada muestra se analizó mediante MALDI-MS en modo reflector. El estudio e interpretación de los espectros MALDI adquiridos, por lo tanto, permitieron, respectivamente, verificar la identidad del 97% de la estructura primaria de la secuencia de aminoácidos de referencia [9] y más del 94% de identidad de la estructura primaria de la secuencia teórica de aminoácidos según la invención (secuencia de péptido predicha por <http://web.expasy.org/translate/>) con la secuencia de aminoácidos de la muestra producida de acuerdo con la invención (SEQ ID NO: 21).

Además, la fracción obtenida después de la purificación de la hialuronidasa recombinante de acuerdo con la invención se sometió a la determinación del peso molecular de la proteína por medio de espectrometría de masas y el resultado del ensayo se muestra en la Figura 18.

Enfoque isoelectrico

La fracción de proteína a analizar (hialuronidasa recombinante obtenida de acuerdo con la invención) se mezcla en un tampón de carga adecuado y se carga sobre tiras de IPG a pH 3-10 (ReadyStrips 7 cm, BIO-RAD); la incubación se realiza a 25°C hasta la absorción de la muestra y la tira se carga sobre la celda PROTEAN IEF (BIO-RAD) para el enfoque isoelectrico (IEF). Al final de la operación del enfoque isoelectrico, la tira se tiñe con solución de tinción con gel IEF (BIO-RAD) durante 45 minutos y después se destiñe con solución Destain (BIO-RAD). Las tiras de IPG desteñidas fueron adquiridas por un dispositivo de captura de imágenes de laboratorio ImageQuant 300 TL (GE Healthcare) mientras que los ensayos (cuantitativos y cualitativos) se realizaron utilizando el programa de análisis de imágenes ImageQuant TL (GE Healthcare).

El punto isoelectrico de la muestra se determinó por comparación con los puntos isoelectricos de los patrones de referencia (IEF Marker pH 3-10, SERVA). El resultado del ensayo se reporta en la Figura 19.

Caracterización por electroforesis capilar de la hialuronidasa recombinante y determinación del coeficiente de extinción molar.

El ensayo cualitativo-cuantitativo de la fracción proteica a analizar (hialuronidasa recombinante obtenida de acuerdo con la invención) fue realizado por BIOTEKNET (Nápoles, Italia) mediante electroforesis capilar con un instrumento Beckman-Coulter MDQ P/ACE equipado con detector de matriz de diodos y lámpara UV, utilizando un capilar de

silice fundida (longitud real de 50 cm, longitud total de 60,2 cm, diámetro interior de 50  $\mu$ m) y un tampón de citrato de sodio 20 mM, a pH 2,5, aplicando una epd de 25 kV (asegurando una mayor estabilidad en el proceso de separación electroforética y de la corriente utilizada) durante 15 minutos y detectando la absorción a 200nm. Antes de proceder con el ensayo de muestra, se analizó adecuadamente la BSA (albúmina de suero bovino) a tres concentraciones diferentes (1 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,4 mg/ml), utilizando el método mencionado anteriormente y obteniendo de este modo una línea recta de calibración. El ensayo se realizó en la misma muestra dos veces diluida (Fig. 20). En ambos electroferogramas es posible identificar la presencia de un solo pico (Pureza 100%) con un tiempo de migración de  $7,7 \pm 0,9$  min y la cuantificación de la proteína, aunque afectada por una calibración con estándar externo (BSA), por lo tanto no con la misma proteína, devuelve una alta pureza, y una cuantificación superponible a la esperada (~ 1 mg/ml). El trabajo de investigación sobre la determinación del coeficiente de extinción molar de la hialuronidasa recombinante puede dividirse en cuatro momentos experimentales: 1. Ensayo densitométrico de las muestras de hialuronidasa de la invención, 2. Ensayo espectrofotométrico de las muestras de hialuronidasa de la invención, 3. Identificación de la absorbancia teórica, 4. Identificación del coeficiente de extinción molar.

En este punto, una vez recogida la información en los pasos anteriores, se aplica la ley de Beer-Lambert:  $A = \epsilon \cdot l \cdot C$  donde  $\epsilon$  se denomina el coeficiente de absorción molar,  $C$  es la concentración molar de la solución y  $l$  es la trayectoria óptica. Basándose en esta fórmula y en la información obtenida por los inventores, el coeficiente de absorción molar, a una longitud de onda de 280 nm, es el siguiente:  $12383 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  Abs 0,1% (= 1 g/L) 0,570 (Coeficiente de extinción molar de la hialuronidasa producida de acuerdo con la presente invención).

#### Ensayo de HPLC mediante filtración en gel

Para los ensayos mediante filtración en gel se utilizó el instrumento de HPLC LC-10AD (SHIMADZU) con una columna Bio-Sil SEC (BIO-RAD), eluyendo con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,05 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 6,6, 1 ml/min. La longitud de onda de absorción utilizada fue de 214 nm (SPD-10A, SHIMADZU). La pureza de la proteína se determinó utilizando el software LC solución 1:21 SP1. La fracción obtenida después de la purificación de la hialuronidasa recombinante como se describe en la invención se sometió a HPLC en columna de filtración en gel como se ha descrito anteriormente. El resultado del ensayo sobre la pureza de la porción recombinante se indica mediante el cromatograma de la Figura 21-a y es del 100%.

#### Determinación del nivel de pureza mediante RP-HPLC.

Para los ensayos de pureza mediante HPLC de fase inversa se utilizó el instrumento de HPLC LC-10AD (SHIMADZU) con una columna Vydac 214ATP54 C4 (Grace Davison Discovery Sciences), eluyendo con Tris 50 mM pH 7,5 con 1-propanol, a 0,5 ml/min. La longitud de onda de absorción utilizada fue de 220 nm (SPD-10A, SHIMADZU). La pureza de la proteína se determinó utilizando el software LC solución 1:21 SP1. La fracción obtenida después de la purificación de la hialuronidasa recombinante como se describe por la invención se sometió a RP-HPLC en una columna de fase hidrófoba (invertida) como se ha descrito anteriormente. El resultado del ensayo sobre la pureza de la porción recombinante se indica por el cromatograma de la Figura 21-b y está muy cerca del 100%.

#### Caracterización de la hialuronidasa bacteriana recombinante mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

Los ensayos electroforéticos sobre gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) se llevaron a cabo usando el método de Laemmli [11] en un gel de poliacrilamida al 12%, usando un Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y el peso molecular de la hialuronidasa en el producto de fermentación y en diferentes etapas de purificación se estimaron mediante comparación con proteínas estándar de bajo peso molecular (GE Healthcare).

Los geles de poliacrilamida, adecuadamente teñidos con Coomassie (BIO\_RAD) después de la pasada electroforética, fueron adquiridos por un dispositivo de captura de imagen de laboratorio ImageQuant 300 TL (GE Healthcare), mientras que los ensayos (cuantitativos y cualitativos) se realizaron usando el software de análisis de imágenes ImageQuant TL (GE Healthcare).

Por otra parte, para el ensayo Western Blot, las proteínas se fraccionaron en SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas de interés se identificaron luego por incubación con una dilución 1:2000 de anticuerpo anti-hialuronidasa (Abnova) en leche en polvo al 10%/PBS durante 12 horas, y la reacción específica se resaltó mediante la adición durante 1 hora de anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina, seguido de detección con el sustrato BCIP/NBT (BUF045A, SEROTEC).

La producción de hialuronidasa recombinante de acuerdo con la invención a partir de células modificadas de *E. coli* BL21 (DE3) y, por lo tanto, sin la presencia de derivados animales, permitió producir la proteína con una elevada actividad enzimática específica (> 40000 unidades/mg de proteína). La proteína recombinante producida de acuerdo con la invención tenía un nivel de pureza 100 veces mayor que el del patrón de hialuronidasa de testículos de mamífero (EDQM, FIP Hialuronidasa, H1115000) como se muestra en la Figura 22. Mientras que la hialuronidasa recombinante se purificó de acuerdo con la invención después de la migración con un gel SDS-PAGE al 12% y la tinción con coomassie GellMate Blue (EuroClone) tenían una única banda, la hialuronidasa bovina, disponible en el mercado, mostró varias impurezas. Una banda más pequeña (a aproximadamente 75-80 kDa) en el frotis de

proteínas de la hialuronidasa bovina reaccionó con un anticuerpo policlonal anti-hialuronidasa (Abnova) por Western Blotting, confirmando que la enzima hialuronidasa es un componente menor de las preparaciones de hialuronidasa derivadas de animales (Fig. 22).

#### Detección de endotoxinas

5 La prueba de Lisado de Amebocitos Limulus (LAL), que utiliza el reactivo preparado a partir de la sangre del limulus Polifemo, mostró ser la prueba más sensible y específica para detectar y medir el nivel de endotoxinas bacterianas en las materias primas utilizadas en la producción y para la monitorización "en proceso" de los niveles de endotoxinas. Las endotoxinas, más comúnmente conocidas como pirógenos, causan desde la fiebre a un shock irreversible, desde dificultades en los intercambios de sangre y tejido a consecuencias letales.

10 Con la hialuronidasa recombinante producida según la invención en células de *E. coli*, era esencial evaluar el nivel de endotoxinas en el producto final. Para ello, se utilizó el método de "Chromo-LAL", una prueba cinética cromogénica para la detección cuantitativa de endotoxinas producidas por bacterias Gram-negativas.

15 Brevemente, en el "Chromo LAL (art. 32427, PBI S.p.A-Italia)", el lisado y el sustrato de reactivo cromogénico coliofilizado se mezclaron con la muestra de hialuronidasa (producida de acuerdo con la invención) en una microplaca de multi-pocillos (96 pocillos) y se incubaron a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  en un lector adecuado (ELX 808 IU, BioTek). Los valores de absorbancia leídos fueron recogidos y analizados por un software dedicado. Se calculó el tiempo requerido para que la muestra de hialuronidasa alcanzara un valor de absorbancia específico (densidad óptica). Además, se construyó una curva de calibración estándar (CSE, lot. 104, art.17078, PBI S.p. A - Italia) que muestra la correlación lineal entre el logaritmo de "tiempo de inicio" y el logaritmo de la concentración de endotoxina estándar. El intervalo máximo entre las concentraciones de endotoxina de la curva estándar es de 0,005 EU/ml-50 EU/ml. La sensibilidad [19] de la prueba se definió a partir de la menor concentración de endotoxina utilizada para construir la curva estándar. La sensibilidad máxima de este ensayo es 0,005 EU/ml.

20 La concentración de endotoxina para el correspondiente "tiempo de inicio" de la muestra de hialuronidasa se leyó a partir de la curva patrón que es un diagrama log-log derivado de las puntuaciones obtenidas calculando los "tiempos de inicio" frente a las concentraciones estándar.

25 Al final, el valor estimado de endotoxinas en la muestra de hialuronidasa producida de acuerdo con la invención se calculó mediante el software Gen5 (BioTek) resultando muy bajo, es decir, inferior a 0,5 unidades de endotoxina por miligramo de hialuronidasa recombinante (Tabla 4).

#### Determinación de proteínas y ADN procedentes de células huésped

30 En cuanto a la determinación de proteínas derivadas de células huésped de *E. coli* usadas para la expresión heteróloga de hialuronidasa recombinante (como se describe por la presente invención) se utilizó el método ELISA, en particular, el kit de inmunoensayo enzimático "E.coli HCP" de Cygnus Technologies (F010). El ensayo se basa en el uso intercalado de anticuerpos purificados por afinidad dirigidos a una mezcla de 6 cepas de *E. coli* comúnmente usadas para la clonación y expresión de proteínas recombinantes.

35 El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en la muestra purificada de hialuronidasa recombinante, la concentración de proteínas derivadas de *E. coli* (cepa huésped) es directamente proporcional al desarrollo de color provocado por la reacción enzimática de la fosfatasa alcalina conjugada al anticuerpo .

40 Se estimó la concentración de proteínas que derivan de la cepa huésped hacia las concentraciones estándar (el cálculo y la calibración de la curva se realizaron mediante el programa GEN 5, BioTek) en la muestra de hialuronidasa producida de acuerdo con la invención era inferior a 10 ppm, como se muestra en la Tabla 4 (el límite aprobado por las autoridades competentes es inferior a 100 ppm).

Por otra parte, la determinación de la cantidad de ADN de la cepa huésped de *E. coli* se llevó a cabo en la muestra de hialuronidasa recombinante (producida de acuerdo con la invención), utilizando el método de Umbral de ADN.

45 Este ensayo se realizó en los laboratorios Charles River Biopharmaceutical services GmbH, Alemania. Los estudios indicados con los códigos M1/F07/12 y M2/F07/12 dieron como resultado final un nivel muy bajo de ADN derivado del huésped celular, calculado como inferior a 20 pg (el límite aprobado por las autoridades competentes es menor o igual a 300 pg/mg de proteína) por miligramo de hialuronidasa recombinante (Tabla 4).

#### Ejemplo 20: Ensayo en gel de agarosa de la despolimerización de ácido hialurónico

50 Para la evaluación in vitro de la capacidad de la hialuronidasa recombinante, producida de acuerdo con la invención, de despolimerizar el ácido hialurónico (Hyalgan®, Fidia S.p.A., Italia) en sus constituyentes primarios N-acetilglucosamina y ácido glucurónico, se utilizó el método de ensayo electroforético en gel de agarosa [20] después de digerir el ácido hialurónico con 1 unidad de hialuronidasa recombinante dentro de los tiempos indicados de 5 minutos a 24 horas.

Brevemente, se separaron las muestras de ácido hialurónico (500 kD-730 kD), después de reaccionar con hialuronidasa recombinante dentro de los tiempos indicados (de 5 minutos a 24 horas) usando el sistema de electroforesis Sub-CellGT (BIO-RAD) y geles con agarosa al 1% (25 cm de longitud). Las muestras se migraron en electroforesis durante aproximadamente 12 horas a una temperatura de aproximadamente 16°C con un voltaje constante de 50 Voltios. La tinción se lleva a cabo como se describe en estudios anteriores [20].

Los resultados mostrados en la Figura 23 indicaron que la hialuronidasa recombinante, producida de acuerdo con la invención, es capaz de digerir completamente el sustrato hasta alcanzar niveles no detectables de ácido hialurónico antes de 24 horas.

#### Ejemplo 21: Estabilidad frente a enzimas proteolíticas

La hialuronidasa es una enzima que hidroliza el ácido hialurónico, aumentando, por tanto, la permeabilidad del tejido conectivo mejorando la difusión y dispersión del fármaco, que se administra localmente subcutáneamente, en los tejidos circundantes.

En algunos tratamientos, la hialuronidasa se administra en dosis bajas (la dosis típica utilizada es de 15 unidades), para reducir los daños causados por la pérdida de antibióticos, soluciones hiperosmóticas, soluciones ácidas o básicas o la corrección de cargas a base de ácido hialurónico para evitar reacciones alérgicas y anafilácticas. Por lo tanto, es fundamental para la hialuronidasa ser estable en estas dosis hacia las enzimas proteolíticas presentes en el tejido conectivo, que puede degradar fácilmente una vez inyectado, inhibiendo su acción. Con el fin de probar y comparar la resistencia de la hialuronidasa recombinante con respecto a la bovina actualmente utilizada en el mercado, frente a las enzimas proteolíticas, se proporcionó un modelo turbidimétrico para ensayos in vitro. Brevemente, la hialuronidasa recombinante (preparada de acuerdo con la invención) a la concentración de 10 U (<250 ng) y la hialuronidasa bovina 100 U (300 µg) se trataron por separado con dos dosis diferentes de Pronase E (200 µg y 500 µg) en una solución de tampón de fosfato (pH 7,0) a 37°C durante 1 hora, 24 horas y 48 horas. La actividad enzimática residual (expresada en porcentaje) de las dos concentraciones de enzimas tratadas y no tratadas con Pronase E se midió de acuerdo con el método de Dorfman, tal como se describe en la patente. Los resultados obtenidos se colocan en un diagrama y se muestran en la Figura 24.

#### Ejemplo 22: Efecto del suero humano y animal sobre la actividad hialuronidasa

En esta invención, gracias a la provisión de un modelo de ensayo in vitro utilizando el modelo turbidimétrico, se confirmó lo que ya había surgido de estudios clínicos previos, esto es, la actividad enzimática de la hialuronidasa bovina (PH20 bovino) se inhibe por sangre humana y/o animal, pero se encontró, sin embargo, que la sangre humana y/o animal no inhibe la hialuronidasa a partir de *S. koganeiensis* recombinante (Fig. 25). El método utilizado para evaluar, en esta invención, la inhibición de la actividad de la hialuronidasa por sangre (animal/humano) se describió previamente por Albert DORFMAN, et al [21]. En pocas palabras, las dos concentraciones de hialuronidasa recombinante producidas de acuerdo con la invención (40 unidades, 400 unidades), e hialuronidasa bovina (40 unidades, 400 unidades), se trataron separadamente y respectivamente con suero procedente de sangre animal y suero procedente de sangre humana en una solución de tampón de sulfato (pH 7,0) mezclada con tampón sustrato que contiene 0,5 mg de ácido hialurónico. La mezcla así obtenida se colocó a 37°C durante 30 minutos, 1 hora y 6 horas. La actividad enzimática relativa de las dos concentraciones de enzimas tratadas con los sueros se midió al final de cada intervalo de tiempo establecido después de haber generado turbidez mediante la adición de una solución de ácido de 4 ml a base de suero de caballo y continuando según el método de Dorfman descrito previamente. El desarrollo de turbidez debido a la adición del suero se corrigió por el blanco que contenía todos los reactivos, excepto para la hialuronidasa.

Por lo tanto, estos últimos estudios muestran que la hialuronidasa recombinante producida de acuerdo con la invención, que tiene una alta actividad de hialuronidasa y alta estabilidad frente a enzimas proteolíticas, es capaz de realizar, con su biodisponibilidad máxima, la actividad total en el torrente sanguíneo sin la posibilidad de detectar bacterias o infecciones virales, demostrando ser eficaz también para las terapias cardiovasculares y cerebrovasculares.

#### Referencias bibliográficas

[1] L.H. Bookbinder, et al, Journal of Control Release. 2006 Aug 28; 114(2):230-41. Epub 2006 Jun 7.

[2] Bratisl Lek Listy 2009; 110(1).

[3] US 2008/0124316 A1.

[4] Acta Med Scand. 1984; 216(2):209-13.

[5] Dorfman A, Ott ML, Whitney R: The hyaluronidase inhibitor of human blood. J Biol Chem 174: 621, 1948.

[6] McClean D: The in-vivo decapsulation of streptococci by hyaluronidase. J Pathol Bacteriol 54: 284, 1942.

[7] US 2011/0053247 A1.

- [8] US 4.258.134.
- [9] WO 2010/130810 A1.
- [10] Dorfman A. 1955.
- [11] Laemmli, U.K. 1970.
- 5 [12] Sambrook J, Russel DW (2001).
- [13] Peter B. Kaufman, William Wu, Donghern Kim, Leland Cseke 1995; Sambrook and Russell (2001).
- [14] Sørensen, H.P. and Mortensen, K.K. (2005). Advanced strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 115, 113-128.
- 10 [15] Luo, Q. et al. (2006) Optimization of culture on the overproduction of TRAIL in high-cell-density culture by recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 184-191.
- [16] Di Ferrante 1956.
- [17] McIlvaine's buffer, McIlvaine 1921.
- [18] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- 15 [19] Ebner, C., D.Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. Type 1 allergy induced by LYMULUS Amebocyte Lysate (LAL). *Clinical and Experimental Allergy* 22:417-419 (1992).
- [20] Lee, H. G., and Cowman, M. K. (1994) *Anal. Biochem.* 219,278-287.
- [21] Albert DORFMAN, MELVIN L. OTT, e Richard WHITNEY, Febbraio 20, 1948.
- 20 [22] Killmann, H., Benz, R., and Braun, V. (1996). Properties of the FhuA channel in the *Escherichia coli* outer membrane after deletion of FhuA portions within and outside the predicted gating loop. *J Bacteriol* 178, 6913-20.
- [23] The *Bacillus subtilis* centred wiki SubtiWiki: A community curated consensual annotation that is continuously updated. SubtiPathways is a model of *B.subtilis* metabolism and regulation in SBML/SBGN (Systems Biology Markup Language/ Graphical Notation).
- 25 [24] Perkins JD, et al. XbaI and BlnI genomic cleavage maps of *Escherichia coli* K-12 strain MG1655 and comparative analysis of other strains. *J. Mol. Biol.* 232: 419-445, 1993.
- [25] Heath JD, et al. NotI genomic cleavage map of *Escherichia coli* K-12 strain MG1655. *J.Bacteriol.*174:558-567, 1992.
- [26] Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 30 [27] Weiner, M. P., Anderson, C., Jerpseth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B. et al. (1994) *Strategies* 7(2):41-43.
- [28] Altschul et al., 1997.
- [29] Lederberg, J and Lederberg, EM (1952) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J Bacteriol.* 63: 399-406.



LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Fidia S.p.A.  
 <120> Hialuronidasa  
 <130> P04568

10 <160> 52  
 <170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 1  
 Ala Gly Glu Asn Gly Ala Thr Thr Thr Phe Asp Gly Pro Val Ala  
 1 5 10 15

20 <210> 2  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Streptomyces koganeiensis

25 <400> 2  
 Arg Phe Ser Ala Asp Thr Thr Ile Glu Ala Ala Phe Ile Lys Thr Thr  
 1 5 10 15

Ser Glu Thr Ile His Ala Ala Thr Ile Tyr Lys  
 20 25

30 <210> 3  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Streptomyces koganeiensis

35 <400> 3  
 Gly Tyr Ala Asp Gly Ser Asp Lys Asp Ala Ala Ala Leu Ser Leu Asp  
 1 5 10 15

Leu Arg

40 <210> 4  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 4  
 Ala Gln Val His Ile Val Gln Arg  
 1 5

45 <210> 5  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Streptomyces koganeiensis

50

ES 2 643 485 T3

<400> 5  
 Ile Gly Asn Ala Ala Thr Val Pro Thr Ser Val Asp Ser Ser Gly G.  
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 6  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis

10 <400> 6  
 ggagaacggg gcgacgacga cgttcg 26  
 <210> 7  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis

15 <400> 7  
 gtcggcaccg tcgccggtt cccgat 26

20 <210> 8  
 <211> 546  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis

25 <400> 8  
 gagaacgggg cgacgacgac gttcgacggc ccgggtggccg ccgagagggt cagcgcggac 60  
 accacactgg aggccgcctt cctcaagacg acctcggaga cgaaccacgc ggcgaccatc 120  
 taccaggccg gtacgtcggg cgacggcgcg gcgctgaacg tgatctccga caaccggggc 180  
 acctcggcca tgtacctctc cggcaccgag accgcgcgcg gcaccctgaa gatcaccac 240  
 cgcggttacg ccgacggctc cgacaaggac gccgccgcc tgcgctcga cctccgcgtg 300  
 gccggcaccg ccgcccaggg catctacgtc acggcgacga acggcccac caagggaac 360  
 ctgatcgccc tgcgcaaaa cacgggcctg gacgacttcg tcgtcaaggg caccggccgc 420  
 atcggcgtcg gcatcgaccg cgcggccacg ccccgcgccc aggtccacat cgtccagcgg 480  
 ggcgacgccc tcgccgcgt cctggtggag ggctcggtag gcatcgggaa cgccgcgacg 540  
 gtgccg 546

30 <210> 9  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis

35 <400> 9  
 cgggagaagg gtgaacgc 18

40 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis

ES 2 643 485 T3

<400> 10  
ctccgcgacc agttcttcg 19

5 <210> 11  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Streptomyces koganeiensis

10 <400> 11  
ggcatctacg tcacggcgac gaac 24

15 <210> 12  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Streptomyces koganeiensis

20 <400> 12  
cgtacccgcg gttgggtgatc ttcag 25

25 <210> 13  
<211> 930  
<212> ADN  
<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 13  
ggtagctgtg acggctacac cccgccccaa cctccgtaca accattcgga gttgatcgtt 60  
gtcgttgacc cgggggactc atgcgactca tgcgtccctc cgttcacagc agacacgaga 120  
gagtggggga cgacgcatgc cgggtggcagc cagactgttt ctggggagct tcaccgcggg 180  
cgcggtgacc gtggcgacgg ccgcccgcgac gggtagcgcc tcggcggccg gggagaacgg 240  
cgcgacgacg accttcgacg gcccggtggc cgccgagagg ttcagcgcgg acaccacact 300  
ggaggccgcc ttcctcaaga cgacctcga gacgaaccac gcggcgacca tctaccaggc 360  
cggtagctcg ggcgacggcg cggcgctgaa cgtgatctcc gacaaccgg gcacctcggc 420  
catgtacctc tccggcaccg agaccgcgcg cggcaccctg aagatcacc accgcgggta 480  
cgccgacggc tccgacaagg acgcccgcgc cctgtcgtc gacctccgcg tggccggcac 540  
cgccgcccag ggcatctacg tcacggcgac gaacggcccg accaaggga acctgatcgc 600  
cctgcgcaac aacacgggcc tggacgactt cgtcgtcaag ggcaccggcc gcatcggcgt 660  
cggcatcgac cgcgcggcca cgccccgcgc ccaggctccac atcgtccagc ggggcgacgc 720  
cctcgccgcg ctcttggtgg agggctcggc acgcatcggg aacgcccga cggtagcgac 780  
gtcgggtggac agctcgggcg gcggcgccct gtacgcgtcg ggcggcgccc tgctgtggcg 840  
cggctccaac ggcacggtca cgacgatcgc accggcgtga agtacaggag agaacagtgc 900  
agttgacgcc cgaagaactg tttcgcgga 930

30 <210> 14  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 14  
accattcgga gttgatcgtt g 21

ES 2 643 485 T3

<210> 15  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 5 <213> Streptomyces koganeiensis  
  
 <400> 15  
 gtcaactgca ctgttctctc c 21  
  
 10 <210> 16  
 <211> 867  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis  
  
 15 <400> 16  
 accattcggg gttgatcgtt gtcggtgtcc cgggggactc atgcgactca tgcgtccctc 60  
 cgttcacagc agacacgaga gaggggggga cgacgcatgc cgggtggcacg cagactgttt 120  
 ctggggagct tcaccgcggg cgcggtgacc gtggcgacgg ccgccgacgac gggtagggcc 180  
 tcggcggccg gggagaacgg cgcgacgacg accttcgacg gcccgggtggc cgccgagagg 240  
 ttcagcgcgg acaccacact ggaggccgcc ttcctcaaga cgacctcggg gacgaaccac 300  
 gcggcgacca tctaccaggc cggtagctcg ggcgacggcg cggcgctgaa cgtgatctcc 360  
 gacaacccgg gcacctcggc catgtacctc tccggcaccc agaccgcgcg cggcacccctg 420  
 aagatcacc acccgggta cgccgacggc tccgacaagg acgccgccgc cctgtcgcctc 480  
 gacctccgcg tggccggcac cgccgccag ggcattctac tcacggcgac gaacggcccc 540  
 accaagggca acctgatcgc cctgcgcaac aacacgggccc tggacgactt cgtcgtcaag 600  
 ggcaccggcc gcatcggcgt cggcatcgac cgcgcggcca cgccccgcgc ccagggtccac 660  
 atcgtccagc gggcgacgc cctcgccgcg ctctggtgg agggctcggc acgcatcggg 720  
 aacgcccgca cggtagcgac gtcggtggac agctcgggcg gcggcgccct gtacgcgtcg 780  
 ggccggcccc tgctgtggcg cggctccaac ggcacgggta cgacgatcgc accggcgtga 840  
 agtacaggag agaacagtgc agttgac 867  
  
 <210> 17  
 <211> 744  
 20 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis

ES 2 643 485 T3

<400> 17  
atgccggtgg cacgcagact gtttctgggg agcttcaccg cgggcgcggt gaccgtggcg 60  
acggccgccg cgacgggtac ggcctcggcg gccggggaga acggcgcgac gacgacctc 120  
gacggcccgg tggccgccga gaggttcagc gcggacacca cactggaggc cgccttcctc 180  
aagacgacct cggagacgaa ccacgcggcg accatctacc aggccggtac gtcgggcgac 240  
ggcgcggcgc tgaacgtgat ctccgacaac ccgggcacct cggccatgta cctctccggc 300  
accgagaccg cgcgcggcac cctgaagatc acccaccgcg ggtacgccga cggctccgac 360  
aaggacgccg ccgccctgtc gctcgacctc cgcgtggccg gcaccgccgc ccagggcac 420  
tacgtcacgg cgacgaacgg cccgaccaag ggcaacctga tcgccctgcg caacaacacg 480  
ggcctggacg acttcgtcgt caagggcacc ggccgcatcg gcgtcggcat cgaccgcgcg 540  
gccacgcccc gcgcccaggt ccacatcgtc cagcggggcg acgccctcgc cgcgctcctg 600  
gtggagggct cggtagcat cgggaacgcc gcgacggtag cgacgtcggg ggacagctcg 660  
ggcggcggcg ccctgtacgc gtcgggcggc gccctgctgt ggcgcggctc caacggcacg 720  
gtcacgacga tcgcaccggc gtga 744

5 <210> 18  
<211> 247  
<212> PRT  
<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 18  
Met Pro Val Ala Arg Arg Leu Phe Leu Gly Ser Phe Thr Ala Gly Ala  
1 5 10 15  
Val Thr Val Ala Thr Ala Ala Ala Thr Gly Thr Ala Ser Ala Ala Gly  
20 25 30  
Glu Asn Gly Ala Thr Thr Thr Phe Asp Gly Pro Val Ala Ala Glu Arg  
35 40 45  
Phe Ser Ala Asp Thr Thr Leu Glu Ala Ala Phe Leu Lys Thr Thr Ser  
50 55 60  
Glu Thr Asn His Ala Ala Thr Ile Tyr Gln Ala Gly Thr Ser Gly Asp  
65 70 75 80

10

ES 2 643 485 T3

Gly Ala Ala Leu Asn Val Ile Ser Asp Asn Pro Gly Thr Ser Ala Met  
 85 90 95

Tyr Leu Ser Gly Thr Glu Thr Ala Arg Gly Thr Leu Lys Ile Thr His  
 100 105 110

Arg Gly Tyr Ala Asp Gly Ser Asp Lys Asp Ala Ala Ala Leu Ser Leu  
 115 120 125

Asp Leu Arg Val Ala Gly Thr Ala Ala Gln Gly Ile Tyr Val Thr Ala  
 130 135 140

Thr Asn Gly Pro Thr Lys Gly Asn Leu Ile Ala Leu Arg Asn Asn Thr  
 145 150 155 160

Gly Leu Asp Asp Phe Val Val Lys Gly Thr Gly Arg Ile Gly Val Gly  
 165 170 175

Ile Asp Arg Ala Ala Thr Pro Arg Ala Gln Val His Ile Val Gln Arg  
 180 185 190

Gly Asp Ala Leu Ala Ala Leu Leu Val Glu Gly Ser Val Arg Ile Gly  
 195 200 205

Asn Ala Ala Thr Val Pro Thr Ser Val Asp Ser Ser Gly Gly Gly Ala  
 210 215 220

Leu Tyr Ala Ser Gly Gly Ala Leu Leu Trp Arg Gly Ser Asn Gly Thr  
 225 230 235 240

Val Thr Thr Ile Ala Pro Ala  
 245

- <210> 19
- 5 <211> 387
- <212> ADN
- <213> Streptomyces koganeiensis

ES 2 643 485 T3

<400> 19  
 ttcgacggcc cggtagggc cagagaggttc agcgcggaca ccacactgga ggccgccttc 60  
 ctcaagacga cctcggagac gaaccacgcg gcgaccatct accaggccgg tacgtcgggc 120  
 gagggcgcgg cgctgaacgt gatctccgac aaccggggca cctcggccat gtacctctcc 180  
 ggcaccgaga ccgcgcgagg caccctgaag atcaccacc gcgggtacgc cgacggctcc 240  
 gacaaggacg ccgccgccct gtcgctcgac ctccgcgtgg ccggcaccgc cgcccagggc 300  
 atctacgtca cggcgacgaa cggcccgacc aagggaacc tgatcgccct gcgcaacaac 360  
 acgggcctgg acgacttcgt cgtcaag 387

5 <210> 20  
 <211> 90  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 20  
 atgccggtgg cacgcagact gtttctgggg agcttcaccg cgggcgagg gaccgtggcg 60  
 acggccgccc cgacgggtac ggcctcggcg 90

10

<210> 21  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 15 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 21  
 Ala Gly Glu Asn Gly Ala Thr Thr Thr Phe Asp Gly Pro Val Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Phe Ser Ala Asp Thr Thr Leu Glu Ala Ala Phe Leu Lys Thr  
 20 25 30  
 Thr Ser Glu Thr Asn His Ala Ala Thr Ile Tyr Gln Ala Gly Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Asp Gly Ala Ala Leu Asn Val Ile Ser Asp Asn Pro Gly Thr Ser  
 50 55 60  
 Ala Met Tyr Leu Ser Gly Thr Glu Thr Ala Arg Gly Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

ES 2 643 485 T3

Thr His Arg Gly Tyr Ala Asp Gly Ser Asp Lys Asp Ala Ala Ala Leu  
 85 90 95

Ser Leu Asp Leu Arg Val Ala Gly Thr Ala Ala Gln Gly Ile Tyr Val  
 100 105 110

Thr Ala Thr Asn Gly Pro Thr Lys Gly Asn Leu Ile Ala Leu Arg Asn  
 115 120 125

Asn Thr Gly Leu Asp Asp Phe Val Val Lys Gly Thr Gly Arg Ile Gly  
 130 135 140

Val Gly Ile Asp Arg Ala Ala Thr Pro Arg Ala Gln Val His Ile Val  
 145 150 155 160

Gln Arg Gly Asp Ala Leu Ala Ala Leu Leu Val Glu Gly Ser Val Arg  
 165 170 175

Ile Gly Asn Ala Ala Thr Val Pro Thr Ser Val Asp Ser Ser Gly Gly  
 180 185 190

Gly Ala Leu Tyr Ala Ser Gly Gly Ala Leu Leu Trp Arg Gly Ser Asn  
 195 200 205

Gly Thr Val Thr Thr Ile Ala Pro Ala  
 210 215

- 5 <210> 22
- <211> 651
- <212> ADN
- <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 22  
 gccggggaga acggcgcgac gacgaccttc gacggcccgg tggccgccga gaggttcagc 60  
 gcggacacca cactggaggc cgccttcctc aagacgacct cggagacgaa ccacgcggcg 120  
 accatctacc aggccggtac gtcgggacgac ggcgcggcgc tgaacgtgat ctccgacaac 180  
 ccgggcacct cggccatgta cctctccggc accgagaccg cgcgcggcac cctgaagatc 240  
 acccaccgcg ggtacgccga cggctccgac aaggacgccg ccgccctgtc gctcgacctc 300

10



ES 2 643 485 T3

cgcgtggccg gcaccgccgc ccagggcatc tacgtcacgg cgacgaacgg cccgaccaag 360  
 ggcaacctga tgcacctgcg caacaacacg ggcctggacg acttcgtcgt caagggcacc 420  
 ggccgcatcg gcgtcggcat cgaccgcgcg gccacgcccc gcgcccaggt ccacatcgtc 480  
 cagcggggcg acgccctcgc cgcgctcctg gtggagggct cggtacgcat cgggaacgcc 540  
 gcgacggtag cgacgtcggg ggacagctcg ggcggcggcg ccctgtacgc gtcgggcggc 600  
 gccctgctgt ggcgcggctc caacggcacg gtcacgacga tcgcaccggc g 651  
 <210> 23  
 5 <211> 741  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces pristinaespiralis  
 <400> 23  
 atgagcgtgt cgcggaggtt gttcctcgga gggttcaccg cggggcgggg gaccgtggcg 60  
 gcgggcgccc cgcgacgcc ggcggcggcc gcggaggcgg acggcccgac gacgacgttc 120  
 gacgggtccg tgggtggcga gggtttcagg acggactcca ccgtcaagtc gcctttcttc 180  
 aagacgacgt cgacgaccga gcacgcgggt agggcctatc agggccggcac gtccggcagc 240  
 ggcgtggccc tgaacgtcgt atcgaagaac ccgggtgact cggccatgta tctcagtggc 300  
 acggagaagg cgcacggcac gctgaagatc tcgcacacgg gccacgcgga cggctcggac 360  
 gagaaggcgt ccgctctgtc gatcgacctg ctgacggcgg ggacggcagc ccagggcatc 420  
 ttcgtgaagg cgggcaacgg gcccaccacc ggcaacctga tctgcctgcg caacaacgcc 480  
 cgagacgact tcgtcgtcaa gggcagcggg cgggtcggta tcggcatggg cgtgggcggc 540  
 aaccctggt cgagctcca tgtcgtgcag cagccgggca ccgactcggc gctgatggtc 600  
 gagggcacgg tgcgggtcgt cgacgtggcc tccgcgccc cgggcgtcga ctgcgcggc 660  
 ggcggcgtgc tgtacgcgga gaacgggtgc ctgaagtggc gcggctccga caacacggtc 720  
 10 accaccatcg cccccgctg a 741  
 <210> 24  
 <211> 738  
 <212> ADN  
 15 <213> Streptomyces tsukubaensis

ES 2 643 485 T3

<400> 24  
atggctgtga accggagact cttcctgggc ggattcaccg cggggcggt gaccgtggcg 60  
gcgggactg cgacgcccgc tgcggccgc gcggcccagg ggccgacgac gacgttcgac 120  
gggcccgtgg tcgccgagcg cttcagcacg aactcgacgg tcaactccgc cttcctgaag 180  
acgacgtcca cgaccgagca cgccgacgacc gtctaccagg ccgggacctc gggcagcggg 240  
gtcgccctga acatcgtgtc ggacaaccg gacaactcgg cggctctacct caccggccgg 300  
gagaagacc gcggcaccct gaagatctcg cacatcggcc atgcggacgg gtccgacgcg 360  
gacgccccg ccgtgtccat cgacctgaag acggccggaa ccgccacgca gggcatcttc 420  
ctgaccgcca cggacggtgc cagcagggc aatctgatct gtctgcgcaa caacggccgc 480  
gacgatttcg tcgtcaaggg cagcggacgc gtcggcatcg gtctggcggg gggctccgc 540  
ccctggcccc agctccatgt cgtccagcgg ccgggggccc actccgcgct gatggtcgag 600  
ggagcggtac ggatcgtcga cgccgacgacc gtaccgacgg cggtcgactc caagggcggc 660  
ggcacgctct acgcacaggg cggcgagctg atgtggcgca gcgcaacgg caacgtcacc 720  
cgtatcgctt cggcctga 738

5 <210> 25  
<211> 375  
<212> ADN  
<213> *Streptomyces pristinaespiralis*

<400> 25  
ttcgacggtc cggtggtggc ggagggtttc aggacggact ccaccgtcaa gtccgccttc 60  
ttcaagacga cgtcgacgac cgagcacgcg gtgacggcct atcaggccgg cacgtccggc 120  
agcggcgtgg ccctgaacgt cgtatcgaag aaccgggtg actcggccat gtatctcagt 180  
ggcacggaga aggcgcacgg cacgctgaag atctcgaca cgggccacgc ggacggctcg 240  
gacgagaagg cgtccgctct gtcgatcgac ctgctgacgg cggggacggc agcccagggc 300  
atcttcgtga aggcgggcaa cgggcccacc accggcaacc tgatctgcct gcgcaacaac 360

10 gcccagagacg acttc 375

<210> 26  
<211> 393  
<212> ADN  
15 <213> *Streptomyces tsukubaensis*

ES 2 643 485 T3

<400> 26  
 ttcgacgggc ccgtggtcgc cgagcgcttc agcacgaact cgacggtcaa ctccgccttc 60  
 ctgaagacga cgtccacgac cgagcacgcc gcgaccgtct accaggccgg gacctcgggc 120  
 agcggggctcg ccctgaacat cgtgtcggac aaccgagaca actcggcgggt ctacctcacc 180  
 ggccgggaga agaccgaggc caccctgaag atctcgcaca tcggccatgc ggacgggtcc 240  
 gacgaggacg ccgccgccgt gtccatcgac ctgaagacgg ccggaaccgc cacgcagggc 300  
 atcttcctga ccgccacgga cgggtgccacg acgggcaatc tgatctgtct gcgcaacaac 360  
 gcccgcgacg atttcgtcgt caagggcagc gga 393

5 <210> 27  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis

10 <400> 27  
 ttcgacggcc cgggtg 15

15 <210> 28  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis

20 <400> 28  
 gtaggatccg ccggggagaa cggcgcgacg acga 34

25 <210> 29  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis

30 <400> 29  
 gactctagat cacgccggtg cgatcgtcgt gacc 34

35 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis

40 <400> 30  
 tgtggaattg tgagcggata 20

45 <210> 31  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis

50 <400> 31  
 tttcaacctt ttgtccagg t 21

55 <210> 32  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis

60 <400> 32  
 tggccatggc cggggagAAC ggccgcgacga cga 33

65 <210> 33  
 <211> 34

# ES 2 643 485 T3

<212> ADN  
<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 33  
5 ctcgaattct cacgccggtg cgatcgtcgt gacc 34

<210> 34  
<211> 20  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> promotor T7

15 <400> 34  
taatacgact cactataggg 20

<210> 35  
<211> 19  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> terminador T7

25 <400> 35  
gctagttatt gctcagcgg 19

<210> 36  
30 <211> 34  
<212> ADN  
<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 36  
35 atacatatgg ccggggagaa cggcgcgacg acga 34

<210> 37  
<211> 34  
<212> ADN  
40 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 37  
ctcgaattct cacgccggtg cgatcgtcgt gacc 34

45 <210> 38  
<211> 8711  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> Secuencia de vector pHTsk\_HYAL

ES 2 643 485 T3

<400> 38  
 ttaagttatt ggtatgactg gttttaagcg caaaaaaagt tgctttttcg tacctattaa 60  
 tgtatcgttt tagaaaaccg actgtaaaaa gtacagtcgg cattatctca tattataaaa 120  
 gccagtcatt aggcctatct gacaattcct gaatagagtt cataaacaat cctgcatgat 180  
 aaccatcaca aacagaatga tgtacctgta aagatagcgg taaatatatt gaattacctt 240  
 tattaatgaa ttttcctgct gtaataatgg gtagaaggta attactatta ttattgatat 300  
 ttaagttaaa cccagtaaat gaagtcctatg gaataataga aagagaaaaa gcattttcag 360  
 gtataggtgt tttgggaaac aatttccccg aaccattata tttctctaca tcagaaaggt 420  
 ataaatcata aaactctttg aagtcattct ttacaggagt ccaaatacca gagaatgttt 480  
 tagatacacc atcaaaaatt gtataaagtg gctctaactt atccaataa cctaactctc 540  
 cgtcgctatt gtaaccagtt ctaaaagctg tatttgagtt tatcacctt gtcactaaga 600  
 aaataaatgc agggtaaaat ttatatcctt cttgttttat gtttcggtat aaaacactaa 660  
 tatcaatttc tgtggttata ctaaaagtcg tttgttggtt caaataatga ttaaataatct 720

ES 2 643 485 T3

cttttctctt ccaattgtct aaatcaatth tattaaagtt catttgatat gcctcctaaa	780
ttttatcta aaglgaatth aggaggctta ctigtctgct ttcttcatta gaatcaatcc	840
tttttaaaa gtcaatatta ctgtaacata aatatatatt ttaaaaatat cccactttat	900
ccaattttcg tttgttgaac taatgggtgc tttagttgaa gaataaagac cacattaana	960
aatgtggtct tttgtgtttt tttaaaggat ttgagcgtag cgaaaaatcc ttttctttct	1020
tatcttgata ataagggtaa ctattgccga tcgtccattc cgacagcadc gccagtcact	1080
atggcgtgct gctagcgcca ttcgccattc aggctgcgca actgttggga agggcgatcg	1140
gtgcgggcct cttcgtatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta	1200
agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattc	1260
gagctcaggc cttactcac attaatgctg ttgcgctcac tgcccgttt ccagtcggga	1320
aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt	1380
attgggcgcc aggggtggtt ttctttcac cagtgcgacg ggcaacagct gattgccctt	1440
caccgcctgg ccctgagaga gttgcagcaa gcggtccacg ctggtttgcc ccagcaggcg	1500
aaaatcctgt ttgatggtgg ttgacggcgg gatataacat gagctgtctt cggtatcgtc	1560
gatatccact accgagatat ccgcaccaac gcgcagcccg gactcggtaa tggcgcgat	1620
tgcgcccagc gccatctgat cgttggaac cagcatcgca gtgggaacga tgccctcatt	1680
cagcatttgc atggtttgtt gaaaaccgga catggcactc cagtcgcctt cccgttccgc	1740
tatcggctga atttgattgc gagtgagata tttatgccag ccagccagac gcagacgcgc	1800
cgagacagaa cttaatgggc ccgctaacag cgcgatttgc tggtgacca atgcgaccag	1860
atgctccacg cccagtcgcg taccgtcttc atgggagaaa ataatactgt tgatgggtgt	1920
ctggtcagag acatcaagaa ataacgccgg aacattagtg caggcagctt ccacagcaat	1980
ggcatcctgg tcatccagcg gatagttaat gatcagccca ctgacgcgtt gcgcgagaag	2040
attgtgcacc gccgcttac aggccttcgac gccgcttcgt tctaccatcg acaccaccac	2100
gctggcacc agttgatcgg cgcgagattt aatcgccgcg acaatttgcg acggcgcgtg	2160
cagggccaga ctggaggtgg caacgccaat cagcaacgac tgtttgcccg ccagttgttg	2220
tgccacgcgg ttgggaatgt aattcagctc cgccatcgcc gcttccactt tttcccgcgt	2280

