(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 661 575**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/63	(2006.01)	***C12N 9/10***	(2006.01)
C12N 15/52	(2006.01)	***C08B 37/00***	(2006.01)
C12N 15/70	(2006.01)		
C12P 19/04	(2006.01)		
A61K 31/715	(2006.01)		
A61L 27/20	(2006.01)		
A61K 31/726	(2006.01)		
C12P 19/26	(2006.01)		
A61K 8/73	(2006.01)		
C12P 19/18	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2013** **PCT/US2013/034631**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013** **WO13149161**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2013** **E 13767739 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017** **EP 2831237**

(54) Título: **Producción de polímeros de heparosano de peso molecular alto y métodos de producción y uso de los mismos**

(30) Prioridad:

30.03.2012 US 201261617952 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2018

(73) Titular/es:

THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA (100.0%)
660 Parrington Oval, Room 119
Norman, OK 73019, US

(72) Inventor/es:

DEANGELIS, PAUL, L.;
PUMMILL, PHILIP y
VISSIER, REGINA, C.

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 661 575 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).

Producción de polímeros de heparosano de peso molecular alto y métodos de producción y uso de los mismos

Descripción

FONDO

1. Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a la producción de polímeros de heparosano de peso molecular alto.

2. Descripción de la técnica relacionada

[0002] Los biomateriales (definidos vagamente como compuestos o conjuntos que se utilizan para aumentar o sustituir componentes de tejidos naturales o partes del cuerpo) son y seguirán siendo componentes integrales de la ingeniería de tejidos y enfoques de medicina regenerativa. Los procedimientos complejos que incluyen trasplantes y terapias con células madre prometen mejorar la salud humana, pero el suministro limitado de órganos/tejidos de donantes y las curvas de aprendizaje abruptas (así como los debates éticos) para los enfoques pioneros son obstáculos. Existe una demanda creciente de aplicaciones más rutinarias de biomateriales, como cirugía reconstructiva, cosméticos y dispositivos médicos. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de biomateriales nuevos y mejorados que puedan usarse, por ejemplo, pero no a modo de limitación, para aplicaciones de relleno dérmico y para revestimientos superficiales para dispositivos implantados.

[0003] Los productos a base de hialuronano (HA), ácido poli-L-láctico (poli[láctido]), hidroxiapatito de calcio y colágeno dominan el mercado actual de biomateriales utilizados en cirugía reconstructiva y procedimientos cosméticos. Sin embargo, estos productos tienen una serie de propiedades indeseables para las cuales los fabricantes y los profesionales de la salud buscan mejoras. Estas desventajas incluyen, pero no se limitan a, tiempo de vida limitado, potencial de inmunogenicidad y/o alergenicidad, y apariencia no natural en procedimientos estéticos. Para mejorar la biocompatibilidad y la durabilidad de un dispositivo implantado, se emplean HA, heparina, albúmina sérica bovina, carbono pirolítico o recubrimientos lipídicos para mejorar la biocompatibilidad de stents, catéteres y otros dispositivos de material implantado. Sin embargo, estos productos a menudo causan incrustaciones, obstrucción o formación de trombos debido a la reactividad con el cuerpo humano. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de composiciones de biomateriales nuevas y mejoradas que superen los inconvenientes y defectos de la técnica anterior.

[0004] Existen numerosas aplicaciones médicas de HA. Por ejemplo, HA se ha utilizado ampliamente como un reemplazo viscoelástico para el humor vítreo del ojo en cirugía oftálmica durante la implantación de lentes intraoculares en pacientes con cataratas. La inyección de HA directamente en las articulaciones también se usa para aliviar el dolor asociado con la artritis. Los geles y películas químicamente entrecruzadas también se utilizan para prevenir adherencias nocivas después de la cirugía abdominal. Otros investigadores que utilizan otros métodos han demostrado que los recubrimientos de HA adsorbidos también mejoran la biocompatibilidad de los dispositivos médicos, como los catéteres y los sensores, al reducir las incrustaciones y la abrasión del tejido.

[0005] La presente descripción supera las desventajas y defectos de la técnica anterior. Se refiere a un biomaterial que comprende heparosano, el precursor biosintético natural de heparina y sulfato de heparano. Esta composición tiene numerosas características que proporcionan mejoras y ventajas sobre los productos existentes. Mientras que el heparosano es muy similar a HA y heparina, la molécula tiene mayor estabilidad dentro del cuerpo ya que no es la forma final natural de este azúcar y por lo tanto el cuerpo no tiene enzimas de degradación o proteínas de unión que conducen a la pérdida de funcionalidad. Esta propiedad también reduce la bioincrustación, la infiltración, la cicatrización y/o la coagulación. El heparosano también es más hidrófilo que los recubrimientos sintéticos, como los plásticos o el carbono. Finalmente, además del HA bacteriano, la mayoría de los otros biomateriales de carga actuales son típicamente de origen animal, lo que causa preocupación por los efectos secundarios tales como reacciones alérgicas o granulación estimulante, y tales efectos secundarios no serán una preocupación con el heparosán. Además, se sabe que la mayoría de los polímeros heparosánicos que se producen de manera natural tienen ciertos intervalos de tamaño de peso molecular, dependiendo del origen del biopolímero de heparosano tal como las rutas de biosíntesis utilizadas, que incluyen tipos de catalizadores, huéspedes y aplicaciones de soporte. Como es sabido en la técnica, la distribución del tamaño del biopolímero de heparosano afecta sus propiedades físicas, tales como la viscosidad, el enmarañamiento de la cadena y la solubilidad. Hemos desarrollado un medio para producir polímeros de heparosanos de peso molecular extremadamente alto (PM) que tienen mayor viscosidad y se pueden usar en concentraciones más bajas (con o sin reticulación química) que las preparaciones heparosianas naturales.

[0006] La estructura y función de sintasas de heparosano de *Pastruella multocida* se demostró por Otto et al (2012, J. Biol. Chem. 287 (10) 7203-7212). Sismey-Ragatz *et al.* describen que la síntesis quimioenzimática de dos sintasas de heparosano de *pastruella* distintas implica potenciales sitios activos diferentes. La producción de heparosanos N,O-sulfatados de alto peso molecular se describió por el documento EP544592 y la producción y uso de

biomateriales y revestimientos basados en heparosanos se discute en el documento US2008226690-A1.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0007] La invención se refiere a un método para producir recombinantemente el polímero de heparosano de peso molecular alto, comprendiendo el método las etapas de cultivar una célula huésped recombinante que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una actividad de sintasa de heparosano en condiciones apropiadas para la expresión de la sintasa de heparosano, en la que al menos uno de; (a) el polipéptido que tiene actividad de sintasa de heparosano es al menos 90% idéntico a al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8, y la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido se ha optimizado genéticamente para la expresión en la célula huésped recombinante; (b) el polipéptido que tiene actividad de sintasa de heparosano tiene adiciones de 1-20 aminoácidos, deleciones y/o sustituciones cuando se compara con al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8, y la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido ha sido genéticamente optimizado para la expresión en la célula huésped recombinante; (c) el polipéptido está codificado por la secuencia de nucleótidos de al menos una de las SEQ ID NOS: 9-11; (d) el polipéptido está codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos 90% idéntica a al menos una de las SEQ ID NOS: 9-11; y (e) la secuencia de nucleótidos codifica una sintasa de heparosano de Pasteurella; y aislando el polímero de heparosano producido por la sintasa de heparosano, donde el polímero de heparosano aislado es biocompatible con un paciente mamífero y biológicamente inerte dentro de los compartimentos extracelulares de un paciente mamífero, y en el que el polímero de heparosano aislado está representado por la estructura (-GlcUA-beta1,4- GlcNAc-alfa-1,4-)n, en donde n es un número entero positivo mayor que o igual a 2.000.

[0008] La invención también se refiere a una composición de biomaterial, comprendiendo la composición un polímero de heparosano aislado, en donde el polímero de heparosano aislado es biocompatible con un paciente mamífero e inerte biológicamente en compartimentos extracelulares de un paciente mamífero, el polímero de heparosano aislado representado por la estructura (-GlcUA-betal, 4-GlcNAc-alfa-1,4-)n, en donde n es un número entero positivo mayor que o igual a 2.000.

[0009] Otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que tiene actividad de sintasa de heparosano, en el que al menos uno de; (a) el polipéptido que tiene actividad de sintasa de heparosano es al menos 90% idéntica a al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8, y la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido se ha optimizado genéticamente para la expresión en la célula huésped recombinante; y (b) el polipéptido que tiene actividad de sintasa de heparosano tiene adiciones de 1-20 aminoácidos, deleciones y/o sustituciones cuando se compara con al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8, y la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido se ha optimizado genéticamente para la expresión en la célula huésped recombinante; (c) el polipéptido está codificado por la secuencia de nucleótidos de al menos una de las SEQ ID NOS: 9-11; y (d) el polipéptido está codificado por una secuencia de nucleótidos que es idéntica al menos en un 90% a al menos una de las SEQ ID NOS: 9-11.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0010]

La Figura 1A contiene un alineamiento de dos secuencias optimizadas para el gen de *E. coli* (SEQ ID NOS: 9 y 10) con un gen de la sintasa de heparosano de *Pasteurella multocida* nativa (SEQ ID NOS: 1).
La Figura 1B contiene un alineamiento de las dos secuencias optimizadas genéticamente de *E. coli* (SEQ ID NOS: 9 y 10).
La Figura 1C contiene una alineación de una secuencia optimizada para el gen de Bacillus (SEQ ID NOS: 11) con un gen de sintasa de heparosano de *Pasteurella multocida* nativa (SEQ ID NOS: 12).
La Figura 2 representa un análisis en gel que demuestra la producción de polímero de heparosano de peso molecular ultra alto en *E. coli* K5 con el gen *PmHS1* recombinante transportado por plásmido de *P. multocida* tipo D.
La Figura 3 representa un análisis en gel que demuestra la producción de polímero de heparosano de peso molecular ultra alto en *E. coli* BL21 (DE3) con el gen *PmHS1* recombinante transportado por plásmido o un plásmido de expresión que produce una proteína de fusión PmHS1 de proteína de unión a maltosa (MBP).
Figura 4 representa un análisis en gel que demuestra la producción de polímero de heparosano de peso molecular ultra alto en *E. coli* BL21Express I^q transformada con el plásmido de expresión que produce la proteína de unión a maltosa (MBP) proteína de fusión PmHS1.
La Figura 5 representa un análisis en gel que demuestra la producción de polímero de heparosano de peso molecular ultra alto en *E. coli* $K5^-$ (en el que se han eliminado los genes *kfiA, kfiB* y *kfiC*) con el gen *PmHS1* recombinante transportado por plásmido o el plásmido de expresión que produce la proteína de unión a maltosa (MBP) proteína de fusión PmHS1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0011] Antes de explicar la invención en detalle por medio de dibujos de ejemplo, la experimentación, los resultados

y los procedimientos de laboratorio, es de entenderse que la descripción no se limita en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes ilustrados en los dibujos, la experimentación y/o los resultados. La invención es capaz de otras realizaciones o de practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras. Como tal, el lenguaje utilizado en este documento debe tener el significado más amplio posible; y las realizaciones pretenden ser ejemplares, no exhaustivas.

[0012] A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tendrán los significados que se entienden comúnmente por los expertos normales en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán las pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. En general, nomenclaturas utilizadas en relación con, y técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular y química de proteínas y oligo o polinucleótidos y hibridación descrita en la presente memoria es los bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Se usan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en este documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) y Coligan et al. Current Protocols in Immunology (Current Protocols, Wiley Interscience (1994)). Las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética, y química médica y farmacéutica descrita aquí son los bien conocidos y usados comúnmente en la técnica. Las técnicas estándar se usan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y administración, y el tratamiento de los pacientes.

[0013] Todas las patentes, solicitudes de patente publicadas y publicaciones no de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la técnica.

[0014] Todas las composiciones y/o métodos descritos en este documento pueden realizarse y ejecutarse sin la experimentación indebida a la luz de la presente descripción. Aunque las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y/o métodos y en los pasos o en la secuencia de pasos del método descrito en este documento. Según se utiliza de acuerdo con la presente descripción, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

[0015] El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa en conjunción con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más," "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para indicar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiera solo a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas y "y/o." A lo largo de esta aplicación, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio. Se entenderá que el uso del término "al menos uno" incluye tanto uno como más cantidad que uno, incluidos, entre otros, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, etc. El término "al menos uno" puede extenderse hasta 100 o 1000 o más, dependiendo del término al cual está adjunto; además, las cantidades de 100/1000 no deben considerarse limitantes, ya que los límites más altos también pueden producir resultados satisfactorios. Además, se entenderá que el uso del término "al menos uno de X, Y y Z" para incluir solo X, Y solo, y Z solo, así como cualquier combinación de X, Y y Z.

[0016] A lo largo de la especificación y las reivindicaciones, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos "sustancialmente" y "aproximadamente" se entenderán que no están limitados a los términos específicos calificados por estos adjetivos/adverbios, pero se entenderá que indican que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, utilizándose el método para determinar el valor y/o la variación que existe entre los sujetos de estudio. Por lo tanto, dichos términos permiten variaciones menores y/o desviaciones que no resultan en un impacto significativo en las mismas. Por ejemplo, en ciertos casos, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación de error inherente para el dispositivo, empleándose el método para determinar el valor y/o la variación que existe entre los sujetos de estudio. De manera similar, el término "sustancialmente" también puede referirse a 80% o más, tal como 85% o más, o 90% o más, o 95% o más, o 99% o más, y similares.

[0017] Tal como se usa en esta especificación y las reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, como "comprende" y "comprenden"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, tal como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de inclusión, como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, como "contiene" y "contienen") son inclusivos o abiertos y no excluyen elementos adicionales no enumerados o pasos de método.

[0018] El término "o combinaciones de los mismos", como se usa aquí se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados precedentes el término. Por ejemplo, "A, B, C, o combinaciones de los mismos" está destinado a incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente las combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, como BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, y así sucesivamente. El experto en la materia entenderá que, por lo general, no existe un límite en el número de artículos o términos en cualquier combinación, a menos que sea evidente de otro modo por el contexto.

[0019] El término "de origen natural" como se usa en el presente documento tal como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluidos virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio o de otro modo es de origen natural. De manera similar, un polímero de azúcar o polisacárido con características estructurales intrínsecas (tales como distribución de peso molecular (MW), etc.) encontrado en organismos nativos (es decir, no modificado por la mano del hombre) se denomina "de origen natural".

[0020] El término "paciente", como se usa en este documento incluye sujetos humanos y veterinarios. "Mamífero" para propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, que incluye animales humanos, domésticos y de granja, primates no humanos y cualquier otro animal que tenga tejido mamario.

[0021] Los términos "administración" y "administrar", como se usa aquí serán entendidos para incluir todas las vías de administración conocidas en la técnica, incluyendo pero no limitado a, transdérmica, parenteral, subcutánea, intranasal oral, tópica, mucosa, intramuscular, intraperitoneal, intravítrea e intravenosa, incluidas aplicaciones locales y sistémicas. Además, las composiciones descritas en este documento (y/o los métodos de administración de las mismas) pueden diseñarse para proporcionar liberación retardada, controlada o sostenida usando técnicas de formulación que son bien conocidas en la técnica.

[0022] El término "aumento dérmico" se refiere a cualquier cambio del estado natural de la piel de un mamífero y áreas relacionadas debido a actos externos. Las áreas que pueden cambiarse por aumento dérmico incluyen, pero no se limitan a, epidermis, dermis, capa subcutánea, grasa, músculo arrector de la píldora, tallo del pelo, poro del sudor y glándula sebácea.

[0023] Tal como se utiliza aquí, el término "heparosano" se entenderá para referirse al precursor biosintético natural de la heparina y sulfato de heparina. El heparosano de polímero de azúcar es una molécula de heparina no sulfatada, no optimizada, y también puede denominarse "heparosano de N-acetilo".

[0024] Se entiende que el término "tejido" como se usa en el presente documento se refiere a una agrupación de células dentro de un organismo que se caracterizan de manera similar por su estructura y función.

[0025] Se entiende que el término "biomaterial" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier material no farmacológico que se puede utilizar para tratar, mejorar, proteger o reemplazar cualquier tejido, órgano o función en un organismo. El término "biomaterial" también se refiere al material derivado biológicamente que se utiliza por sus propiedades estructurales más que biológicas, por ejemplo, pero no a modo de limitación, para el uso de colágeno, encontrándose la proteína en los huesos y tejidos conectivos, como un cosmético ingrediente, o al uso de carbohidratos modificados con procesos biotecnológicos como lubricantes para aplicaciones biomédicas o como agentes de carga en la fabricación de alimentos. Un "biomaterial" es cualquier material, natural o artificial, que comprende la totalidad o parte de una estructura viva o dispositivo biomédico que realiza, aumenta, protege o reemplaza una función natural y que es compatible con el cuerpo.

[0026] Tal como se usa en el presente documento, cuando el término "aislado" se usa en referencia a una molécula, el término significa que la molécula se ha eliminado de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente de forma natural en un organismo vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Además, las moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector se consideran aisladas para los fines de la presente divulgación. Las moléculas de ARN aisladas incluyen productos de replicación de ARN in vivo o in vitro de moléculas de ADN y ARN. Las moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen además moléculas producidas sintéticamente. Adicionalmente, las moléculas de vector contenidas en células huésped recombinantes también se aíslan. En general, esto también se aplica a los carbohidratos en general. Por lo tanto, no todas las moléculas "aisladas" necesitan ser "purificadas".

[0027] Tal como se usa en el presente documento, cuando el término "purificado" se usa en referencia a una molécula, significa que la concentración de la molécula que se purifica se ha aumentado en relación con moléculas asociadas con ella en su entorno natural. Las moléculas asociadas naturalmente incluyen proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y azúcares, pero generalmente no incluyen agua, tampones ni reactivos añadidos para mantener la integridad o facilitar la purificación de la molécula que se purifica.

[0028] Tal como se utiliza aquí, el término "sustancialmente purificado" se refiere a un compuesto que se retira de su entorno natural y es al menos 60% libre, preferiblemente 75% libre, y lo más preferiblemente 90% libre de otros componentes con los cuales está naturalmente asociado.

[0029] Como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que una especie diana es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en donde la especie diana comprende al menos aproximadamente 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, tal como más de aproximadamente 85%, 90%, 95% y 99%. En una realización, la especie diana se purifica a homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales) en donde la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular.

[0030] Tal como se utiliza aquí, se entenderá que el término "sustrato" se refiere a cualquier superficie de la que un recubrimiento puede estar dispuesto. Los ejemplos de sustratos que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitación, sílice, silicio, vidrio, polímeros, nanotubos, nanopartículas, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, metales y combinaciones de los mismos. Cuando el sustrato es un metal, el metal puede incluir, aunque sin limitación, oro, cobre, acero inoxidable, níquel, aluminio, titanio, aleaciones termosensibles y combinaciones de los mismos.

[0031] Los términos "gel" y "semi-sólido" se usan indistintamente en este documento y se entenderá que incluyen un sistema coloidal, con la apariencia de un sólido, en el que se dispersa un sólido en un líquido; el compuesto puede tener un límite elástico finito. El término "gel" también se refiere a un material gelatinoso formado por la coagulación de un líquido coloidal. Muchos geles tienen una matriz fibrosa e intersticios llenos de líquido: los geles son viscoelásticos más que simplemente viscosos y pueden resistir algún esfuerzo mecánico sin deformación. Cuando se aplica presión sobre geles o semisólidos, se ajustan a la forma en que se aplica la presión.

[0032] El término "hidrogel" se utiliza aquí para describir una red de cadenas de polímero que son insolubles en agua, encontrándose a veces como un gel coloidal en el que el agua es el medio de dispersión. Los hidrogeles son polímeros muy absorbentes, naturales o sintéticos, y pueden contener más del 99% de agua. Los hidrogeles también poseen un grado de flexibilidad muy similar al tejido natural, debido a su importante contenido de agua. Además, los péptidos y/o las sustancias biológicamente activas más grandes se pueden encerrar en hidrogeles, formando así una composición de liberación sostenida.

[0033] Tal como se utiliza aquí, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una composición de biomaterial o conjugado o derivado del mismo suficiente para exhibir un efecto terapéutico o profiláctico detectable sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica) acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. La cantidad efectiva para un sujeto dependerá del tipo de sujeto, el tamaño y la salud del sujeto, la naturaleza y la gravedad de la afección a tratar, el método de administración, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia simultánea (si corresponde), las formulaciones específicas empleadas, y similares. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad efectiva exacta por adelantado. Sin embargo, la cantidad efectiva para una situación dada puede ser determinada por un experto en la materia usando experimentación rutinaria basada en la información proporcionada en este documento.

[0034] Tal como se utiliza aquí, el término "segmento de ácido nucleico" y "segmento de ADN" se usan de forma intercambiable y se refieren a una molécula de ADN que ha sido aislada libre de ADN genómico total de una especie particular. Por lo tanto, un segmento de ADN o ácido nucleico purificado como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de ADN que contiene una secuencia codificante de la sintasa de heparosano (HS) pero que se aísla o se purifica del ADN genómico no relacionado, por ejemplo, *Pasteurella multocida* total. Dentro del término "segmento de ADN" se incluyen segmentos de ADN y fragmentos más pequeños de tales segmentos, y también vectores recombinantes, que incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus y similares.

[0035] El término "expresión" como se usa en el presente documento puede incluir cualquier fase implicada en la producción de sintasas de heparosano, incluyendo, pero no limitado a, la transcripción y la traducción.

[0036] Los términos "gen optimizado" y "optimización de genes" como se usan aquí se refieren a cambios en la secuencia de nucleótidos que codifican una proteína a los utilizados preferentemente en una célula huésped particular de tal manera que la proteína codificada se expresa de manera más eficiente en la célula huésped cuando se compara con la secuencia de nucleótidos nativa. La optimización génica implica varios aspectos para mejorar el uso de codones y la estructura del ARN mensajero para mejorar la producción de proteínas. Es bien sabido en la técnica que los genes de un organismo, la fuente, no siempre funcionan bien en un organismo receptor. Por ejemplo, algunos aminoácidos (AA) están codificados por ARNt múltiples (el código degenerado), y cada organismo tiene uno o más codones preferidos que se usan con más frecuencia. Si se utiliza un codón raro en un gen, entonces el ribosoma debe detenerse y esperar a que se encuentre el ARNt raro antes de que la traducción de la proteína pueda pasar al siguiente aminoácido que se va a agregar; si el bloqueo ocurre durante demasiado tiempo, entonces puede caerse el ribosoma y la proteína no se produce. De forma similar, si el ARNm tiene una estructura secundaria que

interfiere con el movimiento de los ribosomas y, por lo tanto, con la traducción, entonces el ribosoma puede desprenderse del ARN mensajero, produciendo de nuevo una menor producción de proteína. Al estudiar la secuencia de ADN de proteínas naturalmente altamente producidas en el organismo huésped o receptor deseado, se observan ciertos codones para AA. Por lo tanto, el gen de fuente puede convertirse en un productor más altamente funcional si se eliminan los codones raros, y se usan los codones más usados (con respecto al receptor). La secuencia de la proteína es la misma, pero la secuencia de ADN puede diferir debido al código de ARNt degenerado. Ya que hay muchos aspectos en el proceso de traducción, hay varios problemas de optimización importantes que deben abordarse, incluidos, entre otros, el uso de codones, contenido de GC, contenido de dinucleótidos CpG, estructura secundaria de ARNm, sitios de corte y empalme crípticos, sitios prematuros de PolyA, sitios chi internos y sitio de unión ribosomal, islas CpG negativas, motivos de inestabilidad del ARN (ARE), secuencias repetidas (repetición directa, repetición inversa y repetición Dyad), adición de secuencias Kozak y/o secuencias Shine-Dalgarno para aumentar la eficiencia de iniciación de traducción, adición de codones de parada para aumentar la eficacia de la terminación traduccional, y similares. Por lo tanto, la optimización de genes, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cambio en una secuencia de nucleótidos realizada para abordar uno o más de los problemas de optimización mencionados anteriormente.