ES 2 643 485 T3

tttcgcagaa acgtggctgg cctggttcac cacgcgggaa acggtctgat aagagacacc	2340
ggcatactct gcgacatcgt ataacgttac tggtttcatc aaaatcgtct ccctccgttt	2400
gaatatttga ttgatcgtaa ccagatgaag cactctttcc actatcccta cagtgttatg	2460
gcttgaacaa tcacgaaaca ataattgga cgtacgatct ttcagccgac tcaaacaatca	2520
aatcttaca atgtagtctt tgaaagtatt acatatgtaa gatttaaag caaccgtttt	2580
ttcggaaagga aatgatgacc tcgtttccac cggaattagc ttggtaccag ctattgtaac	2640
ataatcggta cgggggtgaa aaagctaacg gaaaaggag cggaaaagaa tgatgtaagc	2700
gtgaaaaatt tttatctta tcacttgaaa ttggaaggga gattctttat tataagaatt	2760
gtggaattgt gagcggataa caattccaa ttaaaggagg aaggatcaat gattcaaaaa	2820
cгааагсggа сagtttcgtt сagacttgт сttatgtгca сgctgttatt tgtcagtttг	2880
ccgattacaa aaacatcagc cgtaggatcc gccggggaga acggcgcgac gacgacctc	2940
gacggcccgg tggccgccga gaggttcagc gcggacacca cactggaggc cgccctcctc	3000
aagacgacct cggagacgaa ccacgcggcg accatctacc aggccggtac gtcgggcgac	3060
ggcgcggcgc tgaacgtgat ctccgacaac ccgggcacct cggccatgta cctctccggc	3120
accgagaccg cgcgcggcac cctgaagatc acccaccgcg ggtacgccga cggctccgac	3180
aaggaccccг сgсссctgtc гctcгacctc сgcgtggccг гсaccgссgc ссaggгсatc	3240
tacgtcacgg cgacgaacgg cccgaccaag ggcaacctga tcgccctgcg caacaacacg	3300
ggcctggacg acttcgtcgt caagggcacc ggccgcatcg gcgtcggcat cgaccgcgcg	3360
gccacgccc gcgcccaggt ccacatcgtc cagcggggcg acgccctcgc cgcgctcctg	3420
gtggagggct cggtacgcat cgggaacgcc gcgacggtac cgacgtcggg ggacagctcg	3480
ggcggcggcg ccctgtacgc gtcgggcggc gccctgctgt ggcgcggtc caacggcacg	3540
gtcacgacga tcgaccggc gtgatctaga gtcgacgtcc ccggggcagc ccgcctaag	3600
agcgggcttt tttcacgtca cgcgtccatg gagatctttg tctgcaactg aaaagtttat	3660
accttacctg gaacaaatgg ttgaaacata cgaggcta atcggttat taggaatag	3720
ccctgtacta ataaaatcag gtggatcagt tgatcagtat attttgacg aagctcggaa	3780
agaatttggа gatgacttgc ttaattccac aattaaatta agggaaagaa taaagcatt	3840

ES 2 643 485 T3

tgatgttcaa ggaatcacgg aagaagatac tcatgataaa gaagctctaa aactattcaa 3900  
 taaccttaca atggaattga tcgaaagggg ggaaggtaa tggtagaaa attaggggat 3960  
 ctacctagaa agccacaagg cgataggtca agcttaaaga acccttacat ggatcttaca 4020  
 gattctgaaa gtaaagaac aacagagggt aaacaaacag aacccaaaag aaaaaagca 4080  
 ttgttgaaaa caatgaaagt tgatgtttca atccataata agattaaatc gctgcacgaa 4140  
 attctggcag catccgaagg gaattcatat tacttagagg atactattga gagagctatt 4200  
 gataagatgg ttgagacatt acctgagagc caaaaactt tttatgaata tgaattaaaa 4260  
 aaaagaacca acaaggctg agacagactc caaacgagtc tgtttttta aaaaaatat 4320  
 taggagcatt gaatatatat tagagaatta agaaagacat gggaataaaa atattttaaa 4380  
 tccagtaaaa atatgataag attatttcag aatatgaaga actctgtttg tttttgatga 4440  
 aaaaacaaac aaaaaaatc cacctaacgg aatctcaatt taactaacag cggccaaact 4500  
 gagaagttaa atttgagaag gggaaaaggc ggatttatac ttgtatttaa ctatctccat 4560  
 tttaacattt tattaaacc cacaagaagtg aaaatcctct tttacactgt tcctttaggt 4620  
 gatcgcgag ggacattatg agtgaagtaa acctaaaagg aaatacagat gaattagtgt 4680  
 attatcgaca gcaaaccact ggaaataaaa tcgccaggaa gagaatcaa aaagggaaag 4740  
 aagaagtta ttatgttgct gaaacggaag agaagatatg gacagaagag caaataaaaa 4800  
 acttttcttt agacaaattt ggtacgcata taccttacat agaaggtcat tatacaatct 4860  
 taaataatta cttctttgat ttttggggct attttttagg tgctgaagga attgcgctct 4920  
 atgctcacct aactcgttat gcatacggca gcaaagactt ttgctttcct agtctacaaa 4980  
 caatcgctaa aaaaatggac aagactcctg ttacagttag aggctacttg aaactgcttg 5040  
 aaaggtagcg ttttatttgg aaggtaaacg tccgtaataa aaccaaggat aacacagagg 5100  
 aatccccgat ttttaagatt agacgtaagg ttcctttgct ttcagaagaa cttttaaatg 5160  
 gaaaccctaa tattgaaatt ccagatgacg aggaagcaca tgtaaagaag gctttaaaaa 5220  
 aggaaaaaga gggctttcca aaggttttga aaaaagagca cgatgaattt gttaaaaaaa 5280  
 tgatggatga gtcagaaaca attaatatc cagaggcctt acaatatgac acaatgtatg 5340  
 aagatatact cagtaaagga gaaattcgaa aagaaatcaa aaaacaata cctaactccta 5400



ES 2 643 485 T3

caacatcttt tgagagtata tcaatgacaa ctgaagagga aaaagtcgac agtactttaa 5460  
 aaagcgaat gcaaaatcgt gtctctaagc cttcttttga tacctggttt aaaaacacta 5520  
 agatcaaaat tgaaaataaa aattgtttat tacttgtacc gagtgaattt gcatttgaat 5580  
 ggattaagaa aagatattta gaaacaatta aaacagtcct tgaagaagct ggatatgttt 5640  
 tcgaaaaaat cgaactaaga aaagtgcaat aaactgctga agtatttcag cagttttttt 5700  
 tatttagaaa tagtgaaaaa aatataatca gggaggtatc aatatttaat gagtactgat 5760  
 ttaaatttat ttagactgga attaataatt aacacgtaga ctaattaaaa ttaatgagg 5820  
 gataaagagg atacaaaaat attaatttca atccctatta aattttaaca agggggggat 5880  
 taaaatttaa ttagaggttt atccacaaga aaagacccta ataaaatttt tactagggtt 5940  
 ataactga ttaatttctt aatgggggag ggattaaaat ttaatgacaa agaaaacaat 6000  
 ctttaagaa aagcttttaa aagataataa taaaagagc tttgcgatta agcaaaactc 6060  
 tttacttttt cattgacatt atcaaattca tcgatttcaa attgttggtg tatcataaag 6120  
 ttaattctgt tttgcacaac cttttcagga atataaaaca catctgaggc ttgttttata 6180  
 aactcagggt cgctaaagtc aatgtaacgt agcatatgat atggtatagc ttccacccaa 6240  
 gttagccttt ctgcttcttc tgaatgtttt tcatataactt ccatgggtat ctctaaatga 6300  
 ttttctcat gtagcaaggt atgagcaaaa agtttatgga attgatagtt cctctctttt 6360  
 tcttcaactt ttttatctaa aacaaact ttaacatctg agtcaatgta agcataagat 6420  
 gttttccag tcataatttc aatcccaaat cttttagaca gaaattctgg acgtaaactc 6480  
 tttggtgaaa gaattttttt atgtagcaat atatccgata cagcaccttc taaaagcgtt 6540  
 ggtgaatagg gcattttacc tatctcctct cattttgtgg aataaaaata gtcatttcg 6600  
 tccatctacc tatctatta tcgaacagtt gaacttttta atcaaggatc agtccttttt 6660  
 ttcatattc ttaaactgtg ctcttaactt taacaactcg atttgttttt ccagatctcg 6720  
 aggtaacta gcctcgccga tcccgcaaga ggcccggcag tcagggtggca cttttcgggg 6780  
 aaatgtggc ggaaccctta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct 6840  
 catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat 6900  
 tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc 6960

ES 2 643 485 T3

tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg 7020  
 ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg 7080  
 ttttccaatg atgagcactt ttaaagtctt gctatgtggc gcggtattat cccgtattga 7140  
 cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgat acactattct cagaatgact tggttgagta 7200  
 ctaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc 7260  
 tgccataacc atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc 7320  
 gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg 7380  
 ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaa cgacgagcgt gacaccacga tgctttagc 7440  
 aatggcaaca acgttgcga aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca 7500  
 acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct 7560  
 tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat 7620  
 cattgcagca ctggggccag atggtaaacc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg 7680  
 gagtccaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgt gagataggtg cctcactgat 7740  
 taagcattgg taactgtcag accaagtta ctcatatata ctttagattg atttaaaact 7800  
 tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat 7860  
 cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 7920  
 ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct 7980  
 accagcgggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggtaactgg 8040  
 cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ctttctagtg tagccgtagt taggccacca 8100  
 cttcaagaac tctgtagcac gcctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc 8160  
 tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga 8220  
 taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac 8280  
 gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga 8340  
 agggagaaaag gcggacaggt atccggtaa cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 8400  
 ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg 8460  
 acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag 8520  
 caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct ttgctcaca tgttctttcc 8580  
 tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc 8640  
 tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc 8700  
 aatacgcattg c 8711

ES 2 643 485 T3

<210> 39  
 <211> 6124  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de vector pHyal\_sk

<400> 39  
 tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60  
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcacct agcgcgccgt cctttcgctt tcttccttc 120  
 ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180  
 gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240  
 acgtagtggg ccatcgcacct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300  
 ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggcttattc 360  
 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420  
 acaaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480  
 tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatTTTTc taaatacatt caaatatgta 540  
 tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600  
 gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctTTTTt gcggcatttt gccttcctgt 660  
 ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720  
 agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaaagatc cttgagagtt ttcgccccga 780  
 agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccc 840  
 tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg 900  
 tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960  
 10 cagtgtctgcc ataacatga gtgataaacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020

ES 2 643 485 T3

aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga 1080  
tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140  
tgagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc 1200  
ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260  
ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320  
cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380  
gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc 1440  
actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 1500  
aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 1560  
caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620  
aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 1680  
accgctacca gcggtgggtt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt 1740  
aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 1800  
ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tcctgttacc 1860  
agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 1920  
accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg 1980  
gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 2040  
tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggctcggaa caggagagcg 2100  
cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca 2160  
cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 2220  
cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatggt 2280  
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 2340  
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcagatca gtgagcgagg aagcgggaaga 2400  
gcgcctgatg cggtatcttc tccttacgca tctgtcgggt atttcacacc gcatatatgg 2460  
tgactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520  
cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacaccgcc aacaccgct gacgcgcctt 2580

ES 2 643 485 T3

gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 2640  
gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct 2700  
catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgctg ttcacccgcg tccagctcgt 2760  
tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg 2820  
tttttctctg tttggctact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa 2880  
tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgccc 2940  
ggttactgga acgttgtgag ggtaaaacaac tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa 3000  
aaatcactca ggggtcaatgc cagcgccttcg ttaatacaga tgtaggtggt ccacagggta 3060  
gccagcagca tcctgcatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct gacttccgcg 3120  
tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgttgttgct caggtcgcag 3180  
acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac 3240  
cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca 3300  
cccgtggggc cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg 3360  
gaccagtgac gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc 3420  
cgatcatcgt cgcgctccag cgaaagcggg cctcgcgaa aatgaccag agcgctgccg 3480  
gcacctgtcc tacgagttgc atgataaaga agacagtcac aagtgcggcg acgatagtca 3540  
tgccccgcgc ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgag 3600  
atccccgtgc ctaatgagtg agctaaacta cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt 3660  
tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag 3720  
gcggtttgcg tattggggcg cagggtggtt tttcttttca ccagtgagac gggcaacagc 3780  
tgattgccct tcaccgctg gccctgagag agttgcagca agcggccac gctggtttgc 3840  
cccagcaggc gaaaatcctg tttgatggtg gttaacggcg ggatataaca tgagctgtct 3900  
tcggtatcgt cgtatcccac taccgagata tccgcaccaa cgcgcagccc ggactcggta 3960  
atggcgcgca ttgcgcccag cgccatctga tcggtggcaa ccagcatcgc agtgggaaacg 4020  
atgccctcat tcagcatttg catggtttgt tgaaaaccgg acatggcact ccagtcgcct 4080  
tcccgttccg ctatcggctg aatttgattg cgagtgagat atttatgcca gccagccaga 4140

ES 2 643 485 T3

cgcagacgcg ccgagacaga acttaatggg cccgctaaca gcgcgatttg ctggtgacct 4200  
 aatgcgacca gatgctccac gcccagtcgc gtaccgtctt catgggagaa aataatactg 4260  
 ttgatgggtg tctggtcaga gacatcaaga aataacgccg gaacattagt gcaggcagct 4320  
 tccacagcaa tggcatcctg gtcattccagc ggatagttaa tgatcagccc actgacgcgt 4380  
 tgcgcgagaa gattgtgcac cgccgcttta caggcttcga cgccgcttcg ttctaccatc 4440  
 gacaccacca cgctggcacc cagttgatcg gcgcgagatt taatcgccgc gacaatttgc 4500  
 gcaggcgcgt gcagggccag actggaggtg gcaacgcca tcagcaacga ctgtttgcc 4560  
 gccagttgtt gtgccacgcg gttgggaatg taattcagct ccgccatcgc cgcttccact 4620  
 ttttcccgcg ttttcgcaga aacgtggctg gcctggttca ccacgcggga aacggctctga 4680  
 taagagacac cggcatactc tgcgacatcg tataacgta ctggtttcac attcaccacc 4740  
 ctgaattgac tctcttccgg gcgctatcat gccataccgc gaaaggtttt gcgccattcg 4800  
 atggtgtccg ggatctcgac gctctccctt atgcgactcc tgcattagga agcagcccag 4860  
 tagtaggtg aggccgttga gcaccgccgc cgcaaggaat ggtgcatgca aggagatggc 4920  
 gcccaacagt cccccgccca cggggcctgc caccataccc acgccgaaac aagcgctcat 4980  
 gagcccgaag tggcgagccc gatcttcccc atcgggtgatg tcggcgatat aggcgccagc 5040  
 aaccgcacct gtggcgccgg tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga ggatcgagat 5100  
 ctgatcccg cgaattaat acgactcact ataggggaat tgtgagcgga taacaattcc 5160  
 cctctagaaa taattttgtt taactttaag aaggagatat acatatgaaa tacctgctgc 5220  
 cgaccgctgc tgctggtctg ctgctcctcg ctgccagcc ggcgatggcc atggccgggg 5280  
 agaacggcgc gacgacgacc ttcgacggcc cgggtggccgc cgagaggttc agcgcgga 5340  
 ccacactgga ggccgccttc ctcaagacga cctcggagac gaaccacgcg gcgaccatct 5400  
 accaggccgg tacgtcgggc gacggcgccg cgctgaacgt gatctccgac aaccgggca 5460  
 cctcggccat gtacctctcc ggcaccgaga ccgcgcgccg caccctgaag atcaccacc 5520  
 gcgggtacgc cgacggctcc gacaaggacg ccgccgcct gtcgctcgac ctccgctgg 5580  
 ccggcaccgc cgccagggc atctacgtca cggcgacgaa cggcccgacc aagggaacc 5640  
 tgatgccct gcgcaacaac acgggcctgg acgacttctg cgtcaagggc accggccgca 5700

ES 2 643 485 T3

tcggcgtcgg catcgaccgc gcggccacgc cccgcgcca ggtccacatc gtccagcggg 5760  
 gcgacgcct cgccgcgctc ctgggtggagg gctcggtagc catcggaac gccgcgacgg 5820  
 taccgacgtc ggtggacagc tcgggcggcg gcgccctgta cgcgtcgggc ggccgacctg 5880  
 tgtggcggcg ctccaacggc acggtcacga cgatgcacc ggcgtgagaa ttcgagctcc 5940  
 gtcgacaagc ttgcgccgc actcgagcac caccaccacc accactgaga tccggctgct 6000  
 aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct gctgccaccg ctgagcaata actagcataa 6060  
 ccccttgggg cctctaaac ggtcttgagg ggtttttgc tgaaaggagg aactatatcc 6120  
 ggat 6124

<210> 40  
 <211> 6058  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de vector pHyal\_sk\_SL

10

<400> 40  
 tggcgaatgg gacgcgcct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60  
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct agcgcgccgt ctttcgctt tcttcccttc 120  
 ctttctgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg 180  
 gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240  
 acgtagtggg ccatgcacct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacggt 300  
 cttaaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc 360  
 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420  
 acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480  
 tcggggaaat gtgcgcggaa ccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540  
 tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600  
 gagtattcaa ctttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttctgt 660  
 ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720  
 agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga 780

ES 2 643 485 T3

agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg 840  
 tattgacgcc gggcaagagc aactcggctc ccgatacac tattctcaga atgacttggc 900  
 tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960  
 cagtgtgcc ataacatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020  
 aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga 1080  
 tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140  
 tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc 1200  
 ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260  
 ggcccttccg gctggctggc ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320  
 cggtatcatt gcagcactgg gccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380  
 gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc 1440  
 actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 1500  
 aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 1560  
 caaaatccct taacgtgagt tttcgtcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620  
 aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 1680  
 accgctacca gcggtggtt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt 1740  
 aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagttagc cgtagttagg 1800  
 ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tcctgttacc 1860  
 agtggctgct gccagtgcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 1920  
 accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggc 1980  
 gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 2040  
 tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 2100  
 cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca 2160  
 cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 2220  
 cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt ggcccttttc tggccttttg ctcacatggt 2280  
 ctttctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 2340



ES 2 643 485 T3

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcgggaaga	2400
g'gcgcctgatg cgglattttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatatgg	2460
tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat	2520
cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacaccgcc aacaccgct gacgcgccct	2580
gacgggcttg tctgctccc gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct	2640
gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct	2700
catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgcctg ttcacccgcg tccagctcgt	2760
tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg	2820
tttttctctg tttggctact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa	2880
tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgcc	2940
ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa	3000
aaatcactca gggccaatgc cagcgcttcg ttaatacaga tgtaggtgtt ccacagggta	3060
gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct gacttccgcg	3120
tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgttgttgct caggtcgcag	3180
acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgat cggtgattca ttctgctaac	3240
cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca	3300
cccgtggggc cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg	3360
gaccagtgac gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgcacaggc	3420
cgatcatcgt cgcgctccag cgaaagcggg cctcgcgcaa aatgaccag agcgcctgccg	3480
gcacctgtcc tacgagttgc atgataaaga agacagtcac aagtgcggcg acgatagtca	3540
tgccccgcgc ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgag	3600
atccccgtgc ctaatgagt agctaactta cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt	3660
tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag	3720
gcggtttgcg tattgggcgc cagggtggtt tttcttttca ccagtgagac gggcaacagc	3780
tgattgccct tcaccgcctg gccctgagag agttgcagca agcgggtccac gctggtttgc	3840
cccagcaggc gaaaatcctg tttgatggtg gttaacggcg ggatataaca tgagctgtct	3900

ES 2 643 485 T3

tcggtatcgt cgtatcccac taccgagata tccgcaccaa cgcgcagccc ggactcggta 3960  
 atggcgcgca ttgcgcccag cgccatctga tcgttgga caagcatcgc agtgggaacg 4020  
 atgccctcat tcagcatttg catggtttgt tga aaaccgg acatggcact ccagtcgcct 4080  
 tcccgttccg ctatcggctg aatttgattg cgagtgagat atttatgcca gccagccaga 4140  
 cgcagacgcg ccgagacaga acttaatggg cccgctaaca gcgcgatttg ctggtgacct 4200  
 aatgcgacca gatgctccac gcccagtcgc gtaccgtctt catgggagaa aataaactg 4260  
 ttgatgggtg tctggtcaga gacatcaaga aataacgccg gaacattagt gcaggcagct 4320  
 tccacagcaa tggcatcctg gtcacccagc ggatagttaa tgatcagccc actgacgcgt 4380  
 tgcgcgagaa gattgtgcac cgccgcttta caggcttcga cgccgcttcg ttctaccatc 4440  
 gacaccacca cgctggcacc cagttgatcg gcgcgagatt taatcgccgc gacaatttgc 4500  
 gacggcgcgt gcagggccag actggagggtg gcaacgcaa tcagcaacga ctgtttgccc 4560  
 gccagttggt gtgccacgcg gttgggaatg taattcagct ccgccatcgc cgcttccact 4620  
 tttcccgcg ttttcgcaga aacgtggctg gcctggttca ccacgcggga aacggcttga 4680  
 taagagacac cggcatactc tgcgacatcg tataacgtta ctggtttcac attcaccacc 4740  
 ctgaattgac tctcttccgg gcgctatcat gccataccgc gaaaggtttt gcgccattcg 4800  
 atggtgtccg ggatctcgac gctctccctt atgcgactcc tgcattagga agcagcccag 4860  
 tagtaggttg aggccgttga gcaccgccgc cgcaaggaat ggtgcatgca aggagatggc 4920  
 gcccaacagt cccccggcca cggggcctgc caccataccc acgccgaaac aagcgtcat 4980  
 gagcccgaag tggcgagccc gatcttcccc atcgggtgatg tcggcgatat aggcgccagc 5040  
 aaccgcacct gtggcgccgg tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga ggatcgagat 5100  
 ctcgatcccg cgaaattaat acgactcact ataggggaat tgtgagcggg taacaattcc 5160  
 cctctagaaa taattttggt taactttaag aaggagatat acatatggcc ggggagaacg 5220  
 gcgcgacgac gaccttcgac ggcccgggtg ccgccgagag gttcagcgcg gacaccacac 5280  
 tggaggccgc cttcctcaag acgacctcgg agacgaacca cgcggcgacc atctaccagg 5340  
 ccggtacgtc gggcgacggc gcggcgctga acgtgatctc cgacaacccg ggcacctcgg 5400  
 ccatgtacct ctccggcacc gagaccgcgc gcggcacctt gaagatcacc caccgcggtt 5460

ES 2 643 485 T3

acgccgacgg ctccgacaag gacgccgccg ccctgtcgtc cgacctccgc gtggccggca 5520  
 ccgccgcca gggcatctac gtcacggcga cgaacggccc gaccaagggc aacctgatcg 5580  
 ccctgcgcaa caacacgggc ctggacgact tcgtcgtcaa gggcaccggc cgcacggcg 5640  
 tcggcatcga ccgcgcgcc acgccccgcg cccaggtcca catcgtccag cggggcgacg 5700  
 ccctcgccgc gctcctggtg gagggctcgg tacgcatcgg gaacgccgcg acggtaccga 5760  
 cgtcggtgga cagctcgggc ggcggcgccc tgtacgcgtc gggcggcgcc ctgctgtggc 5820  
 gcggctcaa cggcacggtc acgacgatcg caccggcgtg agaattcgag ctccgtcgac 5880  
 aagcttgagg ccgcaactga gcaccaccac caccaccact gagatccggc tgctaacaaa 5940  
 gcccgaagg aagctgagtt ggctgctgcc accgctgagc aataactagc ataaccctt 6000  
 ggggcctcta aacgggtctt gaggggtttt ttgctgaaag gaggaactat atccggat 6058

<210> 41  
 <211> 654  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces koganeiensis

5

<400> 41  
 atggccgggg agaacggcgc gacgacgacc ttcgacggcc cgggtggccgc cgagaggttc 60  
 agcgcggaca ccacactgga ggccgccttc ctcaagacga cctcggagac gaaccacgcg 120  
 gcgaccatct accaggccgg tacgtcgggc gacggcgcgg cgctgaacgt gatctccgac 180  
 aaccggggca cctcggccat gtacctctcc ggcaccgaga ccgcgcgcgg caccctgaag 240  
 atcaccacc gcgggtacgc cgacggctcc gacaaggacg ccgccgccct gtcgctcgac 300  
 ctccgcgtgg ccggcaccgc cggccagggc atctacgtca cggcgacgaa cggccccgac 360  
 aagggcaacc tgatcgccct gcgcaacaac acgggcctgg acgacttcgt cgtcaagggc 420  
 accggccgca tcggcgctgg catcgaccgc gcgccacgc cccgcgcca ggtccacatc 480  
 gtccagcggg gcgacgccct cggcgcgctc ctgggtggagg gctcggtagc catcgggaac 540  
 gccgcgacgg taccgacgtc ggtggacagc tcggggcggc gcgccctgta cgcgtcgggc 600  
 ggccgccctgc tgtggcgcgg ctccaacggc acggtcacga cgatcgacc ggcg 654

10

<210> 42  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>  
 <223> Secuencia aminoacídica N-terminal que sigue a transformación pHyal\_sk\_SL

<400> 42  
 Ala Gly Glu Asn Gly Ala  
 1 5

20

ES 2 643 485 T3

<210> 43  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
5  
<220>  
<223> La secuencia N-terminal más representada a partir de muestra de E.coli transformada con vector pHyal\_sk  
  
<400> 43  
Met Ala Gly Glu Asn Gly Ala  
10 1 5  
  
<210> 44  
<211> 13  
<212> PRT  
15 <213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> La secuencia N-terminal menos representada a partir de muestra de E.coli transformada con vector pHyal\_sk  
20 <400> 44  
Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Ala Gly Glu Asn Gly Ala  
1 5 10  
  
<210> 45  
<211> 7  
25 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia N-terminal de proteína parcialmente madura a partir de E.coli transformada con el vector pHyal\_sk  
30 <400> 45  
Ala Gln Pro Ala Met Ala Met  
1 5  
  
<210> 46  
35 <211> 129  
<212> PRT  
<213> Streptomyces koganeiensis

ES 2 643 485 T3

<400> 46

Phe Asp Gly Pro Val Ala Ala Glu Arg Phe Ser Ala Asp Thr Thr Leu  
1 5 10 15

Glu Ala Ala Phe Leu Lys Thr Thr Ser Glu Thr Asn His Ala Ala Thr  
20 25 30

Ile Tyr Gln Ala Gly Thr Ser Gly Asp Gly Ala Ala Leu Asn Val Ile  
35 40 45

Ser Asp Asn Pro Gly Thr Ser Ala Met Tyr Leu Ser Gly Thr Glu Thr  
50 55 60

Ala Arg Gly Thr Leu Lys Ile Thr His Arg Gly Tyr Ala Asp Gly Ser  
65 70 75 80

Asp Lys Asp Ala Ala Ala Leu Ser Leu Asp Leu Arg Val Ala Gly Thr  
85 90 95

Ala Ala Gln Gly Ile Tyr Val Thr Ala Thr Asn Gly Pro Thr Lys Gly  
100 105 110

Asn Leu Ile Ala Leu Arg Asn Asn Thr Gly Leu Asp Asp Phe Val Val  
115 120 125

Lys

<210> 47

5 <211> 30

<212> PRT

<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 47

Met Pro Val Ala Arg Arg Leu Phe Leu Gly Ser Phe Thr Ala Gly Ala  
1 5 10 15

10 Val Thr Val Ala Thr Ala Ala Ala Thr Gly Thr Ala Ser Ala  
20 25 30

<210> 48

<211> 246

<212> PRT

15 <213> Streptomyces pristinaespiralis

ES 2 643 485 T3

<400> 48

Met Ser Val Ser Arg Arg Leu Phe Leu Gly Gly Phe Thr Ala Gly Ala  
 1 5 10 15

Val Thr Val Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Pro Ala Ala Ala Ala Glu  
 20 25 30

Ala Asp Gly Pro Thr Thr Thr Phe Asp Gly Pro Val Val Ala Glu Gly  
 35 40 45

Phe Arg Thr Asp Ser Thr Val Lys Ser Ala Phe Phe Lys Thr Thr Ser  
 50 55 60

Thr Thr Glu His Ala Val Thr Ala Tyr Gln Ala Gly Thr Ser Gly Ser  
 65 70 75 80

Gly Val Ala Leu Asn Val Val Ser Lys Asn Pro Gly Asp Ser Ala Met  
 85 90 95

Tyr Leu Ser Gly Thr Glu Lys Ala His Gly Thr Leu Lys Ile Ser His  
 100 105 110

Thr Gly His Ala Asp Gly Ser Asp Glu Lys Ala Ser Ala Leu Ser Ile  
 115 120 125

Asp Leu Leu Thr Ala Gly Thr Ala Ala Gln Gly Ile Phe Val Lys Ala  
 130 135 140

ES 2 643 485 T3

Gly Asn Gly Pro Thr Thr Gly Asn Leu Ile Cys Leu Arg Asn Asn Ala  
 145 150 155 160

Arg Asp Asp Phe Val Val Lys Gly Ser Gly Arg Val Gly Ile Gly Met  
 165 170 175

Gly Val Gly Gly Asn Pro Trp Ser Gln Leu His Val Val Gln Gln Pro  
 180 185 190

Gly Thr Asp Ser Ala Leu Met Val Glu Gly Thr Val Arg Val Val Asp  
 195 200 205

Val Ala Ser Ala Pro Thr Gly Val Asp Ser Arg Gly Gly Gly Val Leu  
 210 215 220

Tyr Ala Glu Asn Gly Ala Leu Lys Trp Arg Gly Ser Asp Asn Thr Val  
 225 230 235 240

Thr Thr Ile Ala Pro Ala  
 245

- 5 <210> 49
- <211> 245
- <212> PRT
- <213> Streptomyces tsukubaensis

<400> 49  
 Met Ala Val Asn Arg Arg Leu Phe Leu Gly Gly Phe Thr Ala Gly Ala  
 1 5 10 15

Val Thr Val Ala Ala Gly Thr Ala Thr Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 20 25 30

Gln Gly Pro Thr Thr Thr Phe Asp Gly Pro Val Val Ala Glu Arg Phe  
 35 40 45

10 Ser Thr Asn Ser Thr Val Asn Ser Ala Phe Leu Lys Thr Thr Ser Thr  
 50 55 60

ES 2 643 485 T3

Thr Glu His Ala Ala Thr Val Tyr Gln Ala Gly Thr Ser Gly Ser Gly  
65 70 75 80

Val Ala Leu Asn Ile Val Ser Asp Asn Pro Asp Asn Ser Ala Val Tyr  
85 90 95

Leu Thr Gly Arg Glu Lys Thr Arg Gly Thr Leu Lys Ile Ser His Ile  
100 105 110

Gly His Ala Asp Gly Ser Asp Ala Asp Ala Ala Val Ser Ile Asp  
115 120 125

Leu Lys Thr Ala Gly Thr Ala Thr Gln Gly Ile Phe Leu Thr Ala Thr  
130 135 140

Asp Gly Ala Thr Thr Gly Asn Leu Ile Cys Leu Arg Asn Asn Gly Arg  
145 150 155 160

Asp Asp Phe Val Val Lys Gly Ser Gly Arg Val Gly Ile Gly Leu Ala  
165 170 175

Val Gly Ser Ala Pro Trp Ser Gln Leu His Val Val Gln Arg Pro Gly  
180 185 190

Ala Asp Ser Ala Leu Met Val Glu Gly Ala Val Arg Ile Val Asp Ala  
195 200 205

Ala Thr Val Pro Thr Ala Val Asp Ser Lys Gly Gly Gly Thr Leu Tyr  
210 215 220

Ala Gln Gly Gly Glu Leu Met Trp Arg Ser Ala Asn Gly Asn Val Thr  
225 230 235 240

Arg Ile Ala Ser Ala  
245

- <210> 50
- 5 <211> 125
- <212> PRT
- <213> Streptomyces pristinaespiralis



ES 2 643 485 T3

<400> 50

Phe Asp Gly Pro Val Val Ala Glu Gly Phe Arg Thr Asp Ser Thr Val  
 1 5 10 15

Lys Ser Ala Phe Phe Lys Thr Thr Ser Thr Thr Glu His Ala Val Thr  
 20 25 30

Ala Tyr Gln Ala Gly Thr Ser Gly Ser Gly Val Ala Leu Asn Val Val  
 35 40 45

Ser Lys Asn Pro Gly Asp Ser Ala Met Tyr Leu Ser Gly Thr Glu Lys  
 50 55 60

Ala His Gly Thr Leu Lys Ile Ser His Thr Gly His Ala Asp Gly Ser  
 65 70 75 80

Asp Glu Lys Ala Ser Ala Leu Ser Ile Asp Leu Leu Thr Ala Gly Thr  
 85 90 95

Ala Ala Gln Gly Ile Phe Val Lys Ala Gly Asn Gly Pro Thr Thr Gly  
 100 105 110

Asn Leu Ile Cys Leu Arg Asn Asn Ala Arg Asp Asp Phe  
 115 120 125

- 5 <210> 51
- <211> 131
- <212> PRT
- <213> Streptomyces tsukubaensis

<400> 51

Phe Asp Gly Pro Val Val Ala Glu Arg Phe Ser Thr Asn Ser Thr Val  
 1 5 10 15

Asn Ser Ala Phe Leu Lys Thr Thr Ser Thr Thr Glu His Ala Ala Thr  
 20 25 30

10 Val Tyr Gln Ala Gly Thr Ser Gly Ser Gly Val Ala Leu Asn Ile Val

ES 2 643 485 T3

35

40

45

Ser Asp Asn Pro Asp Asn Ser Ala Val Tyr Leu Thr Gly Arg Glu Lys  
50 55 60

Thr Arg Gly Thr Leu Lys Ile Ser His Ile Gly His Ala Asp Gly Ser  
65 70 75 80

Asp Ala Asp Ala Ala Ala Val Ser Ile Asp Leu Lys Thr Ala Gly Thr  
85 90 95

Ala Thr Gln Gly Ile Phe Leu Thr Ala Thr Asp Gly Ala Thr Thr Gly  
100 105 110

Asn Leu Ile Cys Leu Arg Asn Asn Gly Arg Asp Asp Phe Val Val Lys  
115 120 125

Gly Ser Gly  
130

- 5 <210> 52
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Streptomyces koganeiensis

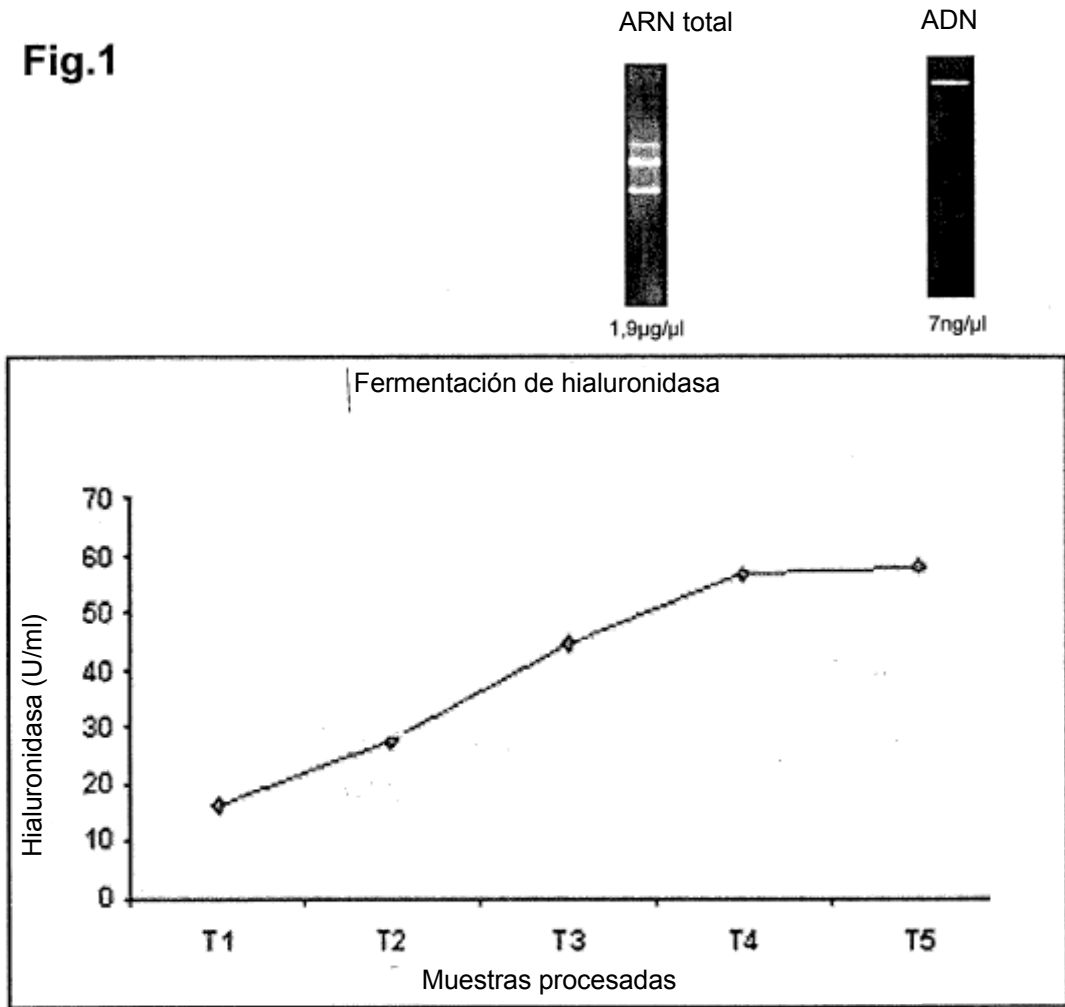
<400> 52  
Phe Asp Gly Pro Val  
1 5

10

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de hialuronidasa a partir de *Streptomyces koganei* ATCC 31394 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ. ID. N° 21 que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) inocular un medio de cultivo bacteriano en un biorreactor con un inóculo de células recombinantes que contienen al menos un vector que comprende la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 41;
- b) someter el contenido del biorreactor de la etapa a) a fermentación a un pH entre 6,7 y 7,1 en presencia de una solución nutritiva;
- c) añadir un inductor de los genes lac a la mezcla de la etapa b);
- d) someter la mezcla de la etapa c) a un periodo de inducción de entre 8 y 24 horas;
- 10 e) centrifugar las células bacterianas obtenidas en la etapa d);
- f) volver a suspender los gránulos obtenidos en la etapa e) y someter la suspensión resultante a choque osmótico;
- g) extraer las proteínas periplásmicas por centrifugación de la suspensión de la etapa f);
- h) purificar la fracción proteica que tiene actividad enzimática de hialuronidasa obtenida en la etapa g) mediante una secuencia de:
- 15 i. cromatografía de intercambio iónico fuerte y aislamiento de la fracción de actividad enzimática de hialuronidasa;
- ii. cromatografía de intercambio catiónico débil y aislamiento de la fracción de actividad enzimática de hialuronidasa;
- y
- iii. cromatografía de interacción hidrofóbica aromática y aislamiento de la fracción de actividad enzimática de hialuronidasa.
- 20 2. El método según la reivindicación 1, en el que la célula recombinante de la etapa a) se selecciona de una célula de *Escherichia coli* y una de *Bacillus subtilis*.
3. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa b), se usa una solución de glicerol como solución nutritiva.
4. La hialuronidasa recombinante de *Streptomyces koganei* ATCC 31394 en forma purificada y que comprende la secuencia de aminoácidos en SEQ. ID. N° 21, estando dicha hialuronasa recombinante libre de cisteína, con un contenido de endotoxinas < 0,5 U/mg.
- 25 5. Un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N° 17 que codifica la hialuronidasa bacteriana de la reivindicación 4.
6. Un vector recombinante modificado genéticamente que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5.
- 30 7. Un vector de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el vector es un plásmido.
8. Una célula huésped que comprende el vector de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 ó 7.
9. Una composición adecuada para uso farmacéutico o cosmético que comprende la hialuronidasa según la reivindicación 4.
- 35 10. La hialuronidasa según la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o trastorno, opcionalmente en combinación con al menos otro principio activo.
11. La hialuronidasa para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el trastorno o la enfermedad son al menos uno seleccionado entre edemas, estados inflamatorios, sabañones, tumores sólidos, alergias mediadas por IgE, enfermedades de la cavidad oral, hemorragias vítreas espontáneas, arteriosclerosis, trastornos de la presión sanguínea, trastornos vasculares cardio-cerebrales tales como estenosis arterial cerebral o accidente cerebrovascular o mastitis bovina.
- 40 12. El uso no terapéutico de la hialuronidasa según la reivindicación 4, para aplicaciones cosméticas y/o para mejorar la apariencia estética.

**Fig.1**



T1, T2, T3, T4, procesados por purificación de ARN

T1, T2, T4, T5, procesados por extracción de ADN

**Fig.2**

```

1   GAG AAC GGG GGG ACG ACG ACG TTC GAC GGC CCG GTG GGC GGC GAG 45
1   E N G A T T T F D G P V A A E 15

46  AGG TTC AGC GCG GAC ACC ACA CTG GAG GGC GGC TTC CTC AAG ACG 90
16  R P S A D T T L E A A P L K T 30

91  ACC TCG GAG ACG AAC CAC GCG GGG ACC ATC TAC CAG GGC GGT ACG 135
31  T S E T N H A A T I Y Q A G T 45

136 TCG GGC GAC GGC GCG GCG CTG AAC GTG ATC TCC GAC AAC CCG GGC 180
46  S G D G A A L N V I S D N P G 60

181 ACC TCG GGC ATG TAC CTC TCC GGC ACC GAG ACC GCG CCG GGC ACC 225
61  I S A M Y L S G T E T A R G T 75

226 CTG AAG ATC ACC CAC CCG GCG TAC GGC GAC GGC TCC GAC AAG GAC 270
76  L K I T H R G Y A D G S D K D 90

271 GGC GGC GGC CTG TCG CTC GAC CTG CCG GTS GGC GGC ACC GGC GGC 315
91  A A A L S L D L R V A G T A A 105

316 CAG GGC ATC TAC GTC ACG GCG ACG AAC GGC CCG ACC AAG GGC AAC 360
106 Q G I Y V T A T N G P T K G N 120

361 CTG ATC GGC CTG CCG AAC AAC ACG GGC CTG GAC GAC TTC GTC GTC 405
121 L I A L R N N P G L D D F V V 135

406 AAG GGC ACC GGT CFC ATC GGC GTC GGC ATC GAC CCG GCG GGC ACG 450
136 K G T G R I G V G I D R A A T 150

451 CCG CCG GGC CAG GTC CAC ATC CTC CAG CCG GGC GAC GGC CTC GGC 495
151 P R A Q V H I V Q R G D A L A 165

496 GCG CTC CTG GTS GAG GGC TCG GTA CCG AIC GGG AAC GCG GCG ACG 540
166 A L L V E G S V R I G N A A T 180

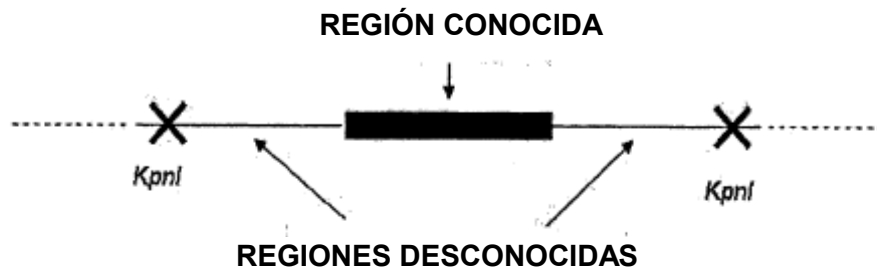
541 GTC CCG 546
181 V P

```

Aparte de la diferencia de un aminoácido (subrayado), se encontraron todas las secuencias obtenidas por las secuencias proteicas previas (caracteres en negrita).