[0037] Un ejemplo no limitante de un tipo de optimización de genes es la optimización de codones. Los términos "optimizado por codones" y "optimización de codones" se refieren a cambios en los codones del polinucleótido que codifica una proteína a aquellos usados preferentemente en un organismo particular de modo que la proteína codificada se expresa eficientemente en el organismo de interés. Aunque el código genético es degenerado porque la mayoría de los aminoácidos están representados por varios codones, denominados codones "sinónimos", es bien sabido que el uso de codones por organismos particulares no es aleatorio y está sesgado hacia tríos de codones particulares. Este sesgo de uso de codones puede ser mayor en referencia a un gen dado, genes de función común o origen ancestral, proteínas altamente expresadas frente a proteínas de bajo número de copias, y las regiones de codificación de proteínas agregadas del genoma de un organismo. En algunas realizaciones, los polinucleótidos que codifican las enzimas pueden optimizarse con codones para una producción óptima a partir del organismo huésped seleccionado para la expresión.

[0038] "Codones de desviación de uso de codones preferidos, óptimos, preferidos" se refiere indistintamente a codones que se usan con mayor frecuencia en las regiones de codificación de proteínas que otros codones que codifican el mismo aminoácido. Los codones preferidos pueden determinarse en relación con el uso de codones en un solo gen, un conjunto de genes de función u origen común, genes altamente expresados, frecuencia de codones en las regiones codificadoras de proteínas totales del organismo completo, frecuencia de codones en las regiones codificantes de proteína agregada de organismos relacionados, o combinaciones de los mismos. Los codones cuya frecuencia aumenta con el nivel de expresión génica son típicamente codones óptimos para la expresión. Se conocen varios métodos para determinar la frecuencia de codones (por ejemplo, uso de codones, uso de codones sinónimos) y la preferencia de codones en organismos específicos, incluido el análisis multivariante, por ejemplo, utilizando análisis de conglomerados o análisis por correspondencia, y el número efectivo de codones utilizados en un gen (véase GCG Codon Preference, Genetics Computer Group Wisconsin Package; CodCodonW, John Peden, University of Nottingham; McInerney, J. O, 1998, Bioinformatics 14:372-73; Stenico et al., 1994, Nucleic Acids Res. 222437-46; Wright, F., 1990, Gene 87: 23-29). Las tablas de uso de codones están disponibles para una lista creciente de organismos (véase, por ejemplo, Wada et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20: 2111-2118; Nakamura et al., 2000, Nucl. Acids Res. 28: 292; Duret, et al., supra, Henaut y Danchin, "Escherichia coli and Salmonella", 1996, Neidhardt, et al., Eds., ASM Press, Washington DC, página 2047-2066). La fuente de datos para obtener el uso de codones puede basarse en cualquier secuencia de nucleótidos disponible capaz de codificar una proteína. Estos conjuntos de datos incluyen secuencias de ácidos nucleicos que se sabe que codifican proteínas expresadas (por ejemplo, secuencias codificantes de proteínas completas-CDS), etiquetas de secuencias expresadas (EST) o regiones codificantes predichas de secuencias genómicas (véase, por ejemplo, Mount, D. Bioinformática: Sequence and Genome Analysis, Capítulo 8, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Uberbacher, EC, 1996, Methods Enzymol. 266: 259 - 281; Tiwari et al., 1997, Comput. Appl. Biosci. 13: 263 - 270).

[0039] El Dalton (Da) es la unidad internacional de la masa molecular en base a 1/12 de la masa de carbono 12. Un kiloDalton (kDa) es de 1.000 Da. Un mega-Dalton (MDa) es de 1,000 kDa.

[0040] Las composiciones que incluyen un polímero de heparosano de alto peso molecular aislado (HMW) se incluyen y se describen en detalle en este documento, junto con los métodos de producción y uso de los mismos. En ciertas realizaciones, la composición es una composición de biomaterial. En realizaciones particulares, el polímero de heparosano aislado es biocompatible con un paciente mamífero y biológicamente inerte en compartimentos extracelulares del paciente mamífero. El polímero de heparosano no es sustancialmente susceptible a hialuronidasas de vertebrados (tales como, pero sin limitación, mamíferos) o heparansas de vertebrados (tales como, pero sin limitarse a, mamíferos) y por lo tanto no se degrada sustancialmente *in vivo* en compartimentos extracelulares del paciente mamífero. Además, el polímero de heparosano puede producirse recombinantemente como se describe en detalle en la presente memoria utilizando una combinación de biosíntesis de célula huésped y sintasa, donde las características de estos dos factores influyen en el MW producido por la célula viva.

[0041] El polímero de heparosano aislado de la invención está representado por la estructura (-GlcUA-betal,4-

GlcNAc-alfa-1,4-)*n,* en donde *n* es un entero positivo mayor que o igual a aproximadamente 2.000. Los polímeros de este tamaño no se han descrito hasta ahora en la literatura científica y en la técnica anterior. Cada unidad n individual es de aproximadamente 400 Da, y por lo tanto el polímero de heparosano aislado tiene un peso molecular (MW) mayor que o igual a aproximadamente 800 kDa. El n puede ser un número entero positivo en un intervalo de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 17.000, y, por lo tanto, el polímero de heparosano aislado tiene un PM en un intervalo de aproximadamente 0,8 MDa a aproximadamente 6,8 MDa. Además, n puede ser un número entero positivo tal como, pero no limitado a, 2.250; 2.500; 2.750; 3.000; 3.250; 3.500; 3.750; 4.000; 4.250; 4.500; 4.750; 5.000; 5.250; 5.500; 5.750; 6.000; 6.250; 6.500; 6.750; 7.000; 7.250; 7.500; 7.750; 8.000; 8.250; 8.500; 8.750; 9.000; 9.250; 9.500; 9.750; 10.000; 10.250; 10.500; 10.750; 11.000; 11.250; 11.500; 11.750; 12.000; 12.250; 12.500; 12.750; 13.000; 13.250; 13.500; 13.750; 14.000; 14.250; 14.500; 14.750; 15.000; 15.250; 15.500; 15.750; 16.000; 16.250; 16.500; 16.750; y 17.000; así como dentro de un rango de cualquiera de los anteriores.

[0042] El polímero de heparosano puede ser lineal o reticulado. Las composiciones descritas en este documento pueden administrarse a un paciente por cualquier medio conocido en la técnica; por ejemplo, las composiciones pueden ser inyectables y/o implantables. Además, las composiciones pueden estar en un estado de gel o semisólido, una suspensión de partículas, o las composiciones pueden estar en forma líquida.

[0043] Alternativamente, el polímero de heparosano puede estar unido a un sustrato. Cuando se une a un sustrato, el polímero de heparosano aislado puede unirse covalentemente (a través de un enlace químico) o no covalentemente (a través de enlaces débiles) al sustrato. Se puede utilizar cualquier sustrato conocido en la técnica o contemplado de otro modo en la presente, siempre que el sustrato sea capaz de unirse al polímero de heparosano y funcionar. Los ejemplos de sustratos que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitación, sílice, silicio, semiconductores, vidrio, polímeros, nanotubos, nanopartículas, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, metales y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de metales que se pueden utilizar incluyen oro, cobre, acero inoxidable, níquel, aluminio, titanio, aleaciones termosensibles y combinaciones de los mismos.

[0044] La presente descripción también comprende composiciones de biomaterial que comprenden un gel reticulado que incluye un polímero de heparosano aislado y al menos un agente de reticulación. El agente de reticulación puede ser cualquier agente de reticulación conocido o contemplado en la técnica; los ejemplos específicos no limitantes de agentes de reticulación que pueden utilizarse incluyen aldehídos, epóxidos, compuestos de poliaziridilo, éteres de glicidilo, divinilsulfonas, y combinaciones y derivados de los mismos. Una ventaja de la presente invención descrita es que se pueden usar concentraciones más bajas de este polímero de alto PM (mayor de 1 MDa o 1.000 kDa) para producir geles útiles que si se empleara un polímero de menor MW.

[0045] Cualquiera de las composiciones de biomaterial de la presente descripción puede ser un biomaterial hidratante que protege de la deshidratación; alternativamente, las composiciones de biomateriales descritas pueden ser un biomaterial lubricante.

[0046] Otro aspecto de la presente divulgaci[on se relaciona con kits para administración *in vivo* de cualquiera de las composiciones descritas en este documento anteriormente o contempladas en el presente documento de otra manera a un paciente mamífero. El kit también puede incluir instrucciones para administrar la composición al paciente mamífero. El kit también puede contener opcionalmente una o más composiciones diferentes para su uso de acuerdo con los métodos descritos en este documento.

[0047] La invención se dirige además a un método para producir de forma recombinante un polímero de heparosano de MW alto. En el método, una célula huésped recombinante que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una sintasa de heparosano, la enzima que polimeriza los monosacáridos de precursores de UDP-azúcar en polisacáridos heparosanos o polímeros de azúcar, es cultivado en condiciones apropiadas para la expresión de la sintasa de heparosana. La sintasa de heparosana produce el polímero de heparosano de alto MW, que luego se aísla.

[0048] El polímero de heparosano de MW alto aislado puede poseer cualquiera o todas las características descritas anteriormente en este documento, y puede posteriormente utilizarse como una composición de biomaterial. Por lo tanto, el método puede comprender además uno o más pasos para este fin, tales como, entre otros, reticular el polímero de heparosano aislado o unir (ya sea de forma covalente o no covalente) el polímero de heparosano aislado a cualquiera de los sustratos descritos o contemplados de otra manera aquí.

[0049] En ciertas realizaciones no limitantes, la célula huésped es una célula huésped *E. coli*, y la sintasa de heparosano es una sintasa de heparosano *Pasteurella*.

[0050] Los ejemplos no limitantes de sintasas de heparosano que pueden ser utilizados de acuerdo con la invención se describen con más detalle en el presente documento a continuación.

[0051] Cualquier célula huésped conocida en la técnica o contemplada de otro modo en el presente documento puede ser utilizada de acuerdo con la invención, siempre que la célula huésped es capaz de hacerse recombinante con un gen de sintasa de heparosano y producir un polímero de heparosano de MW alto tras la expresión del gen de

sintasa de heparosano bajo las condiciones de cultivo apropiadas. Los ejemplos no limitantes de células huésped que pueden utilizarse de acuerdo con la invención se describen con mayor detalle a continuación.

[0052] La presente descripción muestra que sintasas de heparosano de *Pasteurella* realizarán la operación de la biosíntesis de heparosano de MW ultra-alto en una célula huésped de *E. coli* con el UDP-azúcar correcto y la infraestructura de transporte. La mayoría de las cepas de *E. coli* disponibles empleadas en laboratorios, así como la mayoría de los aislamientos de tipo salvaje, no son útiles sin una mayor manipulación. La presente divulgación demuestra que un huésped de *E. coli* K5 (o cepas que contienen una infraestructura similar) es susceptible de producción de polímero de heparosano de alto MW.

[0053] En teoría, son posibles al menos dos modelos simples para controlar el tamaño de un polímero: (A) biosíntesis controlada por células huésped o biosíntesis controlada por (B) sintasa. En el modelo anterior, la naturaleza del aparato de soporte (*por ejemplo,* precursores de azúcar UDP, transportadores) define la distribución de tamaño final realizada por la célula activa. En el último modelo, las propiedades intrínsecas del catalizador de polimerización (*p. ej.*, velocidad de elongación, procesividad) controlan la distribución de tamaño de polímero hecha por la célula viva. Un tercer modelo (C), la biosíntesis combinatoria de la célula huésped/sintasa, es posible cuando las características de ambos factores influyen en el MW producido por una célula viva; este modelo también es el más complejo, impredecible y no obvio de descifrar. Los modelos A y B son inconsistentes con los datos observados; ni el tamaño del producto de la célula huésped *Escherichia coli* K5 (~50-80 kDa) ni el tamaño del producto sintasa de heparosano de Pasteurella (~100-300 kDa) es similar al heparosano hecho en esta descripción (> 800 kDa) y debe considerarse un resultado no predecible que no ha sido reportado en la literatura científica o de patentes hasta la fecha.