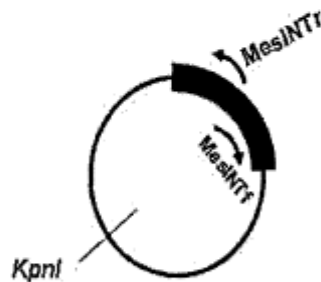
**Fig.3**

**a) DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DEL GENOMA**



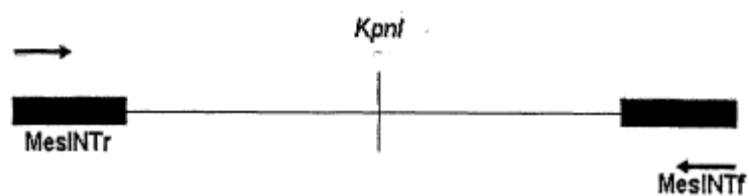
**X** SITIO DE RESTRICCIÓN PUTATIVO POR ENZIMA

**b) LIGACIÓN DE LA ENZIMA DIGERIDA**



**c) AMPLIFICACIÓN CON CEBADOR**

**INTERNO A LA REGIÓN CONOCIDA**



**Fig.4**

1	<u>ggta cct</u> gtg acg gct aca ccc cgc ccc aac ctc cgt aca acc att	45
1		15
46	ccgg agt tga tgg ttg tgg tcc cgg ggg act cat ggg act cat	90
16		30
91	gcg tcc ctc cgt tca cag cag aca cga gag agt ggg gga cga cgc	135
31		45
136	<b>ATG CCG GTG GCA CGC AGA CTG TTT CTG GGG AGC TTC ACC GCG GGC</b>	180
46	<b>M P V A R R L F L G S F T A G</b>	60
181	<i>GCG GTG ACC GTG GCG ACG GCC GCC GCG ACG GGT ACG GCC TCG GCG</i>	225
61	<i>A V T V A T A A A T G T A S A</i>	75
226	<i>GCC GCG GAG AAC GCG GCG ACG ACC TTC GAC GGC CCG GTG GCC</i>	270
76	<i>A G E N G A T T T F D G P V A</i>	90
271	<i>GCC GAG AGG TTC AGC GCG GAC ACC ACA CTG GAG GCC GCC TTC CTC</i>	315
91	<i>A E R R F S A D T T L E A A F L</i>	105
316	<i>AAG ACG ACC TCG GAG ACG AAC CAC GCG ACC ATC TAC CAG GCC</i>	360
106	<i>K T T S E T N H A A T I Y Q A</i>	120
361	<i>GGT ACG TCG GGC GAC GGC GCG GCG CTG AAC GTG ATC TCC GAC AAC</i>	405
121	<i>G T S G D G A A L N V I S D N</i>	135
406	<i>CCG GGC ACC TCG GCC ATG TAC CTC TCC GGC ACC GAG ACC GCG CGC</i>	450
136	<i>P G T S A M Y L S G T E T A R</i>	150
451	<i>GGC ACC CTG AAG ATC ACC CAC GCG GGG TAC GCC GAC GGC TCC GAC</i>	495
151	<i>G T L K I T H R G Y A D G S D</i>	165
496	<i>AAG GAC GCC GCC CTC TCG CTC GAC CTC CGC GTC GCC GGC ACC</i>	540
166	<i>K D A A A L S L D L R V A G T</i>	180
541	<i>GCC GCC CAG GGC ATC TAC GTC ACG GCG ACG AAC GGC CCG ACC AAG</i>	585
181	<i>A A Q G I Y V T A T N G P T K</i>	195
586	<i>GGC AAC CTG ATC GCC CTG CGC AAC AAC ACG GGC CTG GAC GAC TTC</i>	630
196	<i>G N L I A L R N N T G L D D F</i>	210
631	<i>GTC GTC AAG GGC ACC GGC CGC ATC GGC GTC GGC ATC GAC CGC GCG</i>	675
211	<i>V V K G T G R I G V G I D R A</i>	225
676	<i>GCC ACG CCC CGC GCC CAG GTC CAC ATC GTC CAG CGG GGC GAC GCC</i>	720
226	<i>A T P R A Q V H I V Q R G D A</i>	240
721	<i>CTC GCC GCG CTC CTG GTG GAG GGC TCG GTA CGC ATC GGG AAC GCC</i>	765
241	<i>L A A L L V E G S V R I G N A</i>	255
766	<i>GCG ACG GTA CCG ACG TCG GTG GAC AGC TCG GGC GGC GGC GCC CTG</i>	810
256	<i>A T V P T S V D S S G G G A L</i>	270
811	<i>TAC GCG TCG GGC GGC GCC CTG CTG TGG CGC GGC TCC AAC GGC ACG</i>	855
271	<i>Y A S G G A L L W R G S N G T</i>	285
856	<i>GTC ACG ACG ATC GCA CCG GCG tga agt aca gga gag aac agt gca</i>	900
286	<i>V T T I A P A *</i>	300
901	gtt gac gcc cga aga act gtt tgg cgg gag	930
301		

Ácidos nucleicos:

- En minúscula la región no codificante encontrada en 5' y en 3'.
- En cursiva la región codificante en 5' y en 3' encontrada con estas últimas etapas de procesamiento.
- En negrita los codones de INICIO y de PARADA.
- En subrayado la secuencia correspondiente a oligo en 5' MesFor2 (en negrita las secuencias nucleotídicas y conservadoras) y MesINTf/ MesINTR.
- En subrayado y negrita los sitios de restricción por KpnI

Aminoácidos:

- En negrita la región correspondiente a los resultados de la secuenciación proteica previa.
- En negrita las regiones correspondientes al péptido líder encontrado en esta última etapa de procesamiento.

5/29

**Fig.5**

3	acc att egg agt tga tog ttg tgg tcc cgg ggg act cat gcg	47
0		14
48	act cat gcg tcc ctc cgt tca cag cag aca cga gag agt ggg gga	92
15		29
93	ega cgc <b>ATG CCG GTG GCA CGC AGA CTG TTT CTG GGG AGC TTC ACC</b>	137
30	<b>M P V A R R L F L G S F T</b>	44
138	GCG GGC GCG GTG ACC GTG GCG ACG GCC GCC GCG ACG GGT ACG GCC	182
45	<b>A G A V T V A T A A A T G T A</b>	59
183	TCG GCG GCC GGG GAG AAC GGC GCG ACG ACG ACC TTC GAC GGC CCG	227
60	<b>S A A G E N G A T T T F D G P</b>	74
228	GTG GCC GCC GAG AGG TTC AGC GCG GAC ACC ACA CTG GAG GCC GCC	272
75	<b>V A A E R F S A D T T L E A A</b>	89
273	TTC CTC AAG ACG ACC TCG GAG ACG AAC CAC GCG GCG ACC ATC TAC	317
90	<b>F L K T T S E T N H A A T I Y</b>	104
318	CAG GCC GGT ACG TCG GGC GAC GGC GCG GCG CTG AAC GTG ATC TCC	362
105	<b>Q A G T S G D G A A L N V I S</b>	119
363	GAC AAC CCG GGC ACC TCG GCC ATG TAC CTC TCC GGC ACC GAG ACC	407
120	<b>D N P G T S A M Y L S G T E T</b>	134
408	GCG CGC GGC ACC CTG AAG ATC ACC CAC CGC GGG TAC GCC GAC GGC	452
135	<b>A R G T L K I T H R G Y A D G</b>	149
453	TCC GAC AAG GAC GCC GCC GCG CTG TCG CTC GAC CTC CGC GTG GCC	497
150	<b>S D K D A A A L S L D L R V A</b>	164
498	GGC ACC GCC GCC CAG GGC ATC TAC GTC ACG GCG ACG AAC GGC CCG	542
165	<b>G T A A Q G I Y V T A T N G P</b>	179
543	ACC AAG GGC AAC CTG ATC GCC CTG CGC AAC AAC ACG GGC CTG GAC	587
180	<b>T K G N L I A L R N N T G L D</b>	194
588	GAC TTC GTC GTC AAG GGC ACC GGC CGC ATC GGC GTC GGC ATC GAC	632
195	<b>D F V V K G T G R I G V G I D</b>	209
633	CGC GCG GCC ACG CCC CGC GCC CAG GTC CAC ATC GTC CAG CGG GGC	677
210	<b>R A A T P R A Q V H I V Q R G</b>	224
678	GAC GCC CTC GCC GCG CTC CTG GTG GAG GGC TCG GTA CGC ATC GGG	722
225	<b>D A L A A L L V E G S V R I G</b>	239
723	AAC GCC GCG ACG GTA CCG ACG TCG GTG GAC AGC TCG GGC GGC GGC	767
240	<b>N A A T V P T S V D S S G G G</b>	254
768	GCC CTG TAC GCG TCG GGC GGC GCC CTG CTG TGG CGC GGC TCC AAC	812
255	<b>A L Y A S G G A L L W R G S N</b>	269
813	GGC ACG GTC ACG ACG ATC GCA CCG GCG tga agt aca gga gag aac	857
270	<b>G T V T T I A P A *</b>	284
858	agt gca gtt gac	869
285		288

- En subrayado la región correspondiente al péptido líder.
- En negrita la secuencia de aminoácidos correspondiente a la hialuronidasa madura.
- En negrita y minúscula la secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados para el aislamiento.



**Fig.6 (a)**

CLUSTAL 2.1 alineamiento de secuencia múltiple

S.pristinaespiralis	MSVSRRLFLGGFTAGAVTVAGAAATPAAAAEADGPTITFDGFFVVAEGTRIDSTVKSATF 60
S.tsukubaensis	MAVNRRLFLGGFTAGAVTVAG-TATPAAAAAQGPTITFDGFFVVAERFSINSTVNSAFL 59
S.koganeiensis	MPVARRLFLGSSFTAGAVTVATAAATGTSASAAGENGATTFDGFFVVAERFSADITILEAFL 60
Actinoplanes	MAMARRLFLGSSFTAGAVTVAGEST---PAAAEI-TITTFGGFFVVAQRFSDSTIESAYF 56
	*.: *****.***** . :. : ** .**** **.*: * :.:*::*::
S.pristinaespiralis	KTTSTTEHAIVYQAGTSGSGVALNVVSKNPGDSAMYLSGTEKAEGLKISHIGHADGSD 120
S.tsukubaensis	KTTSTTEHAATVYQAGTSGSGVALNIVSENFENSAVYLTGREKTRGTLKISHIGHADGSD 119
S.koganeiensis	KTTSETNHAATVYQAGTSGDGAALNVISENPGTSAMYLSGIETARGILKITHRGYADGSD 120
Actinoplanes	KTTSVIDHNAVTVYQAASGRGVALNVVSDNEENSAMYLEGIELTGRGILKITHRGYDDGSD 116
	**** *.:*.* **.*:.* **.*:.* **.* **.* * . :*****.* * : ****
S.pristinaespiralis	EKASALSIDLLTAGTAAQGIFFVKAENGPITGNLICLRNN-ARDFVVKSGSRVIGMVG 179
S.tsukubaensis	ADAAVVSIDLKTAGTATQGIFLTATDGAITGNLICLRNN-GRDFVVKSGSRVIGLAVG 178
S.koganeiensis	KDAAALSIDLRVAGTAAQGIYVVIATNGPTKGNLIALRNNTGLDQFVVKETGRIGVGDRA 180
Actinoplanes	RSAAALSIDLRTAGTAAQGIYLTATNGPTTGLIALENPNPGRDDFTVIGRIGIGVNRG 176
	.*.:*:*.* .*****:*.* :.*.*.*.*.***** . **.*:*.*:*.*:*.* .
S.pristinaespiralis	GNPWSQLHVQQSGTDSALMVEGIVRVVDVASAFTGVDSRGGGVLYAENGALKWRGSDNI 239
S.tsukubaensis	SAPWSQLHVQRFPGADSALMVEGAVRIVDAIVPTAVDSKGGGTLYAQGGELMWRSAANG 238
S.koganeiensis	ATPRAQVHIVQRGDALAALLVEGSRVIGNAATVPTSVDSGGGALYASGGALLWRGSDNGI 240
Actinoplanes	DTPRQVHIVQQSGVPAGVLEGVVRIANTATVPTVPTVPTVPTVPTVPTVPTVPTVPTVPT 236
	* .*:~*::: .. :.:*:* ** :.:*:*..** *** ** * * **.*:..
S.pristinaespiralis	VTTIAPA 246
S.tsukubaensis	VTRIASA 245
S.koganeiensis	VTTIAPA 247
Actinoplanes	VTQIASA 243
	** **.*

Dominio funcional de hialuronidasa bacteriana (Hialuronidasa\_1)

- \* Residuos de aminoácidos conservados
- : Residuos de aminoácidos con propiedades fuertemente similares
- .
- Residuos de aminoácidos con propiedades fuertemente similares

Fig.6 (b)

7/29

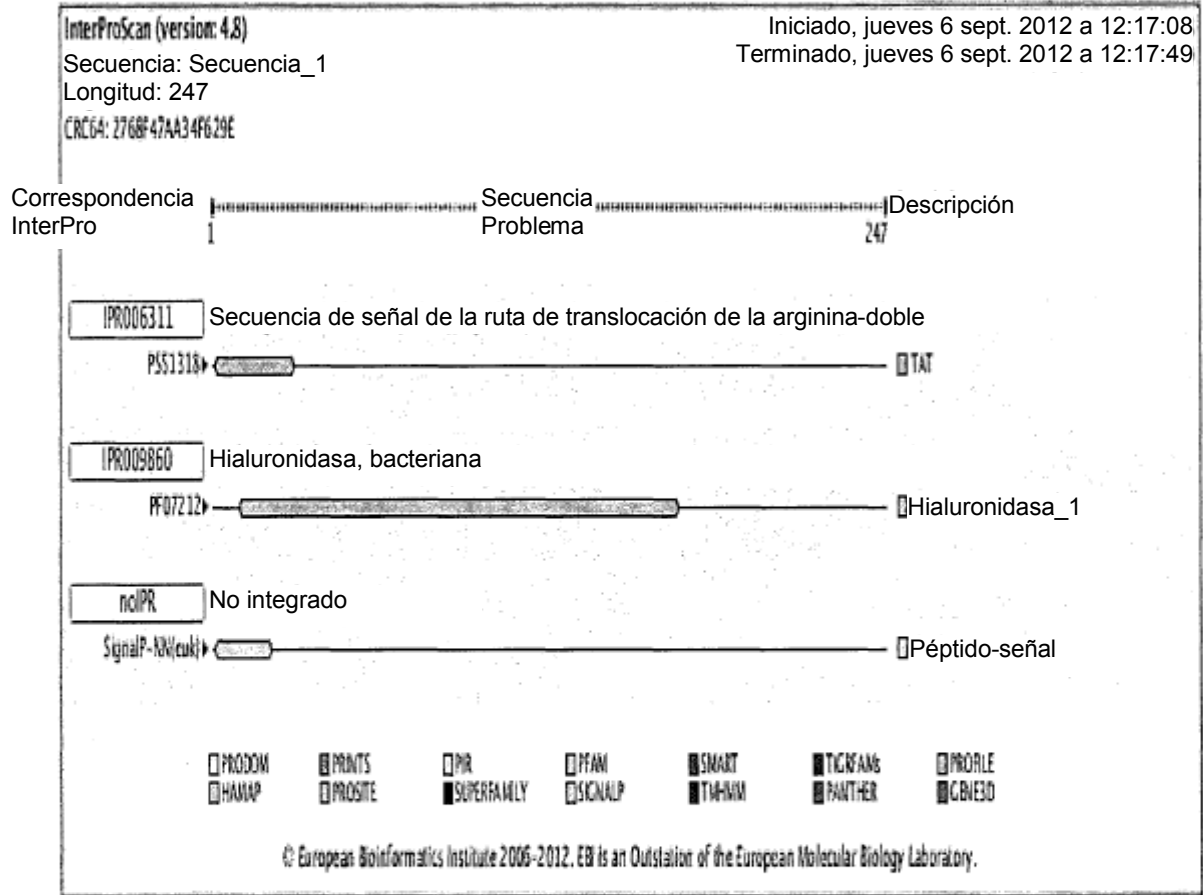
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment:

CLUSTAL 2.1 alineamiento de secuencia múltiple

Species	Sequence	Position
S. pristinaespiralis	ATGGCCGTGGCAGCAGACTGTCTCTGAGGAGCTTCACCGGGGGGCGGTGACCGTGGCG	60
S. teukubaensis	ATGGCCGTGGCAGCAGACTGTCTCTGAGGAGCTTCACCGGGGGGCGGTGACCGTGGCG	60
S. koganeiensis	ATGGCCGTGGCAGCAGACTGTCTCTGAGGAGCTTCACCGGGGGGCGGTGACCGTGGCG	60
Actinoplanes	ATGGCCGTGGCAGCAGACTGTCTCTGAGGAGCTTCACCGGGGGGCGGTGACCGTGGCG	60
S. pristinaespiralis	GG	117
S. teukubaensis	GG	114
S. koganeiensis	GG	117
Actinoplanes	GG	105
S. pristinaespiralis	TTGAGAGTCCGAGTGGTGGGGAGGGTTTCAGAGCAGACTCCAGGTCAGATCCGGCTTC	177
S. teukubaensis	TTGAGAGTCCGAGTGGTGGGGAGGGTTTCAGAGCAGACTCCAGGTCAGATCCGGCTTC	176
S. koganeiensis	TTGAGAGTCCGAGTGGTGGGGAGGGTTTCAGAGCAGACTCCAGGTCAGATCCGGCTTC	177
Actinoplanes	TTGAGAGTCCGAGTGGTGGGGAGGGTTTCAGAGCAGACTCCAGGTCAGATCCGGCTTC	168
S. pristinaespiralis	TTCAAGAGCAGCTGCAGCAGCGAGCGAGCGAGCTGAGCGGCTATCAGGGCGGACGCTCGCG	237
S. teukubaensis	TTCAAGAGCAGCTGCAGCAGCGAGCGAGCGAGCTGAGCGGCTATCAGGGCGGACGCTCGCG	234
S. koganeiensis	TTCAAGAGCAGCTGCAGCAGCGAGCGAGCGAGCTGAGCGGCTATCAGGGCGGACGCTCGCG	237
Actinoplanes	TTCAAGAGCAGCTGCAGCAGCGAGCGAGCGAGCTGAGCGGCTATCAGGGCGGACGCTCGCG	225
S. pristinaespiralis	AGCGGGTGGCGCTGAAAGCTGGTATCGAAGAACCGGGGACTCGGCGCATSTATCTCAT	297
S. teukubaensis	AGCGGGTGGCGCTGAAAGCTGGTATCGAAGAACCGGGGACTCGGCGCATSTATCTCAT	294
S. koganeiensis	AGCGGGTGGCGCTGAAAGCTGGTATCGAAGAACCGGGGACTCGGCGCATSTATCTCAT	297
Actinoplanes	AGCGGGTGGCGCTGAAAGCTGGTATCGAAGAACCGGGGACTCGGCGCATSTATCTCAT	285
S. pristinaespiralis	GGCAGGAGAGGGCTAAGCCAGCCTGAAATATCTGACACAGGGGCGAGCGGCGCTGG	357
S. teukubaensis	GGCAGGAGAGGGCTAAGCCAGCCTGAAATATCTGACACAGGGGCGAGCGGCGCTGG	354
S. koganeiensis	GGCAGGAGAGGGCTAAGCCAGCCTGAAATATCTGACACAGGGGCGAGCGGCGCTGG	357
Actinoplanes	GGCAGGAGAGGGCTAAGCCAGCCTGAAATATCTGACACAGGGGCGAGCGGCGCTGG	345
S. pristinaespiralis	GACGAGAGGGCTCCGCTCGGTCATGAGACTCTGACGCGGGGAGCGGAGCGGCGGCG	417
S. teukubaensis	GACGAGAGGGCTCCGCTCGGTCATGAGACTCTGACGCGGGGAGCGGAGCGGCGGCG	414
S. koganeiensis	GACGAGAGGGCTCCGCTCGGTCATGAGACTCTGACGCGGGGAGCGGAGCGGCGGCG	417
Actinoplanes	GACGAGAGGGCTCCGCTCGGTCATGAGACTCTGACGCGGGGAGCGGAGCGGCGGCG	405
S. pristinaespiralis	ATCTTGTGAGGGGGGCAAGGGGCGCAAGCGGCGCAAGCTGATCTGCTGGCAATAC	477
S. teukubaensis	ATCTTGTGAGGGGGGCAAGGGGCGCAAGCGGCGCAAGCTGATCTGCTGGCAATAC	474
S. koganeiensis	ATCTTGTGAGGGGGGCAAGGGGCGCAAGCGGCGCAAGCTGATCTGCTGGCAATAC	477
Actinoplanes	ATCTTGTGAGGGGGGCAAGGGGCGCAAGCGGCGCAAGCTGATCTGCTGGCAATAC	465
S. pristinaespiralis	---GGGCGAGAGCTTCGGGGCAAGGGGCGAGGGGGGGGTCGGGATCGGCGAT---GGGG	533
S. teukubaensis	---GGGCGAGAGCTTCGGGGCAAGGGGCGAGGGGGGGGTCGGGATCGGCGAT---GGGG	530
S. koganeiensis	---GGGCGAGAGCTTCGGGGCAAGGGGCGAGGGGGGGGTCGGGATCGGCGAT---GGGG	533
Actinoplanes	---GGGCGAGAGCTTCGGGGCAAGGGGCGAGGGGGGGGTCGGGATCGGCGAT---GGGG	525
S. pristinaespiralis	G---GGGCGAGAGCTTCGGGGCAAGGGGCGAGGGGGGGGTCGGGATCGGCGAT---GGGG	592
S. teukubaensis	G---GGGCGAGAGCTTCGGGGCAAGGGGCGAGGGGGGGGTCGGGATCGGCGAT---GGGG	589
S. koganeiensis	G---GGGCGAGAGCTTCGGGGCAAGGGGCGAGGGGGGGGTCGGGATCGGCGAT---GGGG	592
Actinoplanes	G---GGGCGAGAGCTTCGGGGCAAGGGGCGAGGGGGGGGTCGGGATCGGCGAT---GGGG	583
S. pristinaespiralis	TTGATGGTGAAGGGCAGGCTGCGGCTCGTGGAGTGGGCTGGCGGGCAGGGGCTGGACT	652
S. teukubaensis	TTGATGGTGAAGGGCAGGCTGCGGCTCGTGGAGTGGGCTGGCGGGCAGGGGCTGGACT	649
S. koganeiensis	TTGATGGTGAAGGGCAGGCTGCGGCTCGTGGAGTGGGCTGGCGGGCAGGGGCTGGACT	652
Actinoplanes	TTGATGGTGAAGGGCAGGCTGCGGCTCGTGGAGTGGGCTGGCGGGCAGGGGCTGGACT	643
S. pristinaespiralis	CGCGGG	712
S. teukubaensis	CGCGGG	709
S. koganeiensis	CGCGGG	712
Actinoplanes	CGCGGG	703
S. pristinaespiralis	ACAGGGTCAAGCAGATCGCGGG	741
S. teukubaensis	ACAGGGTCAAGCAGATCGCGGG	738
S. koganeiensis	ACAGGGTCAAGCAGATCGCGGG	741
Actinoplanes	ACAGGGTCAAGCAGATCGCGGG	732

- \* Residuos conservados
- Residuos con propiedades fuertemente similares
- Residuos con propiedades débilmente similares

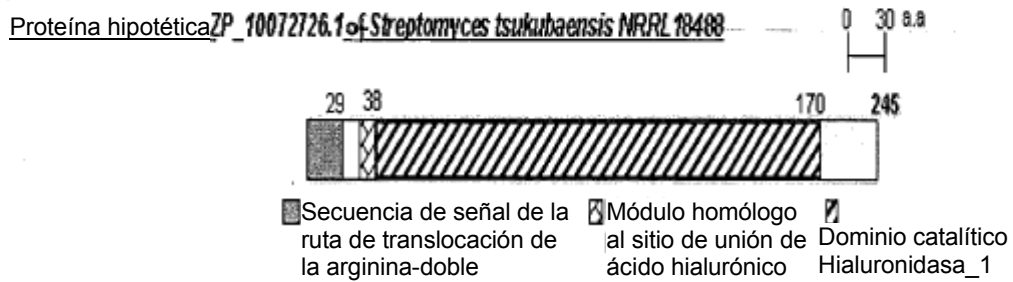
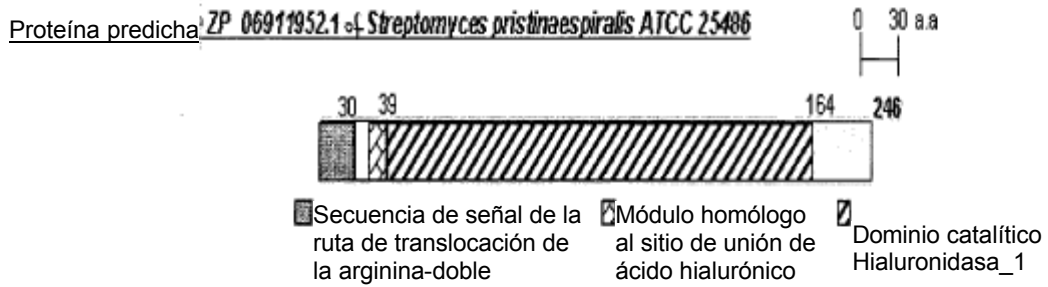
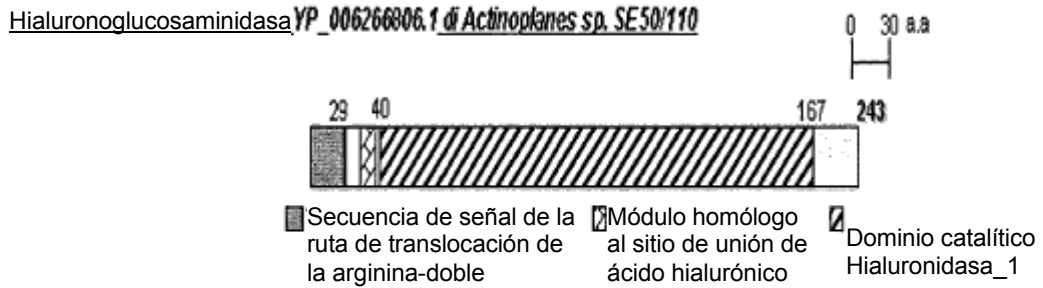
**Fig.7 (a)**



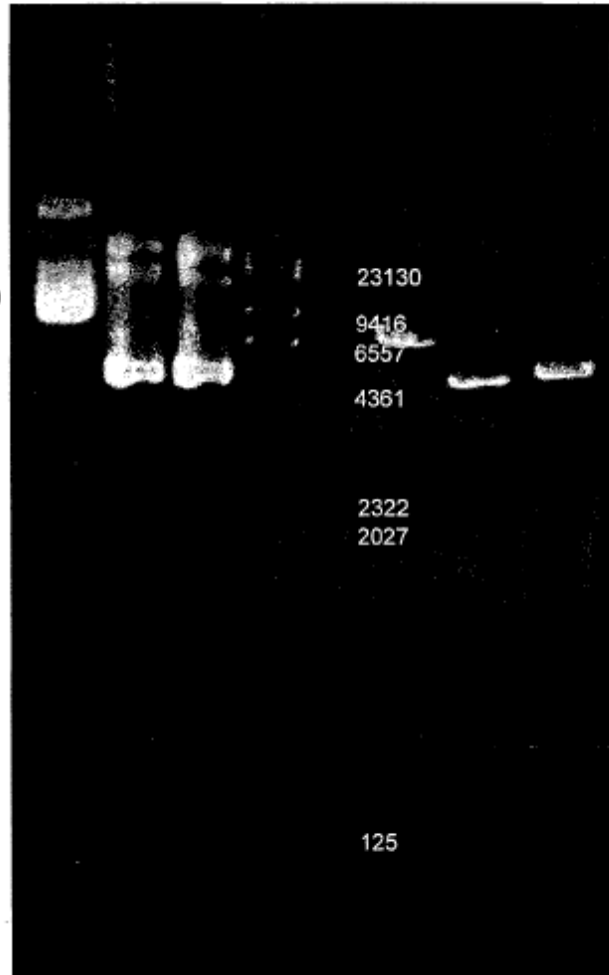
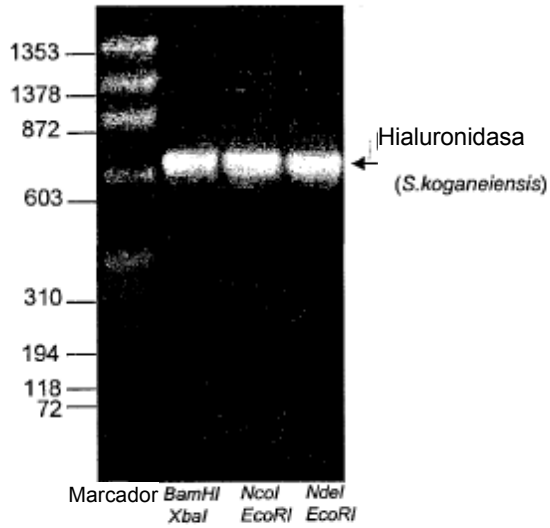
Secuencia de aminoácidos de Hialuronidasa de *S. Koganeiensis*:



**Fig.7 (b)**



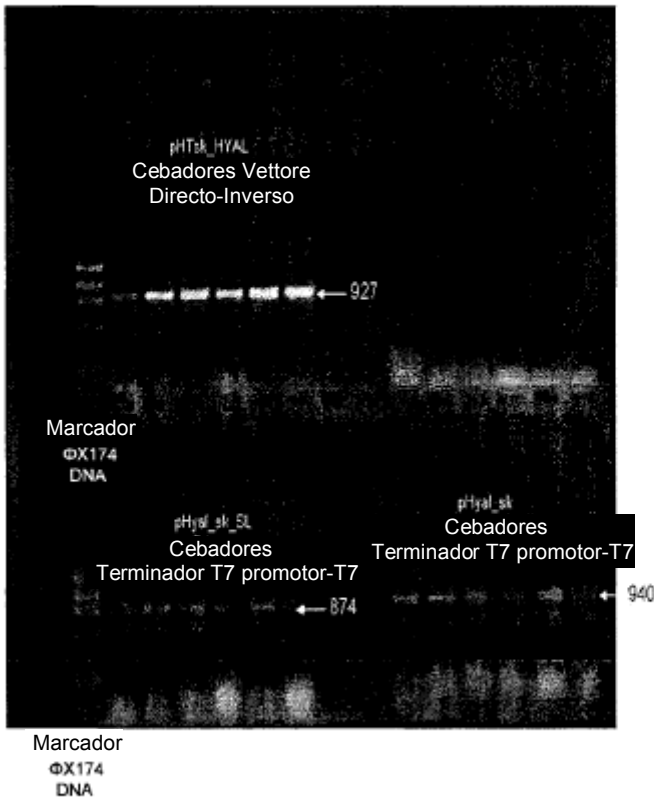
**Fig.8**



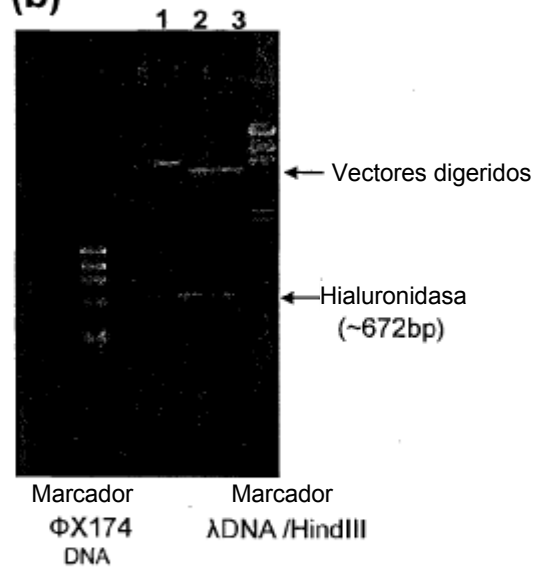
pHT43 pET21b(+)pET22b(+)  
Marcador BamHI NdeI NcoI  
XbaI EcoRI EcoRI

Fig.9

(a)

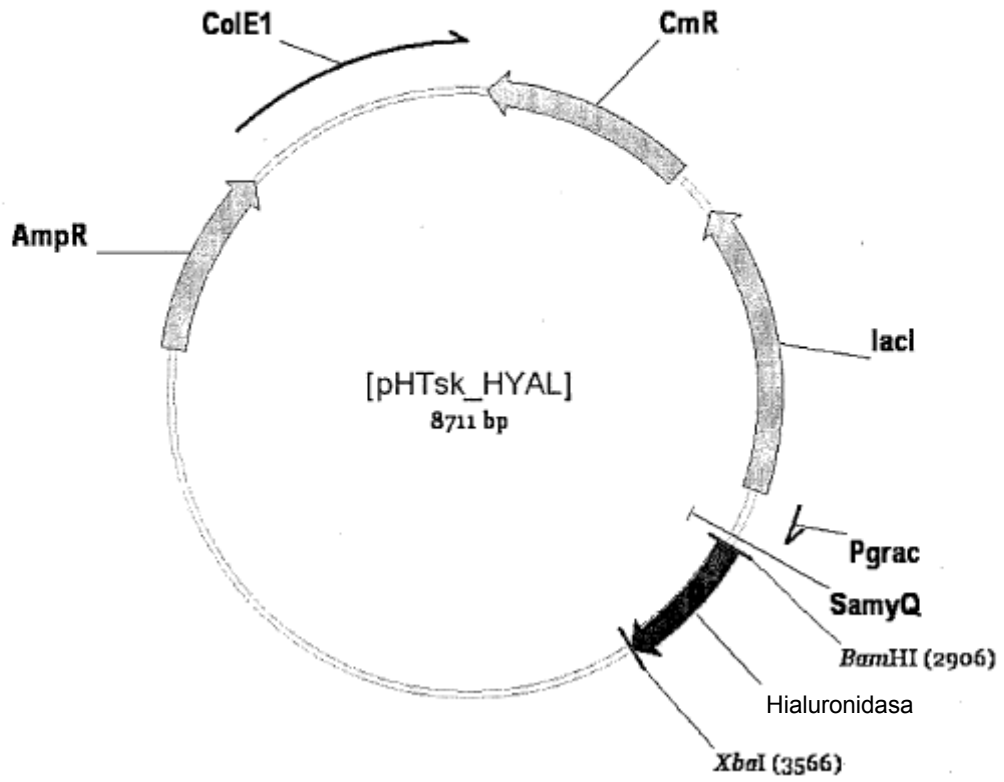


(b)



- 1- pHTsk\_HYAL digerido con *BamHI-XbaI*
- 2- pHYAL\_sk\_SL digerido con *NdeI-EcoRI*
- 3- pHYAL\_sk digerido con *NcoI-EcoRI*

**Fig.10**



**Fig.11**

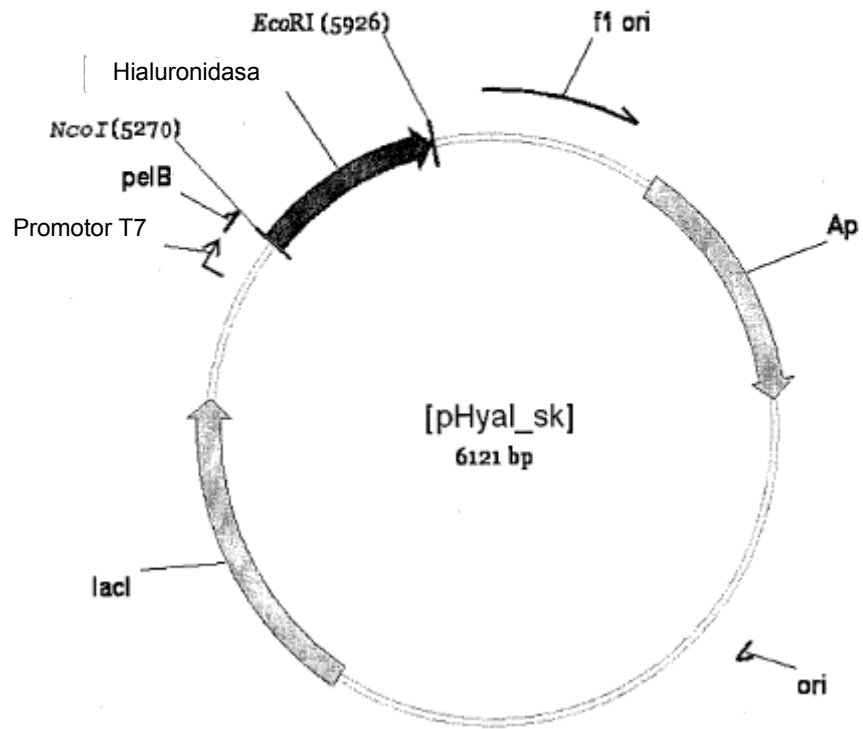
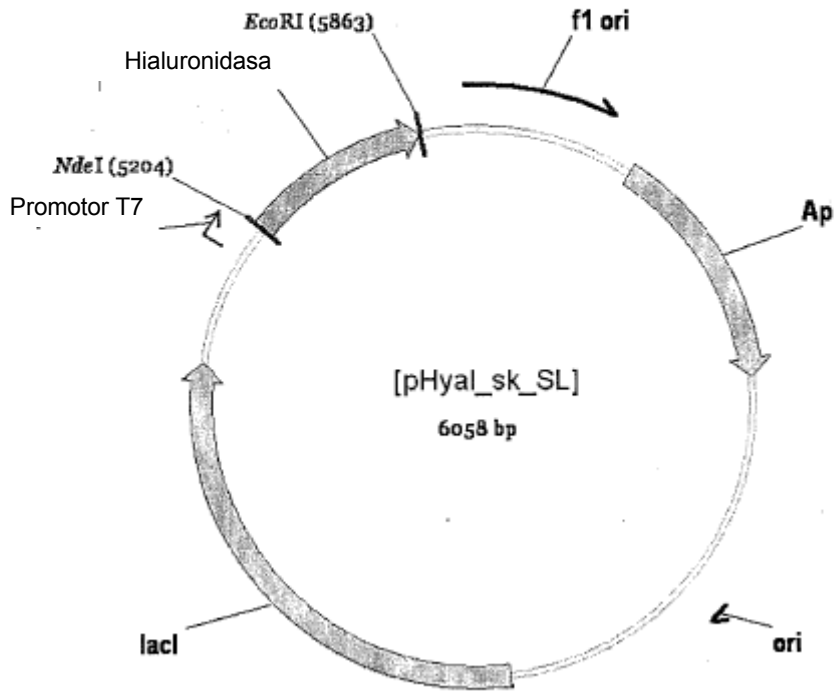
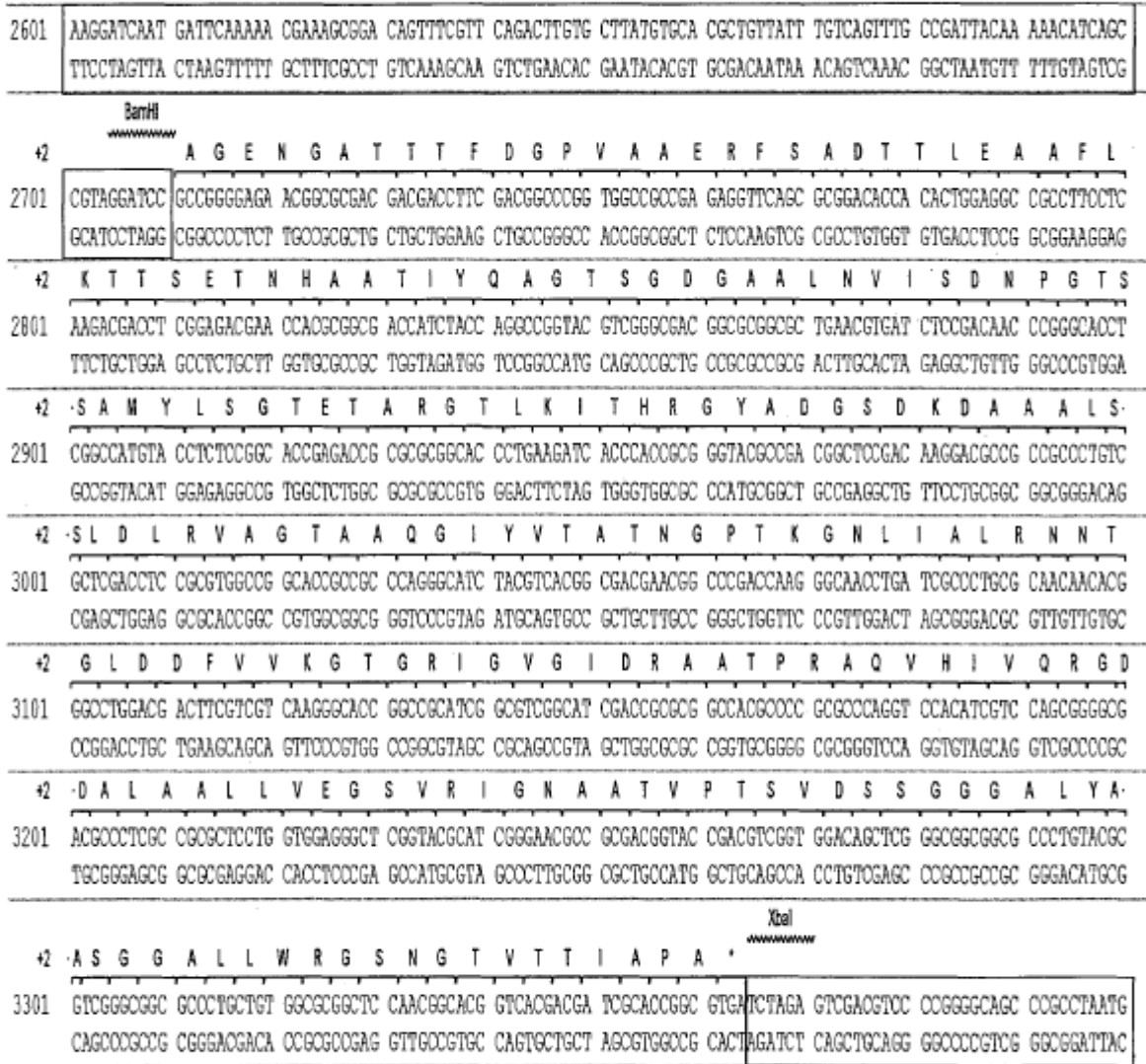




Fig.12



**Fig.13 (a)** [pHTsk\_HYAL]



Secuencia que pertenece al vector pHT43

**Fig.13 (b)**

**[pHyal\_sk]**

5101	CTCGATCCCG CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTC CCTCTAGAAA TAATTTTGTT TAACITTAAG AAGGAGATAT GAGCTAGGGC GCTTTAATTA TGCTGAGTGA TAFOCCCTTA ACACTCGCCT ATTGTTAAGG GGAGATCTTT APTAAAACAA ATPGAAATTC TTCCTCTATA
	NcoI .....
+3	A G E N G A T T T
5201	ACATATGAAA TACCTGCTGC CGACCGCTGC TGCTGGTCTG CTGCTCCTCG CTGCCACGOC GGCGATGGCC ATGGOOGGGG AGAACGGGCG GACGACGACC TGTATACTTT ATGACGACG GCTGGCGAGC ACGAOCAGAC GACGAGGAGC GACGGGTCCG CCGCTACCAG TACCGGCCCC TCTTGCOCGC CTGCTGCTGG
+3	F D G P V A A E R F S A D T T L E A A F L K T T S E T N H A A T I Y
5301	TTCGACGGCC CGGTGGCGGC CGAGAGGTTG AGCGCGGACA CCACACTGGA GGCOCCTTC CTCAGACGA CCTCGGAGAC GAACACGCG GCGACCATCT AAGTGCOCGG GCCACCGGCG GCTCTCCAAG TCGCGCTGT GGTGTGACCT CCGCGGGAAG GAGTTCGTCT GGAGCCTCTG CTTGTGCGC CGCTGTGAGA
+3	Y Q A G T S G D G A A L N V I S D N P G T S A M Y L S G T E T A R G
5401	ACCAGGOCGG TACGTGCGGC GACGGCGCGG CGCTGAACGT GATCTCCGAC AACOCGGGCA CCTCGGCCAT GTACCTCTOC GGCACCGAGA CCGCGCGCGG TGGTCCGGCC ATGCAGOCOG CTGOCGCGCC GCGACTTGA CTAGAGGCTG TTGGGOCCTG GGAGCCGGTA CATGGAGAGG CCGTGGCTCT GCGCGCGCC
+3	G T L K I T H R G Y A D G S D K D A A A L S L D L R V A G T A A Q G
5501	CACCTGAAG ATCACOCACC GCGGTACGC CGACGGCTCC GACAAGGAGC CCGCCGCCCT GTCGCTCGAC CTCGCGCTGG CCGCACCCGC CGCCACGGG GTGGACTTTC TAGTGGGTGG CGCCATGCG GCTGOCGAGG CTGTCTCTGC GCGGGGGA CAGCGAGCTG GAGGCGCACC GCGCTGGCG GCGGTCCCG
+3	I Y V T A T N G P T K G N L I A L R N N T G L D D F V V K G T G R I
5601	ATCTACGTCA CGGCGACGAA CGGOCOGACC AAGGCAACC TGMTGCCCTT GCGCAACAAC ACGGGCTGG ACGACTTCGT CTCAAGGGC ACCGGOCGA TAGATGCAGT GCGCTGCTT GCGGGCTGG TTCCGTTGG ACTAGCGGGA CCGCTTGTG TGCOCGGACC TGCTGAAGCA GCAGTTCOCG TGGOCGGCT
+3	I G V G I D R A A T P R A Q V H I V Q R G D A L A A L L V E G S V R
5701	TGGGCTCGG CATCGACCG GCGGCCAGC CCGCGCOCA GGTCCACATC GTCCAGOGGG GGACGOCCT CCGCGCGCTC CTGGTGGAGG GCTCGGTACG AGCCGACGOC GTAGCTGGCG CCGCGGTGCG GGGCGCGGT CCAGTGTAG CAGGTGOCOC CCGTGGGGGA GCGGCGGAG GACCACTOC CGAGCCATGC
+3	R I G N A A T V P T S V D S S G G G A L Y A S G G A L L W R G S N G
5801	CATCGGAAC GCGCGACGG TACCGACSTC GGTGGACAGC TCGGGCGGCG GCGCCCTGTA CCGTGGGGC GCGOCCTGC TGTGGCGCG CTCCAAGGC GTAGOCCTG CCGCGCTGCC ATGGCTGACG CCACTGTGCG AGOCOCOCOC CCGGGACAT GCGCAGOCOG CCGCGGAGC ACACCGGCGC GAGGTTGCGG
	EcoRI .....
+3	T V T T I A P A *
5901	ACGGTACGA CGATCGCAC GGCCTGAAA TTGAGCTOC GTCGACAAGC TTGCGGOCGC ACTCGAGCAC CACCACCAOC ACCACTGAGA TCCGGCTGCT TCCAGTGTCT GCTAGCGTGG CCGCACTTT AAGCTGAGG CAGCTGTTCG AACCCGCGCG TGAGCTCGTG GTGGTGGTGG TGGTACTCT AGGCCGACGA
6001	AACAAGGCC GAAGGAAGC TGAGTTGGCT GCTGCCAOCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA CCGCTGGGG CCTCTAAAGC GGTCTGAGG GGTTTTTTGC TTGTTTCGGG CTTCCTTCG ACTCAACCGA CGACGGTGGC GACTCGTTAT TGAICGTATT GGGGAACCC GGAGATTTGC CCAGAATCC CCAAAAAACG
6101	TGAAAGGAGG AACTATATCC GGAT ACTTTCCTCC TTGATATAG CCTA