[0054] Esta descripción también incluye el uso de huéspedes alternativas con el potencial para la producción de glicosaminoglicano, incluyendo bacterias tanto Gram-negativos (por ejemplo, *Pseudomonas,* etc.) y las clases Gram-positivas (por ejemplo, *Bacilos, Lactoctococci,* etc.), así como otros microbios (hongos, arqueas, etc.). Los requisitos básicos de una huésped recombinante para su uso en la producción de heparosano incluyen: (a) la glicosiltransferasa que produce heparosano, y (b) los precursores de UDP-UDP UDP-GlcNAc y UDP-GlcUA. Debe observarse que este último requisito puede cumplirse mediante genes nativos o genes recombinantes introducidos. Los genes requeridos pueden estar localizados episomalmente y/o cromosómicamente.

[0055] En ciertas realizaciones, la célula huésped comprende además al menos un gen que codifica una enzima para la síntesis de un precursor de azúcar de heparosano (es decir, UDP-GlcNAc o UDP-GlcUA). Los ejemplos no limitantes de genes que codifican una enzima para la síntesis de un precursor de azúcar de heparosano que pueden utilizarse incluyen pirofosforilasas, transferasas, mutastasas, deshidrogenasas y epimerasas.

[0056] El polímero de heparosano de MW ultra-alto (= o >1MDa) no se conoce en la naturaleza y no se ha demostrado o reportado por otros. Como es bien sabido en el campo de los polímeros, la distribución del tamaño afecta sus propiedades físicas (por ejemplo, viscosidad, enmarañamiento de la cadena, solubilidad). El heparosano >1 MDa descrito se prefiere sobre el heparosano natural con respecto al rendimiento en la producción de ciertos biomateriales, tales como, pero sin limitación, viscoelásticos e hidrogeles.

[0057] La presente descripción también se relaciona con métodos de aumentar el tejido en un paciente mamífero. En tales métodos, se administra una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones de biomateriales descritas anteriormente en la presente memoria o contempladas de otra manera en la presente memoria al paciente mamífero. La composición de biomaterial se puede administrar al paciente mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, inyección y/o implantación. Cuando se inyecta, la composición de biomaterial puede estar en un estado líquido o una suspensión de partículas, mientras que cuando se implanta, la composición de biomaterial puede estar en un estado de gel o semisólido, o puede estar unida a un sustrato.

[0058] La presente descripción también se refiere a métodos de reparación de huecos en los tejidos de mamíferos. En el método, cualquiera de las composiciones de biomateriales descritas anteriormente en la presente memoria o de lo contrario contempladas aquí se administra en los huecos. La composición de biomaterial se puede inyectar y/o implantar en los huecos.

[0059] La presente divulgación también se refiere a métodos de creación de huecos o víscera en los tejidos de mamíferos. En el método, cualquiera de las composiciones de biomateriales descritas anteriormente en la presente memoria o de lo contrario contempladas en la presente memoria están dispuestas en un tejido o una construcción de ingeniería de tejidos para crear los vacíos o la víscera. La composición de biomaterial puede inyectarse y/o implantarse en la construcción de tejido/ingeniería de tejido para crear los vacíos o la víscera.

[0060] La presente descripción también se refiere a métodos de cirugía reparadora o cirugía plástica. En el método, cualquiera de las composiciones de biomateriales descritas anteriormente en la presente memoria o de lo contrario contempladas en este documento se administran a un paciente y sirven como un material de relleno en el sitio al que se administra. La composición de biomaterial puede inyectarse y/o implantarse en el paciente.

[0061] La presente descripción se refiere además a métodos de aumento y/o el tratamiento de la deficiencia de la piel dérmica en un paciente. En el método, cualquiera de las composiciones de biomateriales descritas anteriormente en la presente memoria o de lo contrario contempladas en la presente se administran al paciente. La composición de biomaterial puede inyectarse y/o implantarse en el paciente. La composición de biomaterial es biocompatible, hinchable, hidrófila y sustancialmente no tóxica, y la composición del biomaterial se hincha al contacto con fluidos fisiológicos en el sitio de administración/inyección/implantación.

[0062] El método de aumento dérmico de la presente descripción es especialmente adecuado para el tratamiento de deficiencias del contorno de la piel, que a menudo son causadas por diversas condiciones/exposiciones, incluyendo pero no limitado al envejecimiento, la exposición ambiental, pérdida de peso, procrear, lesiones, cirugía, además de enfermedades como el acné y el cáncer. Ejemplos no limitantes de deficiencias de contorno incluyen líneas de expresión, líneas de preocupación, arrugas, patas de gallo, líneas de marionetas, estrías y cicatrices internas y externas como resultado de una lesión, herida, mordida, cirugía o accidente.

[0063] Además, la presente disclosurealso se refiere a métodos de tratamiento médico o profiláctico de un paciente mamífero. En el método, cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento o contempladas de otro modo en la presente memoria se administra al paciente mamífero que necesita dicho tratamiento. La composición puede inyectarse y/o implantarse en el paciente mamífero.

[0064] Además, la presente divulgación también se refiere a métodos de tratamiento o profilaxis de aumento de tejidos en un paciente mamífero. En el método, una composición médica o profiláctica que comprende una composición de gel de polisacárido que incluye cualquiera de las composiciones de biomaterial descritas anteriormente en la presente memoria o de lo contrario contempladas en la presente se administra al paciente mamífero.

[0065] La presente descripción se refiere además a un sistema de administración para una sustancia que tiene actividad biológica o farmacológica. El sistema que comprende una jaula molecular formada por un gel reticulado de heparosano o un gel reticulado mixto de heparosano y al menos otro polímero hidrófilo copolimerizable con el mismo. El sistema incluye además una sustancia que tiene actividad biológica o farmacológica dispersa en la misma, en la que la sustancia es capaz de difundirse desde allí de una manera controlada.

[0066] Los biomateriales descritos en este documento se pueden utilizar en cualquiera de los métodos de la utilización de biomateriales conocidos o contemplados en la técnica de otra manera. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, las composiciones de biomateriales se pueden utilizar en cualquiera de los métodos de utilización de otros biomateriales conocidos que se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 4.582.865, concedida a Balazs et al. el 15 de abril de 1986; 4.636.524, concedida a Balazs et al. el 13 de enero de 1987; 4.713.448, concedida a Balazs et al. el 15 de diciembre de 1987; 5.137.875, concedida a Tsununaga et al. el 11 de agosto de 1992; 5.827.937, concedida a Ang el 27 de octubre de 1998; 6.436.424, concedida a Vogel et al. el 20 de agosto de 2002; 6.685.963, concedida a Taupin et al. el 3 de febrero de 2004; y 7.060.287, concedida a Hubbard et al. el 13 de junio de 2006. Otros ejemplos específicos de usos para las composiciones de biomateriales divulgadas actualmente incluyen, pero no se limitan a: (a) un recubrimiento lubricante persistente en una superficie, tal como, pero sin limitación, dispositivos quirúrgicos; (b) un humectante de larga duración; (c) un suplemento viscoelástico para enfermedades articulares; y (d) un conducto de sangre no trombótico, no oclusivo (tal como, pero no limitado a, un stent o vaso artificial, etc.). Además, cualquiera de las composiciones de biomateriales descritas en este documento se puede utilizar en la ingeniería de tejidos para formar una víscera o conducto o lumen del vaso usando las composiciones de biomateriales del concepto inventivo descrito en la presente invención como un creador espacial tridimensional; en este caso, las células circundantes no se unirán a las composiciones de biomateriales), lo que hace que tales composiciones de biomateriales sean muy adecuadas para esta tecnología.

[0067] Las composiciones descritas en este documento pueden producirse utilizando sintasa de heparosanos recombinantes como se describe o se conocen de otro modo en la técnica, incluidas, entre otras, las sintasas de heparosanos descritas en las patentes anteriores del inventor, patentes de los Estados Unidos números 7.307.159, expedida el 11 de diciembre de 2007; 7.771.981, expedida el 8 de mayo de 2002; y 8,088,604, expedida el 3 de enero de 2012; así como las sintasas de heparosanos divulgadas en las solicitudes de patente publicadas del inventor US 2008/0226690, publicada el 18 de septiembre de 2008; US 2010/0036001, publicada el 11 de febrero de 2010; y US 2012/0108802, publicada el 3 de mayo de 2012.

[0068] Las sintasas de heparosanos que se pueden utilizar de acuerdo con la invención incluyen: una sintasa de heparosano recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8, y una sintasa de heparosana recombinante codificada por la secuencia de nucleótidos de al menos una de las SEQ ID NOS: 9-11. Otras realizaciones describen una sintasa de heparosano recombinante que es idéntica al menos en un 90% a al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8; una sintasa de heparosano recombinante que es idéntica al menos en un 95% a al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8; una sintasa de heparosano recombinante codificada por una secuencia de nucleótidos que es idéntica al menos en un 90% a al menos una de las SEQ ID NOS: 9-11; y una sintasa de heparosano recombinante codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos 95% idéntica a al menos una de las SEQ ID NOS: 9-11.

[0069] El uso de genes de sintasa de heparosano truncados para producir cualquiera de las composiciones descritas o contempladas en este documento también cae dentro del alcance de la presente descripción de otra manera. Por ejemplo, la eliminación de los últimos 50 residuos o los primeros 77 residuos de PmHS1 (SEQ ID NOS: 7 y 8, respectivamente) no inactiva su función catalítica (Kane et al., 2006). Los expertos en la técnica apreciarán que la simple eliminación de aminoácidos de cualquiera de los extremos de la secuencia de sintasa de heparosano puede lograrse. Las versiones truncadas de la secuencia simplemente deben verificarse para determinar si dicha secuencia truncada todavía es capaz de producir heparosano.

[0070] Del mismo modo, también se describe el uso de proteínas de fusión que añaden otros segmentos de polipéptido (ya sea a termini o internamente) a la secuencia de sintasa de heparosano. La proteína de fusión asociada (tal como, pero sin limitación, proteína de unión a maltosa, tiorredoxina, etc.) puede aumentar la estabilidad, aumentar los niveles de expresión en la célula y/o facilitar el proceso de purificación, pero la actividad catalítica para fabricar el polímero de heparosano sigue siendo igual.

[0071] Un experto en la técnica, dada una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos, podría hacer sustituciones y cambios a la secuencia de ácido/aminoácidos nucleicos sin cambiar su funcionalidad (ejemplos específicos de tales cambios se dan en lo sucesivo y se exponen generalmente en SEQ ID NOS: 7-8).

TABLA 1

Grupo de aminoácidos	**Sustituciones conservadoras y semi-conservadoras**
Grupos R no polares	Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Prolina, Metionina, Fenilalanina, Triptófano
Grupos R polares, pero sin carga	Glicina, serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina
Grupos R con carga negativa	Ácido aspártico, ácido glutámico
Grupos R positivamente cargados	Lisina, Arginina, Histidina

[0072] Por lo tanto, la presente descripción también incluye el uso de sintasas de heparosano que tienen secuencias de aminoácidos que difieren de al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8 por al menos uno de los siguientes: la presencia de 1-20 adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos cuando se compara con al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8; la presencia de 1-15 adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos cuando se compara con al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8; la presencia de 1-10 adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos cuando se compara con al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8; y la presencia de adiciones, deleciones o sustituciones de 1-5 aminoácidos cuando se compara con al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8.

[0073] Teniendo en cuenta la degeneración del código genético, así como sustituciones conservadas y semi-conservadzx, secuencias que tienen entre aproximadamente 90% y aproximadamente 99% de identidad con los nucleótidos de al menos una de las SEQ ID NO: 9-11 serán secuencias que son "esencialmente como se exponen en al menos una de SEQ ID NO: 9-11".

[0074] La presente descripción también incluyen el uso de secuencias de nucleótidos que codifican cualquiera de las sintasas de heparosano descritas en este documento, en donde las secuencias de nucleótidos son secuencias sintéticas que han sido optimizadas por genes para expresión en una célula huésped particular. Ejemplos específicos, no limitantes, de secuencias nucleotídicas que codifican sintasa de heparosano optimizadas genéticamente se proporcionan en SEQ ID NOS: 9-11. Las SEQ ID NOS: 9-10 incluyen secuencias de nucleótidos que codifican la sintasa de heparosana de SEQ ID NO: 2 y que han sido genéticamente optimizadas para la expresión en *E. coli.* La SEQ ID NO: 11 incluye una secuencia de nucleótidos que codifica la sintasa de heparosana de SEQ ID NO: 2 y que ha sido optimizada genéticamente para la expresión en *Bacillus.*

[0075] El uso de secuencias de genes optimizados es conocido y utilizado en la técnica para aumentar la expresión de la secuencia génica en el huésped heterólogo. Sin embargo, se produjo inesperadamente un nuevo producto a partir de la sintasa heparosiana expresada en *E. coli* cuando la secuencia del gen *Pasteurella* se optimizó genéticamente y se expresó en *E. coli.* La invención describe la producción de polímeros de heparosanos de peso molecular mega-Dalton, y esta nueva especie nunca se ha descrito anteriormente en ningún microbio conocido. Un experto en la técnica supondría que la optimización de una secuencia génica que codifica una enzima daría como resultado un aumento de la expresión de esa enzima en el huésped heterólogo, dando como resultado una mayor producción del mismo producto derivado de la enzima (es decir, mayores cantidades de polímero de heparosano del tamaño típico encontrado en los microbios nativos) producida en el huésped nativo. Inesperadamente, la expresión de sintasa de heparosano de *Pasteurella multocida* optimizada genéticamente en *E. coli* dio como resultado una nueva especie de producto: un polímero de heparosano de peso molecular ultraelevado. No se ha informado sobre la producción de polímeros de heparosanos de este tamaño para ningún otro microbio. Además, los polímeros de heparosanos producidos exhiben propiedades superiores y ventajosas en comparación con los productos de peso molecular inferior actualmente conocidos en la técnica. Estas propiedades proporcionan una utilidad mejorada para el polímero de heparosano en el campo de los biomateriales. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los

polímeros de heparosanos de peso molecular ultra alto (PM) producidos de acuerdo con la invención exhiben una viscosidad mejorada de la solución y se pueden usar a concentraciones más bajas (con o sin reticulación química) que las preparaciones heparosas que se producen naturalmente.

[0076] La presente descripción incluye además secuencias de nucleótidos aisladas, además de células huésped recombinantes, que contienen cualquiera de las secuencias de genes de la sintasa de heparosano optimizada de la invención.

[0077] El heparosano, un polímero de azúcar que es el precursor biosintético natural de heparina y sulfato de heparano, tiene numerosas características que indican que este material exhibe un rendimiento mejorado en una variedad de aplicaciones médicas o dispositivos médicos. En comparación con HA y heparina, dos polímeros muy similares estructuralmente utilizados en muchas aplicaciones en varios mercados grandes, el heparosano es más estable en el cuerpo, ya que las enzimas que se producen naturalmente no degradan el heparosano, y por lo tanto las composiciones de biomateriales de la invención deberían tener vidas más largas en comparación con los biomateriales usados actualmente. Además, el heparosano interactúa con menos proteínas (por lo tanto, menos incrustaciones) y células (por lo tanto, menos infiltración, cicatrización o coagulación) en comparación con los biomateriales existentes.

[0078] La cadena de heparosano no contiene grupos de sulfato; por lo tanto, la enzima degradante heparanasa, las proteínas del sistema de anticoagulación de la sangre, los receptores de unión a la superficie celular y los factores de crecimiento y las citoquinas no se unirán específicamente al polímero. Esta característica conduce a un carácter inerte en el cuerpo, proporcionando así una vida media larga en el espacio extracelular además de no estimular o inducir comportamientos celulares (por ejemplo, crecimiento, migración, unión, activación, etc.). Sin embargo, una vez en la célula, la cadena heparosana puede degradarse mediante sistemas metabólicos normales, como las exoglucosidasas en el lisosoma.

[0079] En comparación con los plásticos sintéticos o de carbono, las características de hidrofilicidad natural (es decir, amante del agua) de heparosano también mejoran la compatibilidad con los tejidos. Las proteínas derivadas de animales (*p. ej.*, Colágeno, albúmina de suero bovino) e hidroxiapatita cálcica a menudo tienen efectos secundarios, que incluyen, pero no se limitan a, provocar una respuesta alérgica y/o granulación estimulante (5). Por otro lado, incluso ciertas bacterias patógenas usan heparosano para esconderse en el cuerpo ya que este polímero no es inmunogénico (8-10). Las composiciones de biomateriales de la invención producidas a partir de una fuente no animal también prometen estar libres de agentes adventicios (*p. ej.*, virus de vertebrados, priones) que podrían contaminar las fuentes derivadas de animales o humanos.

[0080] Ciertos carbohidratos juegan un papel en la formación y el mantenimiento de las estructuras de los organismos multicelulares, además de las funciones más familiares como nutrientes para la energía. Los glicosaminoglicanos [GAG], polisacáridos lineales largos que consisten en repeticiones de disacáridos que contienen un aminoazúcar, son bien conocidos por ser esenciales en los vertebrados (9, 11-15). Las estructuras GAG poseen muchos grupos negativos y están repletas de grupos hidroxilo, por lo tanto, estos azúcares tienen una alta capacidad para adsorber agua e iones. Heparina/heparan (columna vertebral $[\beta4GlcUA\text{-}\alpha4GlcNAc]_n$), condroitina (columna vertebral $[\beta4GlcUA\text{-}\beta3GalNAc]_n$), y hialuronano (HA, columna vertebral $[\beta4GlcUA\text{-}\beta3GlcNAc]_n$) son los tres GAG más prevalentes en humanos. Dependiendo del tipo de tejido y célula, los GAG son elementos estructurales, de adhesión y/o de señalización. Algunos microbios inteligentes también producen recubrimientos de polisacáridos extracelulares, llamados cápsulas, compuestos de cadenas de GAG que sirven como factores de virulencia (9, 10). Se cree que la cápsula ayuda a la evasión de las defensas del huésped, como la fagocitosis y el complemento. Como el polisacárido microbiano es idéntico o muy similar al GAG del huésped, la respuesta del anticuerpo es muy limitada o inexistente.

[0081] En los seres humanos, heparosano sólo existe de forma transitoria, que sirve como un precursor de los productos finales más altamente modificadas de sulfato de heparán y heparina. Por el contrario, las cepas bacterianas establecidas en este documento producen heparosano como su producto final (16). Debido a la composición menos compleja de las células bacterianas y a la relativa facilidad con la que se puede modular su crecimiento y expresión, la extracción de un polímero de los microbios es mucho más fácil, más escalable y menos costosa que la extracción de los tejidos animales. Además, el polímero en la presente invención descrita, a saber, el heparosano de MW ultra alto (1 a 6,8 MDa) derivado de nuestro sistema recombinante no ha existido previamente o no se ha informado en la naturaleza.

[0082] Los rellenos dérmicos sirven como sustitutos de tejidos o agentes de aumento suave (5, 6). La necesidad de un relleno dérmico puede surgir del envejecimiento (pérdida de HA y elastina), traumatismo (pérdida de tejido), acné (picaduras severas) y/o atrofia (ciertas enfermedades debilitantes, incluida la lipoatrofia). Tres características importantes que deben tener los rellenos dérmicos incluyen a) la capacidad de llenar el espacio, *b)* el mantenimiento de la hidratación, y c) la biocompatibilidad (5). Actualmente, los polisacáridos, las proteínas, los plásticos y la cerámica se han usado como biomateriales en los rellenos dérmicos. Con respecto a la apariencia estética y la facilidad de implantación, los geles inyectables más blandos tienen mejores atributos; por lo tanto, los polisacáridos y las proteínas son ampliamente utilizadas. Además de los usos terapéuticos, las aplicaciones cosméticas se están

generalizando. Las alternativas al tratamiento de relleno dérmico son el uso de (*i)* cirugía plástica (endurecimiento de la piel), (*ii)* agentes para eliminar los nervios como BOTOX® (relajar los músculos) y (*iii)* el uso de grasa autóloga. En comparación con los rellenos dérmicos, estas alternativas son más invasivas y/o dejan al paciente con una apariencia antinatural (5, 6). Para las víctimas de traumas, cicatrices o enfermedades graves, el objetivo de la terapia es inculcar más confianza en sí mismo y una mejor disposición; este efecto no debe descartarse, ya que el estado mental del paciente es importante para la curación general.

[0083] Un objetivo importante de la bioingeniería es el diseño de dispositivos artificiales implantados para reparar o para monitorizar el cuerpo humano. Los polímeros de alta resistencia, las aleaciones duraderas y los semiconductores versátiles tienen muchas propiedades que hacen que estos materiales sean deseables para las tareas de bioingeniería. Sin embargo, el cuerpo humano tiene una amplia gama de defensas y respuestas que evolucionaron para prevenir infecciones y eliminar materia extraña que dificulta la utilización de sustancias artificiales modernas (17, 18). Mejorar la biocompatibilidad de estos materiales eliminará un importante cuello de botella en el avance de la bioingeniería.

[0084] Un ejemplo principal de una necesidad médica de recubrimientos de superficie mejoradas se encuentra en la enfermedad cardiovascular. El daño de esta enfermedad es un problema muy frecuente y costoso; el sistema del paciente carece de oxígeno y nutrientes debido al flujo sanguíneo deficiente. La disponibilidad de injertos de vasos sanguíneos a partir de trasplantes (ya sean autólogos o donantes) es limitada y costosa. Por lo tanto, la capacidad de crear nuevos buques artificiales es un objetivo, pero tomará más tiempo para perfeccionar debido a la compleja ingeniería y los requisitos biológicos. Otra intervención terapéutica más actual y más accesible emplea stents, dispositivos artificiales que mantienen abierta la cavidad interna de los vasos sanguíneos de un paciente. Como resumieron Jordan y Chaikof, "El desarrollo de un injerto vascular de pequeño diámetro clínicamente duradero, así como los biosensores implantables permanentemente y los sistemas de órganos artificiales que interactúan con la sangre, incluidos el corazón artificial, el riñón, el hígado y el pulmón, siguen limitados por las respuestas trombóticas inducidas por la superficie" (7).) Por lo tanto, para avanzar más en esta tecnología, se necesitan recubrimientos superficiales tromboresistentes que inhiban: (*i)* la adsorción de proteínas y células, (*ii)* la formación de trombina y fibrina, y (*iii)* la activación y agregación de plaquetas.

[0085] Plásticos artificiales (poli[lactida] en SCULPTRA® (Sanofi-Aventis) o poli[metacrilato de metilo] en ARTECOLL® (Artes Medical, Inc., San Diego, CA), cerámica (hidroxiapatita de calcio en RADIESSE® (Bioform Medical, Inc., San Mateo, CA) o carbono puro tienen utilidad para muchas aplicaciones terapéuticas (1,5,7,18), pero en muchos aspectos, sus propiedades químicas y físicas no son tan óptimas como los polisacáridos para los objetivos específicos de rellenos dérmicos o revestimientos superficiales. Los problemas más críticos son la falta de buena humectabilidad (debido a una mala interacción con el agua) y/o la dureza (que conduce a una sensación no natural o fragilidad). La presente divulgación se relaciona con el uso de heparosano para reemplazar y suplantar polímeros de azúcar útiles que son hidrófilos (agua que fluye) y pueden prepararse en forma suave.

[0086] Además de HA y heparina, otros polisacáridos tales como dextrano ($[\alpha 6Glc]_n$), celulosa ($[\beta 4Glc]_n$), o quitosano ($[\beta 4GlcN]_n$) tienen muchas propiedades útiles, pero puesto que no son naturalmente aniónicos (carga negativa), estos polímeros no imitan la matriz extracelular natural o las superficies de los vasos sanguíneos. La celulosa y el dextrano se pueden transformar químicamente en polímeros cargados que ayudan a aumentar su biocompatibilidad y mejorar sus propiedades fisicoquímicas generales, pero se requieren condiciones severas que conducen a la variabilidad de lote a lote y problemas de calidad. Por otro lado, los GAG, los polímeros naturales, tienen cargas negativas intrínsecas.

[0087] HA y heparina se han empleado como revestimientos biomateriales para prótesis vascular y stents (vasos sanguíneos artificiales y soportes), así como revestimientos sobre las lentes intraoculares y prótesis de tejidos blandos (7, 22). El motivo es evitar la coagulación de la sangre, mejorar la resistencia a la incrustación y evitar la adhesión posquirúrgica (cuando los órganos se unen de manera indeseable). Las composiciones de biomateriales actualmente divulgadas también deberían ser adecuadas como un revestimiento, como se describe con mayor detalle más adelante.

[0088] Una ventaja clave con heparosano es que ha aumentado bioestabilidad en la matriz extracelular en comparación con otros GAGs. Al igual que con la mayoría de los compuestos sintetizados en el cuerpo, se crean nuevas moléculas y, después de cumplir su función, se descomponen en componentes más pequeños para su reciclaje. La heparina y el sulfato de heparano finalmente se degradan y se vuelcan con una única enzima conocida como heparanasa (23, 24). El desafío experimental de heparosano y N-sulfoheparosano con heparanasa, sin embargo, muestra que estos polímeros que carecen de O-sulfatación no son sensibles a la acción enzimática *in vitro* (25, 26). Estos hallazgos demuestran que el heparosano no está fragmentado enzimáticamente en el cuerpo. En general, esto indica que el heparosano es un biomaterial muy estable.

EJEMPLOS

[0089] Los ejemplos se proporcionan a continuación. Sin embargo, debe entenderse que la presente invención no está limitada en su aplicación a la experimentación específica, resultados y procedimientos de laboratorio. Por el

contrario, los ejemplos se proporcionan simplemente como una de varias realizaciones y se pretende que sean ejemplares, no exhaustivos.

EJEMPLO 1

[0090] Secuencias pmHS1 optimizadas genéticamente para la expresión en *E. coli* y *Bacillus.* Se obtuvieron tres secuencias genéticamente optimizadas que codifican la sintasa de heparosano *Pasteurella multocida* de SEQ ID NO: 2. Dos de las secuencias (SEQ ID NOS: 9 y 10) se optimizaron genéticamente para la expresión en *E. coli,* mientras que la tercera secuencia (SEQ ID NO: 11) se optimizó genéticamente para la expresión en *Bacillus.*

[0091] La Figura 1A contiene un alineamiento de las dos secuencias optimizadas del gen de *E. coli,* SEQ ID NOS: 9 y 10, con un gen de la sintasa de heparosano de *Pasteurella multocida* nativa (SEQ ID NOS: 1). La Figura 1B contiene un alineamiento de solo las dos secuencias optimizadas por gen de *E. coli,* SEQ ID NOS: 9 y 10. La Figura 1C contiene un alineamiento de la secuencia optimizada del gen de *Bacillus* (SEQ ID NOS: 11) con un gen de sintasa de heparosano de *Pasteurella multocida* nativo (SEQ ID NO: 12).

[0092] La Tabla 2 ilustra el porcentaje de identidad entre las dos secuencias genéticamente optimizadas de SEQ ID NOS: 9-10 y la secuencia del gen de *Pasteurella multocida* nativa (SEQ ID NO: 1). Obsérvese que las tres secuencias codifican secuencias de aminoácidos que son 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Como puede verse, las dos secuencias optimizadas genéticamente son aproximadamente idénticas en un 74% a la secuencia del gen de *Pasteurella* nativa. También se observa que las dos secuencias genéticamente optimizadas son idénticas en un 95% entre sí, de modo que se obtiene alguna variación del algoritmo que se utiliza para generar la secuencia optimizada.

TABLA 2: Identidades porcentuales de secuencias genéticas de sintasa de heparosana optimizadas genéticamente y nativas

	pmHS1 (SEQ ID NO: 1)	**pmHS1-opt1 (SEQ ID NO: 9)**	**pmHS1-opt2 (SEQ ID NO: 10)**
pmHS1 (SEQ ID NO:1)		74,3%	73,7%
pmHS1-opt1 (SEQ ID NO:9)	74,3%		94,5%
pmHS1-opt2 (SEQ ID NO: 10)	73,7%	94,5%	

EJEMPLO 2

[0093] *Producción de polisacárido de heparosano de MW alto.* Hay dos tipos de micobios que ocurren naturalmente, (a) ciertas bacterias de *Pasteurella multocida* (Tipo D) y sus hermanos relacionados como ciertas *Avibacterias,* y (b) *Escherichia coli* K5 y sus hermanos relacionados que hacen un recubrimiento extracelular compuesto de polímero de heparosano no sulfatado que se cosecha fácilmente de los medios de cultivo. Se ha descubierto una característica inesperada y ventajosa para el heparosano recombinante (gen de *Pasteurella* genéticamente optimizado en un huésped de *E. coli)* sobre heparosano bacteriano natural y heparosano de mamífero; el heparosano producido en la presente memoria tiene un peso molecular mayor de aproximadamente 1 a 6,8 MDa (1.000 a 6.800 kDa); por lo tanto, los geles o viscoelásticos líquidos formados a partir de este heparosano recombinante deberían ser más fáciles de producir.

[0094] *Transformación de pmHS1 optimizado genéticamente en E. coli:* La secuencia de nucleótidos optimizados genéticamente de *pmHS1* sintético (SEQ ID NO: 9) se obtuvo de GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ) y se ligó en un plásmido pKK223-3. El plásmido que contiene el gen pmHS1 se transformó luego en células de *E. coli* K5 químicamente competentes.

[0095] *Producción y ensayo de heparosano:* Las células de *E. coli* K5 que expresan el gen *pmHS1* optimizado genéticamente se cultivaron en medio sintético a 30°C en un fermentador de 14 L durante aproximadamente 40 horas. El medio de cultivo gastado (la parte líquida del cultivo después de eliminar las células microbianas) se recogió (por centrifugación a 10.000 x *g* durante 60 minutos) y se analizaron alícuotas mediante electroforesis en gel de agarosa (tampón TAE 1X, agarosa al 0,8-1,5%). mediante visualización con Stains-All (Lee & Cowman, Anal. Biochem., 1994). El tamaño del polímero de heparosano se determinó por comparación para monodispersar patrones de tamaño de HA (HiLadder, Hyalose, LLC).

[0096] El rendimiento del heparosano en el medio gastado se comprobó mediante ensayos de carbazol para el ácido urónico. El ensayo de carbazol es un ensayo químico espectrofotométrico que mide la cantidad de ácido urónico en la muestra a través de la producción de un color rosado; cada otro azúcar en la cadena heparosana es un ácido glucurónico. El límite de detección del ensayo de carbazol es de aproximadamente 5 microgramos de polímero.

[0097] La identidad del polímero como heparosano se ensayó por digestión de liasa de heparina III (*Pedobacter)*;

cualquier polisacárido de tipo heparina se escindirá en pequeños fragmentos (oligosacáridos) que se extienden en el frente del colorante en un gel de agarosa y no se tiñen bien con Stains-All.

[0098] Varias ventajas del heparosano descrito actualmente se describen en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3:

Comparación de heparosanos y biomateriales quirúrgicos existentes para usos de recubrimiento				
Variable clave	Diana de proyecto	Practica actual	Barrera asociada al procedimiento actual	Enfoques innovadores de concepto de la invención
Estabilidad de revestimiento	Larga duración (semanas-meses).	HA, heparina, albúmina sérica bovina (BSA) Carbono (C) lípidos (L)	Degradado por las enzimas naturales del cuerpo --- Arrojar desde la superficie	Use heparosano, un polímero que no se digiere enzimáticamente en el cuerpo humano.
Humectabilidad	Interactúa libremente con el agua.	BSA, HA, heparina, LC	--- hidrofóbico	Use un polímero de heparosano que le guste el agua.
Ensuciamiento, coagulación	La superficie no une proteínas o células.	HA, heparina BSA, C, L	Las células sanguíneas y los factores de coagulación se unen ---	Use un polímero de heparosano relativamente biológicamente inerte.
Transmisión de enfermedades	Cero riesgo de virus o priones animales.	HA [pollo], CG HA [bacteriano], PP, CHP	Riesgo potencial ---	Use heparosano no derivado de animales y derivado de bacterias.

Tabla 4:

Comparación de biomateriales heparosanos y existentes para aplicaciones de revestimiento de superficies				
Variable clave	**Diana de proyecto**	**Practica actual**	**Barrera asociada al procedimiento actual**	**Enfoques inovativos de conceptos inventivos**
Formación de gel semi-estable	Gel inyectable, blando, duradero (> 12-24 meses), pero no permanente.	Gel de hialuronano (HA) Gel de colágeno (CG) Partículas de plástico (PP) Partículas de hidroxiapatita de Ca (CHP)	Vida demasiado corta Aspecto granulado y vida útil demasiado larga Aspecto granulado, vida útil demasiado larga, y no se puede inyectar fácilmente	Use heparosano, un polímero que no se digiere enzimáticamente en el cuerpo humano, y no es un material duro y rugoso
Inmunogenicidad, alergenicidad	Sin generación de anticuerpos	HA [bacterial], PP, CHP HA [pollo], CG [bovino> humano]	--- Respuesta inmune o alérgica	Use polímero de heparosano que parece "humano" y no activa el sistema inmune
Infiltración	Reduce la adherencia y/o señalización celular.	HA PP, CHP CG	Proteínas y células se unen --- Las células se unen	Use polímero de heparosano que carece de dominios adhesivos conocidos o señales quimiotácticas
Transmisión de enfermedades	Cero riesgo de virus y/o priones humanos o animales.	HA [pollo], CG HA [bacteriano], PP, CHP	Riesgo potencial ---	Use heparosano no animal derivado bacterialmente
Compatible con Imágenes de Rayos X	No hay áreas opacas o marcadas.	HA, CG PP, CHP	--- Obscurece las imágenes	Use heparosano transparente por rayos X
Abundante recurso	Renovable y no demasiado costoso de producir.	CG [humano] HA, CHP, PP, CHP	Suministro de banco de tejidos limitado o cultivo de células derivado (costoso) ---	Use heparosano hecho por fermentación bacteriana

EJEMPLO 3

[0099] ***Producción de heparosano de peso molecular de mega-Dalton.*** Se realizó un análisis en gel de agarosa de polímero de heparosano de peso molecular ultra alto producido de acuerdo con el método del Ejemplo 2. El análisis en gel de agarosa (1X TAE, detección de Stains-All) mostrado en la Figura 2 demostró que la construcción del gen *PmHS1* recombinante transportado por plásmido de *P. multocida* tipo D en *E. coli* K5 **(Ec K5** + **pmHS1)** produjo un polímero de heparosano de MW muy alto (~1 a ~4,5 MDa; banda marcada con un *soporte)*. Como control negativo, el mismo huésped de *E. coli* con vector solo (**vector Ec K5** +) solo produjo un polímero de PM bajo (~50 kDa a ~100 kDa, marcado con una *flecha)*. **Std** = SelectHA MegaLadder/SelectHA HiLadder/Select HA LoLadder (Hyalose LLC) con bandas de arriba a abajo: 6100, 4570, 3050, 1510, 1090, 966, 572, 495, 310, 214, 110, 27 kDa (kDa = 1,000 Da; MDa = 1,000 kDa). Plásmidos: **Vector** = (pKK223-3); **PmHS1** = (pKK223-3/PmHS1).

EJEMPLO 4

[0100] ***Producción de heparosano mega-Dalton de peso molecular en E. coli BL21 (DE3).*** *E. coli* BL21 (DE3) [NEB], una cepa de *E. coli* con genética distinta de las cepas K5 y K12, se transformó con PmK1-3-3/gen optimizado PmHS1 (**P)** o pMAL-C4e/gen optimizado PmHS1 (**M)**, un plásmido de expresión que produce una proteína de maltosa vinculante proteína de fusión (MBP)-PmHS1. Los cultivos de los transformantes se indujeron con IPTG y luego se dejaron crecer durante la noche en LB (**LB)** o en un medio sintético (**Syn)**. El medio de cultivo se clarificó luego por centrifugación y el polímero de heparosano se concentró por precipitación con etanol. La identidad del polímero de heparosano se confirmó por digestión con liasa de heparina III **(+ LIASA).** El análisis en gel de agarosa (1X TAE, detección de Stains-All) mostrado en la Figura 3 demostró que la construcción del gen *PmHS1* recombinante transportado por plásmido de *P. multocida* tipo D en *E. coli* BL21 (DE3) produjo un polímero de heparosano de MW alto. (~2 a 6,8 MDa; extensión de la banda de alto MW marcada con un *soporte).* **Mega** =

SelectHA MegaLadder (Hyalose LLC) con bandas de arriba a abajo: 6100, 4570, 3050, 1510 kDa, **Std** = SelectHA HiLadder/SelectorHA LoLadder (Hyalose LLC) con bandas de arriba a abajo: 1510, 1090, 966, 572, 495, 310, 214, 110, 27 kDa (kDa = 1.000 Da; MDa = 1.000 kDa).

EJEMPLO 5

[0101] ***Producción de heparosano mega-Dalton de peso molecular en E. coli BL21 Express I^q.*** *E. coli* BL21Express I^q (NEB) se transformó con pMAL-C4E/gen optimizado PmHS1, un plásmido de expresión que produce una proteína de fusión MBP-PmHS1. Los cultivos de los transformantes se indujeron con IPTG y luego se cultivaron durante la noche en medios sintéticos. El medio de cultivo se clarificó por centrifugación y el polímero de heparosano se concentró por precipitación con etanol. La identidad del polímero de heparosano se confirmó por digestión del polímero (**INICIO)** con liasa de heparina III (**+ LIASA)**. El análisis en gel de agarosa (1X TAE, detección de Stains-All) mostrado en la Figura 4 demostró que la construcción del gen *PmHS1* recombinante optimizado genéticamente *transportado por plásmidos* (que codifica PmHS de *P. multocida* tipo D) en *E. coli* BL21 Express I^q produjo un polímero de heparosano de MW muy elevado (~2 a 6,8 MDa; banda marcada con un *soporte)*. **Mega =** SelectHA MegaLadder (Hyalose LLC) con bandas de arriba a abajo: 6100, 4570, 3050, 1510 kDa.

EJEMPLO 6

[0102] ***Efecto de deleción de la producción de heparosano en E. coli K5 en la producción de heparosano de peso molecular mega-Dalton.*** Los *genes kfiA, kfiB* y *kfiC* en *E. coli* K5 se eliminaron, y la cepa resultante (**K5**-) ya no produce el heparosano de 50-80 kDa normalmente producido por K5. La cepa K5- se transformó con PmK1-3-3/gen optimizado PmHS1 (**P)** o pMAL-C4e/gen optimizado PmHS1 (**M)**. Los cultivos de los transformantes se indujeron con IPTG y luego se cultivaron durante la noche en cualquiera de los LB. El medio de cultivo se clarificó por centrifugación y el polímero de heparosano se concentró por precipitación con etanol. La identidad del polímero de heparosano se confirmó por digestión con liasa de heparina III (**+ LIASA)**. El análisis de gel de agarosa (1X TAE, detección de Stains-All) mostrado en la Figura 5 demostró que la construcción del gen *PmHS1* optimizado genéticamente recombinante transportado por plásmido de *P. multocida* tipo D, expresado en *E. coli* K5 sin *kfiA, kfiB,* o genes *kfiC,* produjeron un polímero de heparosano de MW muy elevado (~2 MDa; banda marcada con un *paréntesis)*. **Std** = SelectHA MegaLadder/SelectHA HiLadder/SelectHA LoLadder (Hyalose LLC) con bandas de arriba a abajo: 6100, 4570, 3050, 1510, 1090, 966, 572, 495, 310, 214, 110, 27 kDa (kDa = 1,000 Da; MDa = 1,000 kDa).

[0103] Por lo tanto, los *genes kfiA, kfiB* y *kfiC* no están implicados en la producción de heparosano con MW ultra alto en *E. coli* K5.

REFERENCIAS

[0104]

1. Burg, K. J., Porter, S., y Kellam, J. F. (2000) Biomaterial developments for bone tissue engineering Biomaterials 21, 2347-2359

2. Luo, Y., Kirker, K. R., y Prestwich, G. D. (2000) Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery J Control Release 69, 169-184

3. Morra, M. (2005) Engineering of biomaterials surfaces by hyaluronan Biomacromolecules 6, 1205-1223

4. Olivier, V., Faucheux, N., y Hardouin, P. (2004) Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery Drug Discov Today 9, 803-811

5. Johl, S. S., y Burgett, R. A. (2006) Dermal filler agents: a practical review Curr Opin Ophthalmol 17, 471-479

6. Eppley, B. L., y Dadvand, B. (2006) Injectable soft-tissue fillers: clinical overview Plast Reconstr Surg 118, 98e-106e

7. Jordan, S. W., y Chaikof, E. L. (2007) Novel thromboresistant materials J Vase Surg 45 Suppl A, A104-115

8. DeAngelis, P. L. (2002) Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases Glycobiology 12, 9R-16R

9. DeAngelis, P. L. (2002) Evolution of glycosaminoglycans and their glycosyltransferases: Implications for the extracellular matrices of animals and the capsules of pathogenic bacteria Anatomical Record 268, 317-326

10. Jann, K., y Jann, B. (1992) Capsules of Escherichia coli, expression and biological significance Can J Microbiol 38, 705-710

11. Sugahara, K., y Kitagawa, H. (2002) Heparin and heparan sulfate biosynthesis IUBMB Life 54, 163-175

12. Esko, J. D., y Lindahl, U. (2001) Molecular diversity of heparan sulfate J Clin Invest 108, 169-173

13. Hardingham, T. E., y Fosang, A. J. (1992) Proteoglycans: many forms and many functions Faseb J 6, 861-870

14. Laurent, T. C., y Fraser, J. R. (1992) Hyaluronan Faseb J 6, 2397-2404

15. Toole, B. P. (2000) Hyaluronan is not just a goo! J Clin Invest 106, 335-336

16. DeAngelis, P. L., Gunay, N. S., Toida, T., Mao, W. J., and Linhardt, R. J. (2002) Identification of the capsular polysaccharides of Type D and F Pasteurella multocida as unmodified heparin and chondroitin, respectively Carbohydr Res 337, 1547-1552

17. Gorbet, M. B., y Sefton, M. V. (2004) Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes Biomaterials 25, 5681-5703

18. Ma, Z., Mao, Z., y Gao, C. (2007) Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering Colloids Surf B Biointerfaces

19. Massia, S. P., Holecko, M. M., y Ehteshami, G. R. (2004) In vitro assessment of bioactive coatings for neural implant applications J Biomed Mater Res A 68, 177-186

20. Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M., y Brown, R. M., Jr. (2007) The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications Biomacromolecules 8, 1-12

21. Chandy, T., y Sharma, C. P. (1990) Chitosan--as a biomaterial Biomater Artif Cells Artif Organs 18, 1-24

22. Allison, D. D., y Grande-Allen, K. J. (2006) Review. Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool Tissue Eng 12, 2131-2140

23. McKenzie, E., Young, K., Hircock, M., Bennett, J., Bhaman, M., Felix, R., Turner, P., Stamps, A., McMillan, D., Saville, G., Ng, S., Mason, S., Snell, D., Schofield, D., Gong, H., Townsend, R., Gallagher, J., Page, M., Parekh, R., y Stubberfield, C. (2003) Biochemical characterization of the active heterodimer form of human heparanase (Hpa1) protein expressed in insect cells Biochem J 373, 423-435

24. Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Bitan, M., Pappo, O., Peretz, T., Michal, I., Spector, L., y Pecker, I. (1999) Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis Nat Med 5, 793-802

25. Pikas, D. S., Li, J. P., Vlodavsky, I., y Lindahl, U. (1998) Substrate specificity of heparanases from human hepatoma and platelets J Biol Chem 273, 18770-18777

26. Gong, F., Jemth, P., Escobar Galvis, M. L., Vlodavsky, I., Horner, A., Lindahl, U., y Li, J. P. (2003) Processing of macromolecular heparin by heparanase J Biol Chem 278, 35152-35158

27. Balazs, E. A. (2004) Viscosupplementation for treatment of osteoarthritis: from initial discovery to current status and results Surg Technol Int 12, 278-289

28. Goa, K. L., y Benfield, P. (1994) Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing Drugs 47, 536-566

29. Stern, R. (2004) Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway Eur J Cell Biol 83, 317-325

30. DeAngelis, P. L., y White, C. L. (2002) Identification and molecular cloning of a heparosan synthase from Pasteurella multocida type D J Biol Chem 277, 7209-7213

31. Barzu, T., van Rijn, J. L., Petitou, M., Tobelem, G., y Caen, J. P. (1987) Heparin degradation in the endothelial cells Thromb Res 47, 601-609

32. Vann, W. F., Schmidt, M. A., Jann, B., y Jann, K. (1981) The structure of the capsular polysaccharide (K5 antigen) of urinary-tract-infective Escherichia coli 010:K5:H4. A polymer similar to desulfo-heparin Eur J Biochem 116, 359-364

33. Capila, I., y Linhardt, R. J. (2002) Heparin-protein interactions Angew Chem Int Ed Engl 41, 391-412

34. Tammi, M. I., Day, A. J., y Turley, E. A. (2002) Hyaluronan and homeostasis: a balancing act J Biol Chem 277, 4581-4584

35. Stern, R., Asari, A. A., y Sugahara, K. N. (2006) Hyaluronan fragments: an information-rich system Eur J Cell Biol 85, 699-715

36. Powell, J. D., y Horton, M. R. (2005) Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal Immunol Res 31, 207-218

37. West, D. C., y Kumar, S. (1989) Hyaluronan and angiogenesis Ciba Found Symp 143, 187-201; discussion 201-187, 281-185

38. Trochon, V., Mabilat, C., Bertrand, P., Legrand, Y., Smadja-Joffe, F., Soria, C., Delpech, B., y Lu, H. (1996) Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro Int J Cancer 66, 664-668

39. Scheibner, K. A., Lutz, M. A., Boodoo, S., Fenton, M. J., Powell, J. D., y Horton, M. R. (2006) Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2 J Immunol 177, 1272-1281

40. Hodson, N., Griffiths, G., Cook, N., Pourhossein, M., Gottfridson, E., Lind, T., Lidholt, K., y Roberts, I. S. (2000) Identification that KfiA, a protein essential for the biosynthesis of the Escherichia coli K5 capsular polysaccharide, is an alpha -UDP-GlcNAc glycosyltransferase. The formation of a membrane-associated K5 biosynthetic complex requires KfiA, KfiB, and KfiC J Biol Chem 275, 27311-27315

41. Monheit, G. D., y Coleman, K. M. (2006) Hyaluronic acid fillers Dermatol Ther 19, 141-150

42. Li, M., Timmons, R. B., y Kinsel, G. R. (2005) Radio frequency plasma polymer coatings for affinity capture MALDI mass spectrometry Anal Chem 77, 350-353

43. Su, S. H., Chao, R. Y., Landau, C. L., Nelson, K. D., Timmons, R. B., Meidell, R. S., y Eberhart, R. C. (2003) Expandable bioresorbable endovascular stent. I. Fabrication and properties Ann Biomed Eng 31, 667-677

44. Bitter, T., y Muir, H. M. (1962) A modified uronic acid carbazole reaction Anal Biochem 4, 330-334

45. Lee, H. G., y Cowman, M. K. (1994) An agarose gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution Anal Biochem 219, 278-287

46. Tracy, B. S., Avci, F. Y., Linhardt, R. J., y DeAngelis, P. L. (2007) Acceptor specificity of the Pasteurella hyaluronan and chondroitin synthases and production of chimeric glycosaminoglycans J Biol Chem 282, 337-344

47. Deangelis PL, White CL. (2004) Identification of a distinct, cryptic heparosan synthase from Pasteurella multocida types A, D, and F. J Bacteriol. 186, 8529-32.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0105]

<110> DeAngelis, Paul Pummill, Philip Visser, Regina

<120> POLÍMEROS DE HEPAROSANO DE ALTO PESO MOLECULAR Y MÉTODOS DE PRODUCCIÓN Y USO DE LOS MISMOS

<130> 45992.042wo

<150> 61/617,952
<151> 2012-03-30

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1851
<212> ADN
<213> Pasteurella multocida

<400> 1

```
atgagcttat ttaaacgtgc tactgagcta tttaagtcag gaaactataa agatgcacta      60
actctatatg aaaatatagc taaaatttat ggttcagaaa gccttgttaa atataatatt     120
gatatatgta aaaaaaatat aacacaatca aaaagtaata aaatagaaga agataatatt     180
tctggagaaa acaaattttc agtatcaata aaagatctat ataacgaaat aagcaatagt     240
gaattaggga ttacaaaaga aagactagga gcccccccctc tagtcagtat tataatgact    300
tctcataata cagaaaaatt cattgaagcc tcaattaatt cactattatt gcaaacatac     360
aataacttag aagttatcgt tgtagatgat tatagcacag ataaaacatt tcagatcgca     420
tccagaatag caaactctac aagtaaagta aaaacattcc gattaaactc aaatctaggg     480
acatactttg cgaaaaatac aggaatttta aagtctaaag gagatattat tttctttcag     540
gatagcgatg atgtatgtca ccatgaaaga atcgaaagat gtgttaatgc attattatcg     600
aataaagata atatagctgt tagatgtgca tattctagaa taaatctaga aacacaaaat     660
ataataaaag ttaatgataa taaatacaaa ttaggattaa taactttagg cgtttataga     720
aaagtattta atgaaattgg ttttttaac tgcacaacca aagcatcgga tgatgaattt      780
tatcatagaa taattaaata ctatggtaaa aataggataa ataacttatt tctaccactg     840
tattataaca caatgcgtga agattcatta ttttctgata tggttgagtg ggtagatgaa     900
aataatataa agcaaaaaac ctctgatgct agacaaaatt atctccatga attccaaaaa     960
atacacaatg aaaggaaatt aaatgaatta aaagagattt ttagctttcc tagaattcat    1020
gacgccttac ctatatcaaa agaaatgagt aagctcagca accctaaaat tcctgtttat    1080
ataaatatat gctcaatacc ttcaagaata aaacaacttc aatacactat tggagtacta    1140
aaaaaccaat gcgatcattt tcatatttat cttgatggat atccagaagt acctgatttt    1200
ataaaaaaac tagggaataa agcgaccgtt attaattgtc aaaacaaaaa tgagtctatt    1260
agagataatg gaaagtttat tctattagaa aaacttataa aggaaaataa agatggatat    1320
tatataactt gtgatgatga tatccggtat cctgctgact acacaaacac tatgataaaa    1380
aaaattaata aatacaatga taaagcagca attggattac atggtgttat attcccaagt    1440
agagtcaaca agtatttttc atcagacaga attgtctata attttcaaaa acctttagaa    1500
aatgatactg ctgtaaatat attaggaact ggaactgttg cctttagagt atctattttt    1560
aataaatttt ctctatctga ttttgagcat cctggcatgg tagatatcta tttttctata    1620
ctatgtaaga aaaacaatat actccaagtt tgtatatcac gaccatcgaa ttggctaaca    1680
gaagataaca aaaacactga gaccttattt catgaattcc aaaatagaga tgaaatacaa    1740
agtaaactca ttatttcaaa caacccttgg ggatactcaa gtatatatcc actattaaat    1800
aataatgcta attattctga acttattccg tgtttatctt tttataacga g             1851
```

<210> 2
<211> 615
<212> PRT
<213> Pasteurella multocida

<400> 2

```
Met Ser Leu Phe Lys Arg Ala Thr Glu Leu Phe Lys Ser Gly Asn Tyr
1               5                   10                  15

Lys Asp Ala Leu Thr Leu Tyr Glu Asn Ile Ala Lys Ile Tyr Gly Ser
            20                  25                  30

Glu Ser Leu Val Lys Tyr Asn Ile Asp Ile Cys Lys Lys Asn Ile Thr
        35                  40                  45

Gln Ser Lys Ser Asn Lys Ile Glu Glu Asp Asn Ile Ser Gly Glu Asn
    50                  55                  60

Lys Phe Ser Val Ser Ile Lys Asp Leu Tyr Asn Glu Ile Ser Asn Ser
65                  70                  75                  80

Glu Leu Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Gly Ala Pro Pro Leu Val Ser
                85                  90                  95

Ile Ile Met Thr Ser His Asn Thr Glu Lys Phe Ile Glu Ala Ser Ile
            100                 105                 110

Asn Ser Leu Leu Leu Gln Thr Tyr Asn Leu Glu Val Ile Val Val Asp
        115                 120                 125
```

Asp Tyr Ser Thr Asp Lys Thr Phe Gln Ile Ala Ser Arg Ile Ala Asn
130 135 140

Ser Thr Ser Lys Val Lys Thr Phe Arg Leu Asn Ser Asn Leu Gly Thr
145 150 155 160

Tyr Phe Ala Lys Asn Thr Gly Ile Leu Lys Ser Lys Gly Asp Ile Ile
165 170 175

Phe Phe Gln Ser Asp Asp Val Cys His His Glu Arg Ile Glu Arg Cys
180 185 190

Val Asn Ala Leu Leu Ser Asn Lys Asp Asn Ile Ala Val Arg Cys Ala
195 200 205

Tyr Ser Arg Ile Asn Leu Glu Thr Gln Asn Ile Ile Lys Val Asn Asp
210 215 220

Asn Lys Tyr Lys Leu Gly Leu Ile Thr Leu Gly Val Tyr Arg Lys Val
225 230 235 240

Phe Asn Glu Ile Gly Phe Phe Asn Cys Thr Thr Lys Ala Ser Asp Asp
245 250 255

Glu Phe Tyr His Arg Ile Ile Lys Tyr Tyr Gly Lys Asn Arg Ile Asn
260 265 270

Asn Leu Phe Leu Pro Leu Tyr Tyr Asn Thr Met Arg Glu Asp Ser Leu
275 280 285

Phe Ser Asp Met Val Glu Trp Val Asp Glu Asn Asn Ile Lys Gln Lys
290 295 300

Thr Ser Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Leu His Glu Phe Gln Lys Ile His
305 310 315 320

Asn Glu Arg Lys Leu Asn Glu Leu Lys Glu Ile Phe Ser Phe Pro Arg
325 330 335

Ile His Asp Ala Leu Pro Ile Ser Lys Glu Met Ser Lys Leu Ser Asn
340 345 350

Pro Lys Ile Pro Val Tyr Ile Asn Ile Cys Ser Ile Pro Ser Arg Ile
355 360 365

Lys Gln Leu Gln Tyr Thr Ile Gly Val Leu Lys Asn Gln Cys Asp His
370 375 380

Phe His Ile Tyr Leu Asp Gly Tyr Pro Glu Val Pro Asp Phe Ile Lys
385 390 395 400

Lys Leu Gly Asn Lys Ala Thr Val Ile Asn Cys Gln Asn Lys Asn Glu
405 410 415

Ser Ile Arg Asp Asn Gly Lys Phe Ile Leu Leu Glu Lys Leu Ile Lys
420 425 430

Glu Asn Lys Asp Gly Tyr Tyr Ile Thr Cys Asp Asp Asp Ile Arg Tyr
435 440 445

Pro Ala Asp Tyr Thr Asn Thr Met Ile Lys Lys Ile Asn Lys Tyr Asn
450 455 460

Asp Lys Ala Ala Ile Gly Leu His Gly Val Ile Phe Pro Ser Arg Val
465 470 475 480

Asn Lys Tyr Phe Ser Ser Asp Arg Ile Val Tyr Asn Phe Gln Lys Pro
485 490 495

Leu Glu Asn Asp Thr Ala Val Asn Ile Leu Gly Thr Gly Thr Val Ala
500 505 510

Phe Arg Val Ser Ile Phe Asn Lys Phe Ser Leu Ser Asp Phe Glu His
515 520 525

Pro Gly Met Val Asp Ile Tyr Phe Ser Ile Leu Cys Lys Lys Asn Asn
530 535 540

Ile Leu Gln Val Cys Ile Ser Arg Pro Ser Asn Trp Leu Thr Glu Asp
545 550 555 560

Asn Lys Asn Thr Glu Thr Leu Phe His Glu Phe Gln Asn Arg Asp Glu
565 570 575

Ile Gln Ser Lys Leu Ile Ile Ser Asn Asn Pro Trp Gly Tyr Ser Ser
580 585 590

Ile Tyr Pro Leu Leu Asn Asn Asn Ala Asn Tyr Ser Glu Leu Ile Pro
595 600 605

Cys Leu Ser Phe Tyr Asn Glu
610 615

<210> 3

<211> 1940
<212> ADN
<213> Pasteurella multocida

<400> 3

aacaggggat aaggtcagta aatttaggat gatttttgac taatggataa atacttgaat 60
atccccatgg accgttttcc atgatcagct gagtttgttg ctcatcattg tctcgatatt 120
gatgatagag tgtttcgctg tctctattat cttccgttag ccagtttgct ggtcttgaaa 180
tacaaatctg aagaatatta tttttcttac acaagagaga gaaatagata tcagccatgc 240
ctgaatgggt aaagtcagaa agagaaaatt gattaaagag actgactcta aagctaacag 300
ttcctgtacc taatacattg accgctttgt ctttttccag aggtttatag aagctatata 360
ccagtctatc cgccgaaaaa tatttggtca ttctacttgg aaagagaatg ccgtgtaaac 420
caataaccgc tttatcatcg tattcattca gcttcttgat catcgtattg atgtaatcgc 480
ttggatagat aatgtcatca tcacaggtta tataatatcc atcttgattt ttttcaatca 540
actcttccag taaaatgaat ttgccattat ctctaatgga gttatcttta tctttgcaat 600
gaacaacggt tgctttatta cctaaatttt ttatgaagtc agggatttct acatagccat 660
caagataaat atgaaaatga tcacattgat tttttagtat gccgataata cgtcgtaatt 720
gcgctattct tgagggaata gaacaaatat tgatataaac aggaatctta ggattggaca 780
acttactcat ttcttgtggt actggtaagg catcgtaaat acgagggaat tgaaaaagat 840
ttttgaaatc atgtgaggca gtttcgttat gcatcgcttg aaacagggtt gcataatgtt 900
gtctggtatc agacattttc tgtattatgt tatgattgtc tatccattca accatatcag 960
taaataaaga gttttctctc attgtgttgt agtataacgg caagagtaaa ttttttattt 1020
tttcttttcc ataatatttc gcaattctat gaaaaaactc atcatctgag cctttagtcg 1080
tacaattgaa gaaaccaatt tcttgaaata cttttctgtg catacccaag gttataaaac 1140
ctaatctata atccatatta ttgactttaa tgatatgttg tgtttctggt gctagtcttg 1200
agtatgcaca acgaacagca atagtttctt tattagctaa taatatattt acacatcttt 1260
ctattctttc atgatgacat acatcatcac tatcttgaaa gaaaataatg tcacctttag 1320
attttaatat gcctgtattt ttcgcaaagt aagttcctag gtttgaattt aatctaaata 1380
ctctgacttt gcttgttgta ttcgctattc tcgaggcaat ttcaaatgta ttatccgagc 1440
tatcatcatc tacaataata atttctatgt ttttatatgt ttgtaacaat aatgaattaa 1500
tagaagcttc gataaattgc gctgtattgt gagatgtcat gataatactg actaatggat 1560
ttacgctgtt ggtttctttg actaacccta aatcactttt agcgacttca ttatataaat 1620
ctgttattga tgttgtttgc ttatcttttt ctagctttgc ttctaatgct tgattatagg 1680
tatatatttt ttcaaattct tgcagaacca attggagttg ttttaataaa agtttatttt 1740
cgttttcaag ggatgcggat agcggatgtt tactgtcctg ttttgccaat aaagtttgtt 1800

gagaaataat gtctttgttt aaagttgttt ttagactatc aattttattt tgaaaggtgt 1860

tgagttcatt ttctttttca tgttgggggg gatttttagt catttgtttt tgagtcatct 1920

ctttttttct cttcatttca 1940

<210> 4
<211> 651
<212> PRT
<213> Pasteurella multocida

<400> 4

Met Lys Arg Lys Lys Glu Met Thr Gln Lys Gln Met Thr Lys Asn Pro
1 5 10 15

Pro Gln His Glu Lys Glu Asn Glu Leu Asn Thr Phe Gln Asn Lys Ile
20 25 30

Asp Ser Leu Lys Thr Thr Leu Asn Lys Asp Ile Ile Ser Gln Gln Thr
35 40 45

Leu Leu Ala Lys Gln