Secuencia que pertenece al vector pET22b(+)

**Fig.13 (c)**

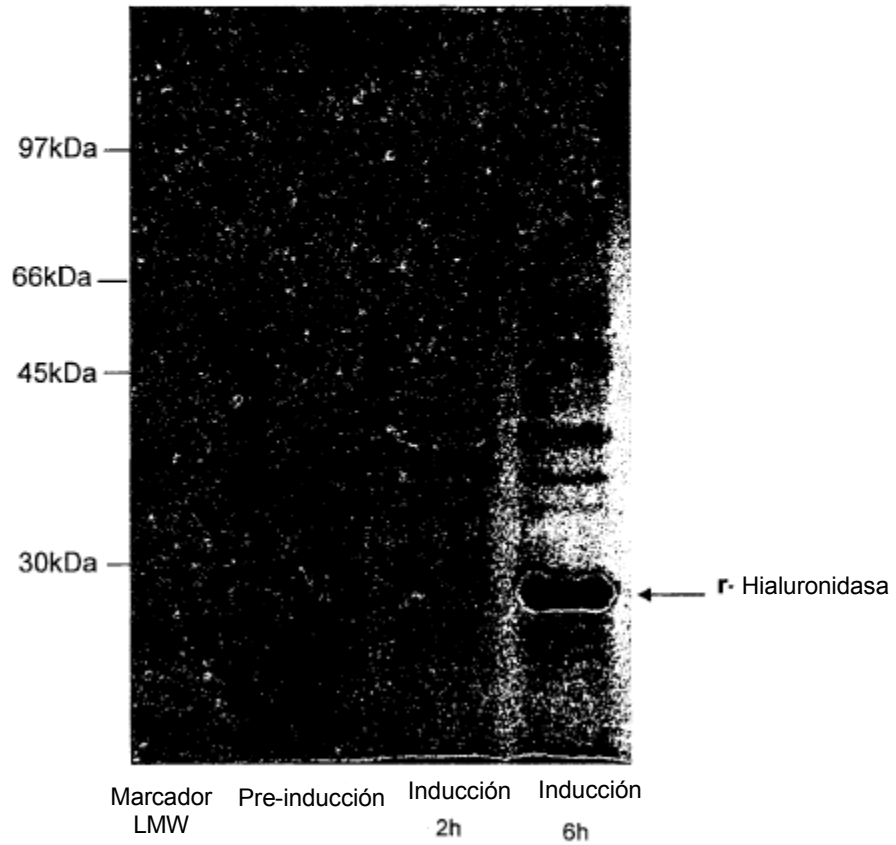
**[pHyal\_sk\_SL]**

5101	CTCGATCCCG CGAAAPTAAY AGACTCACT ATAGGGGAAT TGTGACGGGA TAACAAITCC CCTCTAGAAA TAATTTGTTT TAACCTTAAG AAGGAGATAF GAGCTAGGGC GC'TTAAATTA TGTGAGTGA TATCCDCTTA ACACTOGCC TATTGTAAGG GGAGATCITT ATTAAMACAA ATTGMAATTC TTCTCTATA
	NdeI *****
+3	A G E N G A T T T F D G P V A A E R F S A D T T L E A A F L K
5201	ACATATGGCC GGGGAGAACG GCGGAGAC GACCTTCGAC GGGCCGTTGG CCGCCGAGAG GTTCAGCGCG GACACCACAC TGGAGGCCCG CTTCTCAAG TGTATACGG CCCCTCTTGC CCGCTGCTG DTGGAAGCTG CCGGGCCACD GCGGCTCTC CAAGTCGCGC CTGTGGTGTG ACCTCGCGCG GAAGGAGTTC
+3	T T S E T N H A A T I Y Q A G T S G D G A A L N V I S D N P G T S A
5301	AGACTTCGG AGACGAACCA CCGGCGACC ATCTACCAGG CCGGTACGTC GGGCCAGCGC GCGGCGCTGA ACCTGATCTC CGACAACCGG GGCACCTGG TGTGAGACC TCTGCTGGT GCGCGCTGG TAGATGGTCC GGCATGCAAG CCGCTGCGC CCGCGGACT TGCATAGAG GCTGTTGGG CCGTGGAGCC
+3	A M Y L S G T E T A R G T L K I T H R G Y A D G S D K D A A A L S L
5401	CCATGTACCT CTCGCGACC GAGACCGCG GGGCACCOCT GAAGATCAOC CACCGGGGT ACGCCGAGG CTCCGACAAG GACGCCGCG CCTGTCTGCT GGTACATGGA GAGGCCGTGG CTCTGCGCG CCGCTGTTGA CTCTAGTGG GTGCGGCCA TCGGCTGCC GAGGCTGTT CTGCGCGCG GGCACGCA
+3	L D L R V A G T A A Q G I Y V T A T N G P T K G N L I A L R M N T G
5501	CGACCTCCG GTGGCCGCA CCGCCGCCA GGCATCTAC GTCAAGCGA CCAAGCGCC GACCAAGGC AACCTGATCG CCTGCGCAA CAACCGGGC GCTGGAGCG CACCGGCGT GCGCGGGGT CCGTAGATG CAGTGCCTCT GCTTCCCGG CTGCTTCCG TTGACTAGC GGGACGCGT GTGTGCGCG
+3	L D D F V V K G T G R I G V G I D R A A T P R A Q V H I V Q R G D A
5601	CTGACGACT TGTGTCAA GGGCACCGC CGCATCGCG TCGCATCGA CCGCGCGCC ACGCCCGCG CCGAGTCCA CATGTCCAG CCGGCGGACG GAOCTGCTGA AGCAGCAGT CCGGTGCGG GGTAGCGCG AGCGTAGCT GCGCGCGCG TCGGGGCGG GGGTCCAGGT GTAGCAGGTC GCGCCCTGC
+3	A L A A L L V E G S V R I G N A A T V P T S V D S S G G G A L Y A S
5701	CCCTCGCCBC GCTCTGTTG GAGGGCTCG TACGCATCGG GAACGCCCG ACGGTACCBA CGTGCTGGA CAGCTCGGC GCGCGCGCC TGTACGCTC GGGAGCGCG CGAGGACAC CTCOCGAGC ATGCGTAGCC CTTCGCGCG TGCATGGCT GCAGCCACCT GTGAGCCCG CCGCGCGGG ACATGCGCAG
	EcoRI *****
+3	S G G A L L W R G S N G T V T T I A P A
5801	GGCGGGCGC CTGCTGTGG GGGCTCCAA CCGCACGGTC ACGACGATCG CAOCGGCGTG ABAATTCGAG CTCCGTCGAC AMGCTTCCGG CCGCACTCGA CCCGCCGCG GACGACACCG CCGCGAGTT GCGGTGCCAG TGCTGCTAGC GTGGCCGAC TCTTAAGCTC GAGGCGCTG TTCGAACGCG GCGCTGAGCT
5901	GCACCAACC CAOCACACT GAGATCGGC TGCTAACAA GCCCGAAGG AAGCTGAGTT GGCTGCTGCC ACCGCTGAGC AATAACTAGC ATAACCCCTT CGTGTGTTG GTGGTGTGA CTCTAGGCC ACGATTGTT CCGGCTTCC TTCGACTCAA CCGAGACGG TGGCGACTCG TTATTGATCG TATTGGGAA

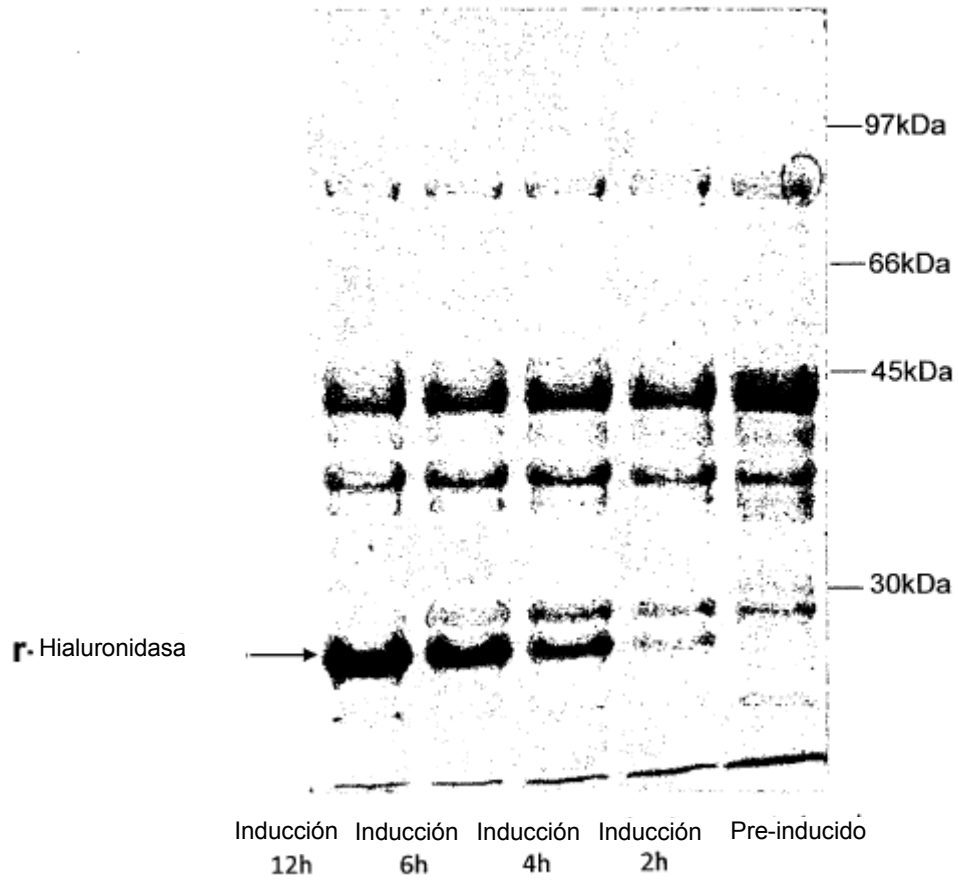


Secuencia que pertenece al vector pET21b(+)

**Fig.14**



**Fig.15**



**Fig.16**

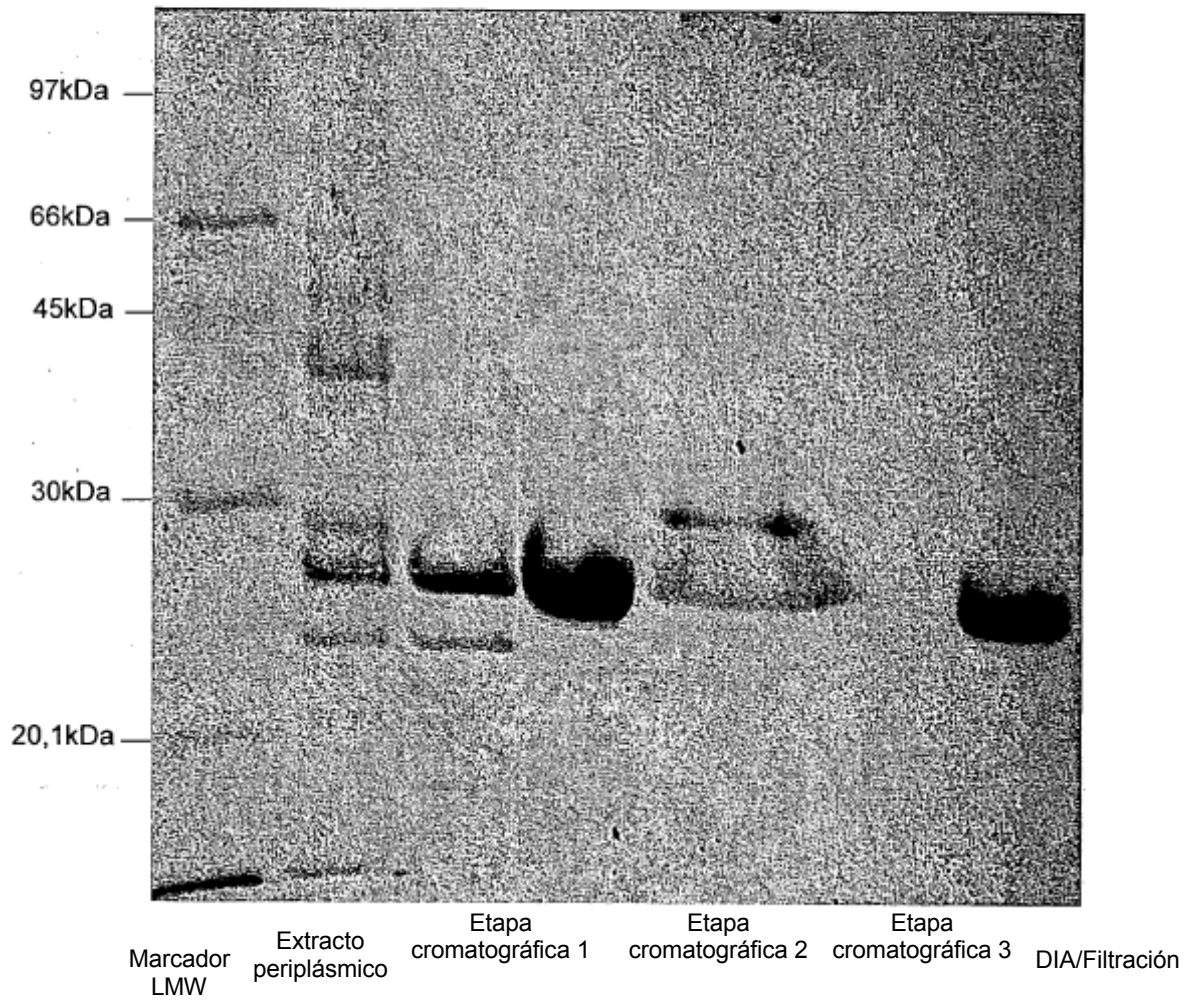
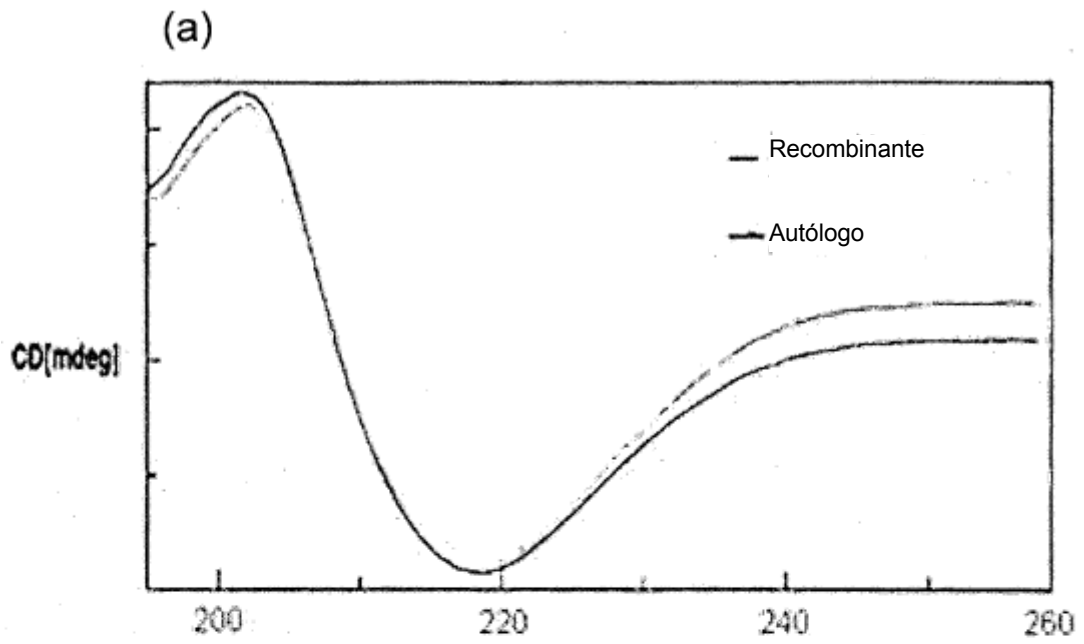
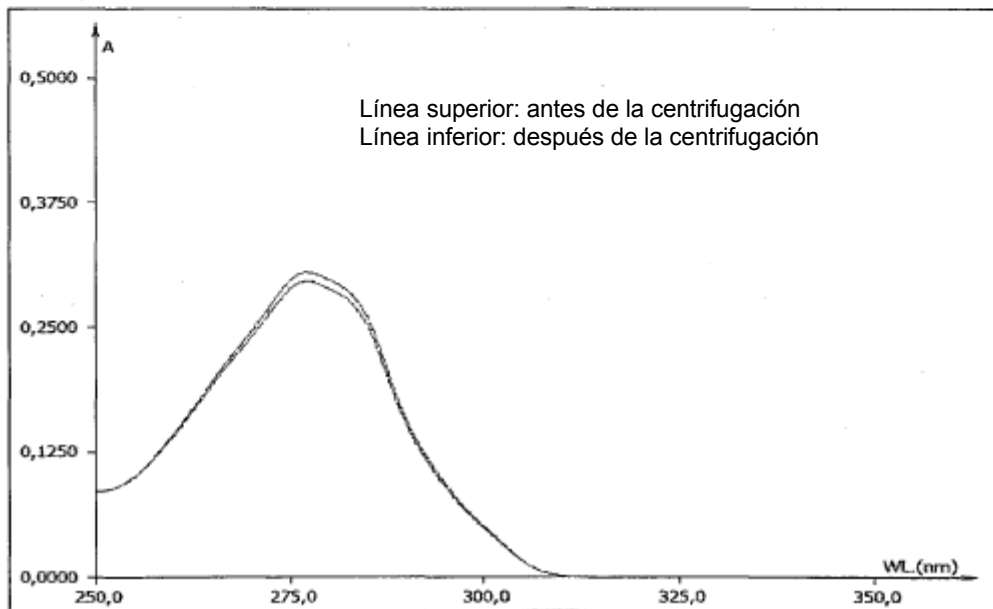


Fig.17



(b)





**Fig.18**

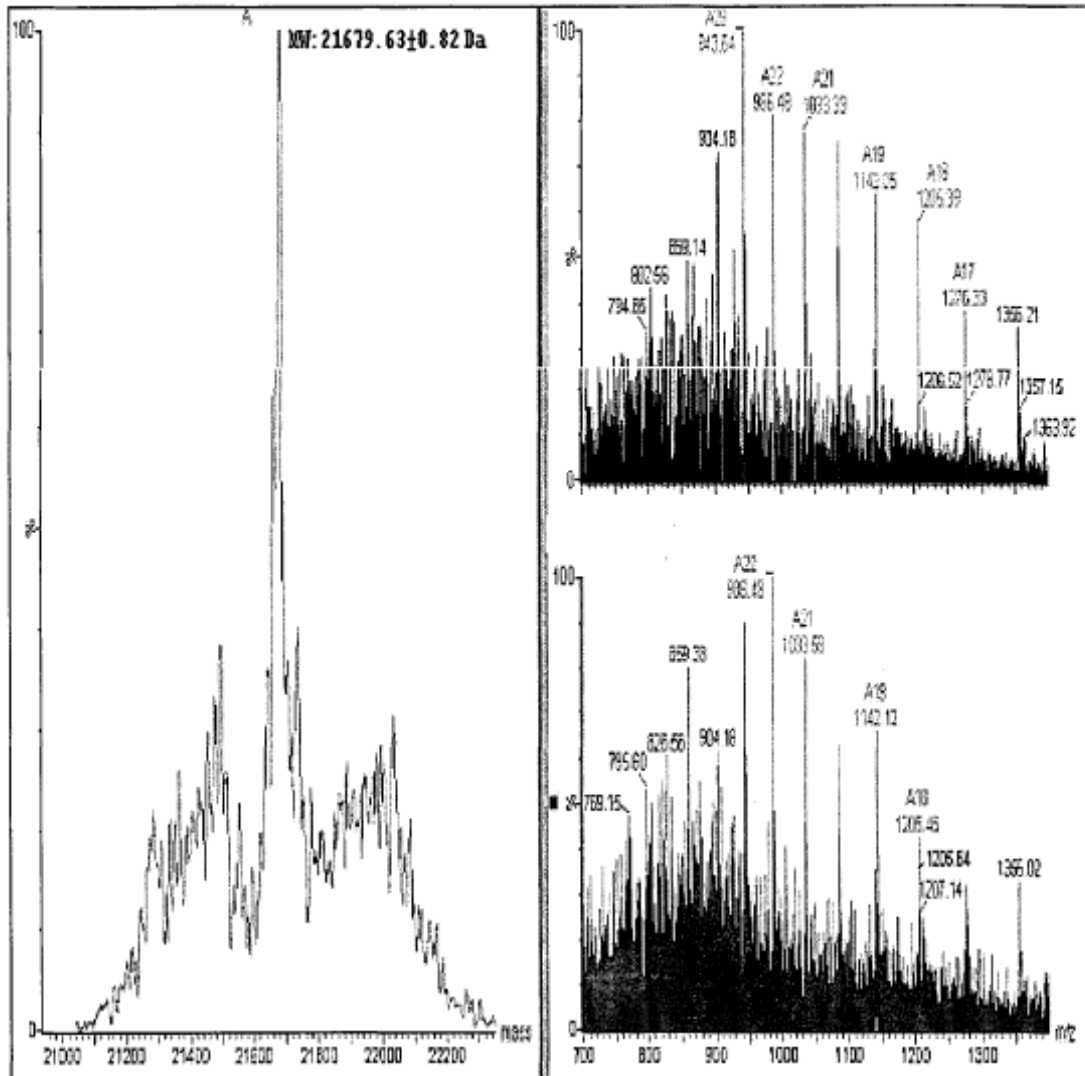


Fig.19

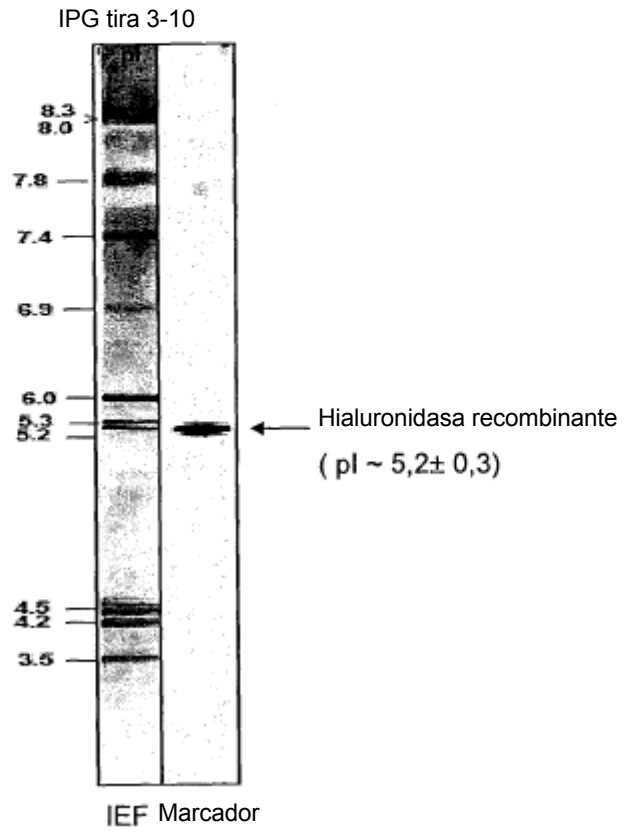
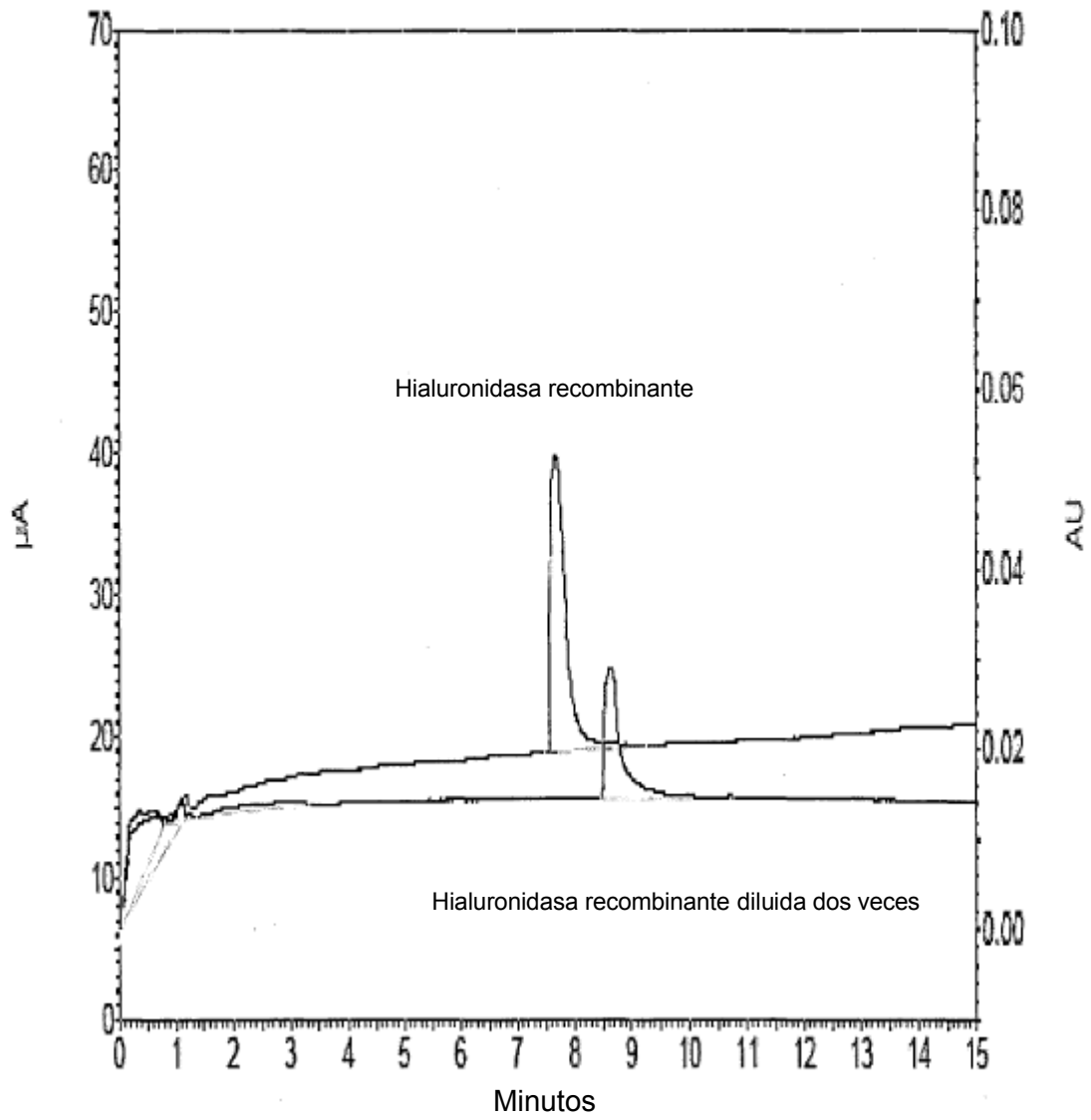
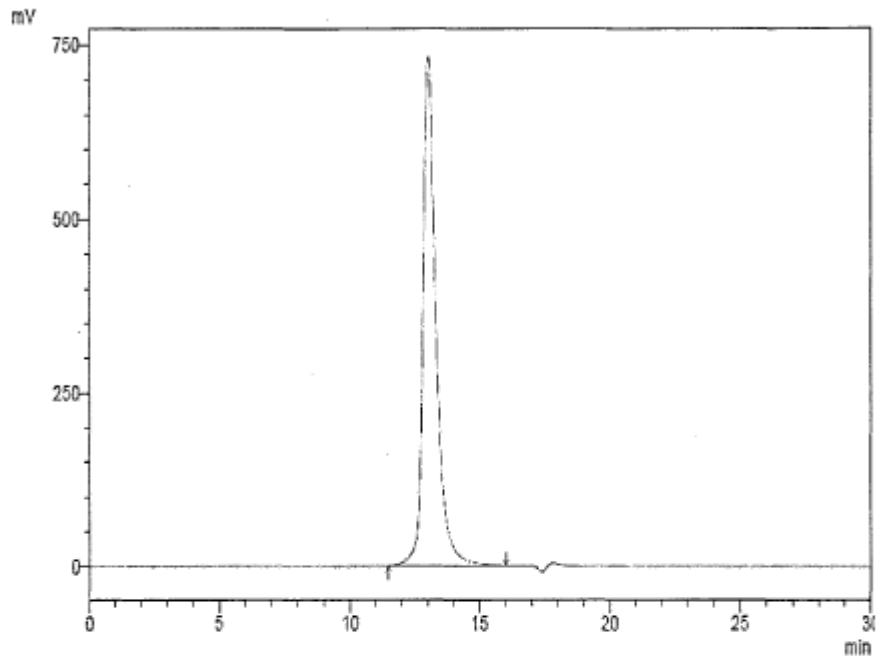


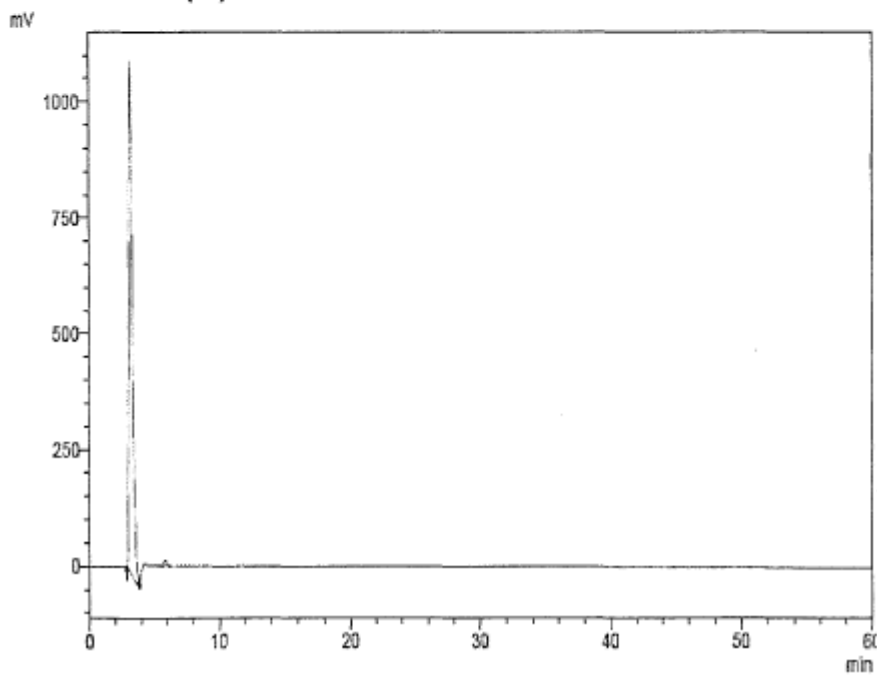
Fig.20



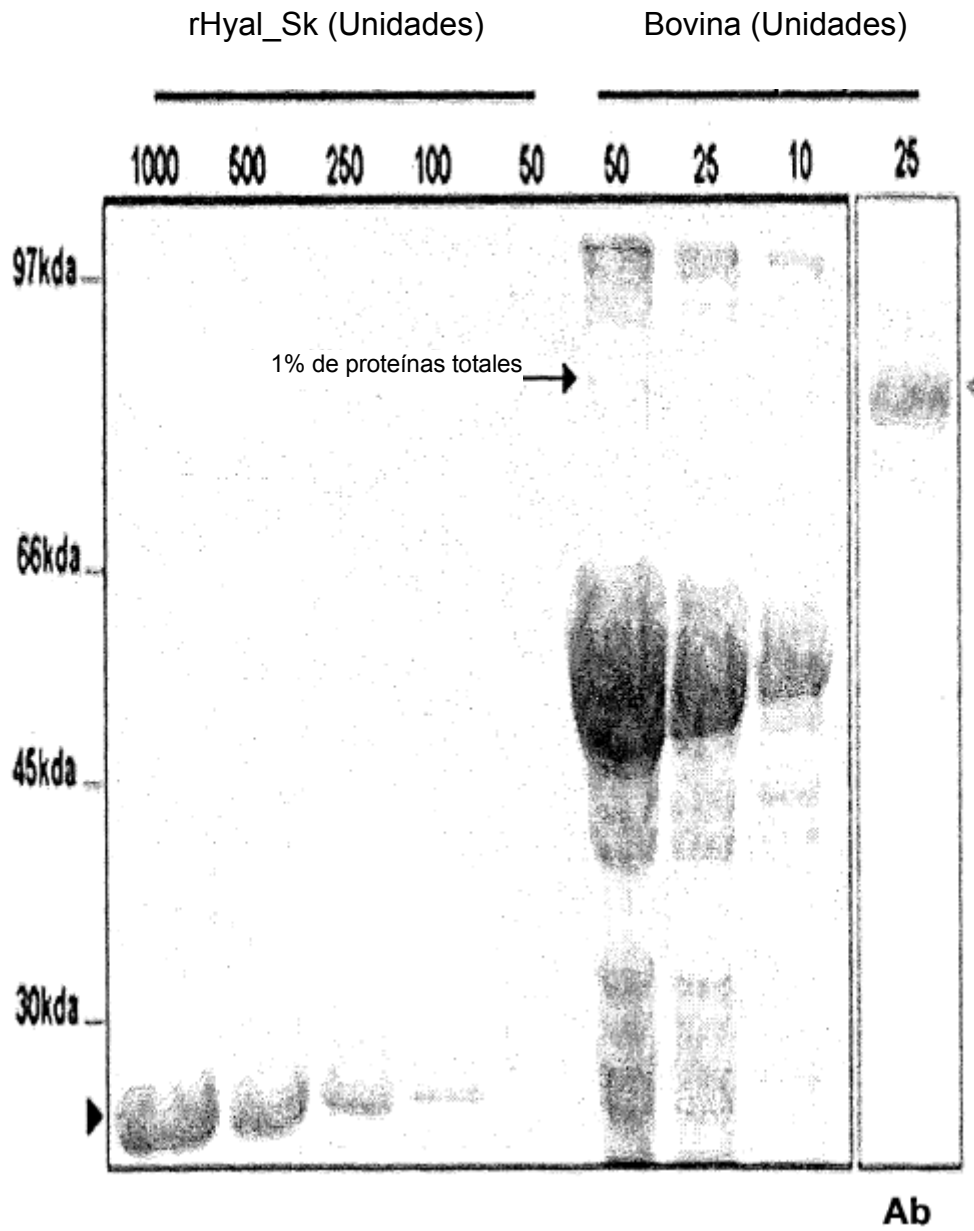
**Fig.21** (a) 25/29



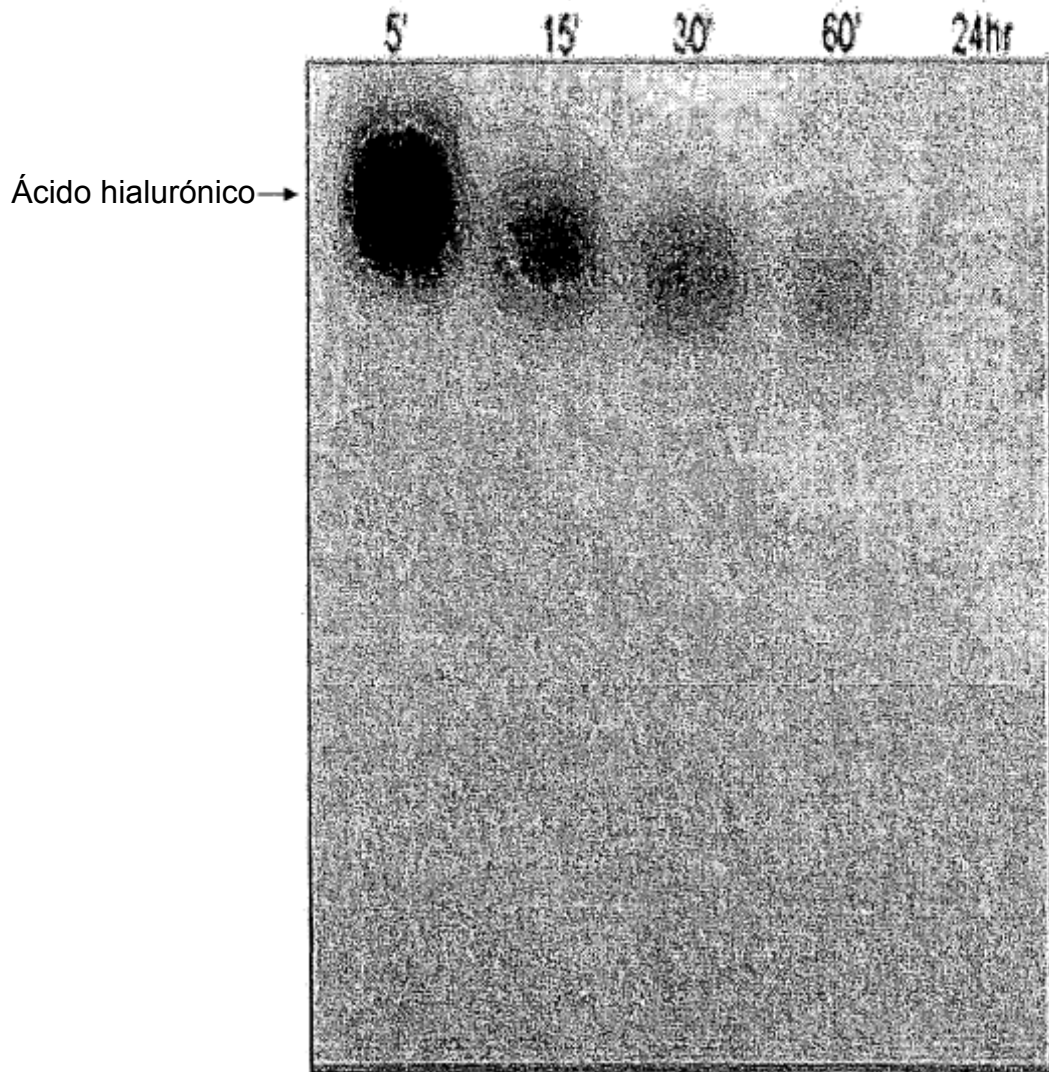
(b)



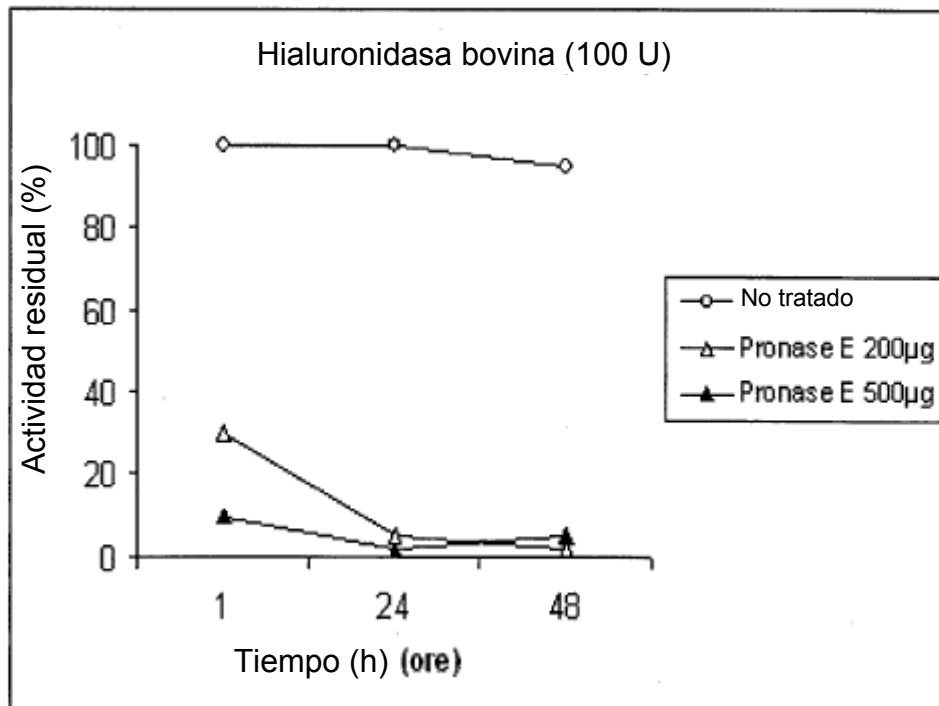
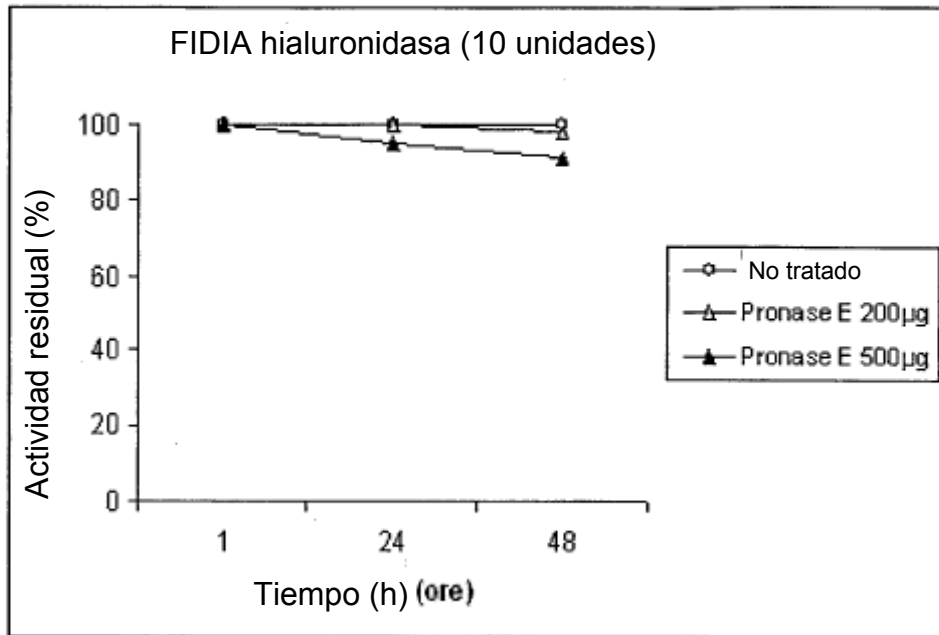
**Fig.22**



**Fig.23**

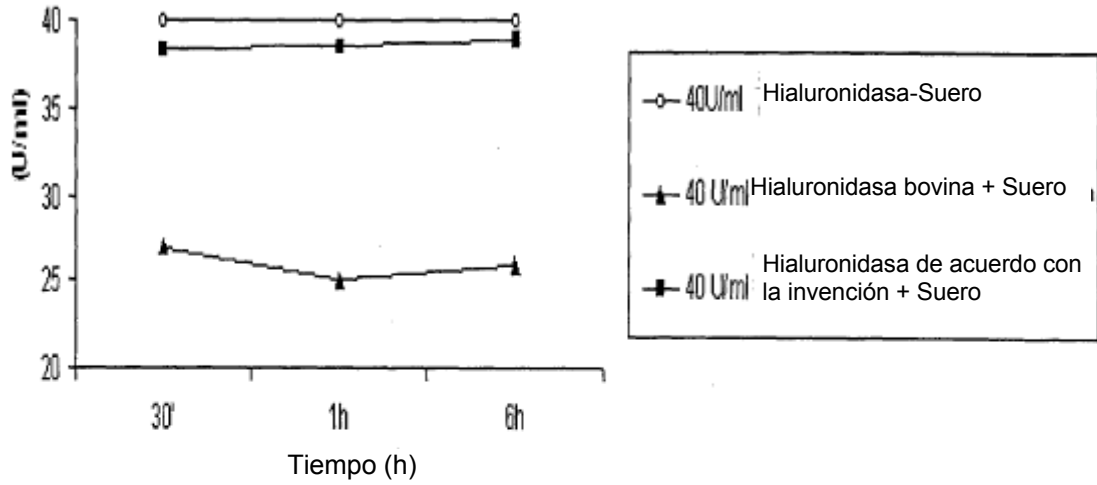


**Fig.24**



**Fig.25**

Inhibición de la actividad de hialuronidasa de sangre animal



Inhibición de la actividad de hialuronidasa de sangre humana

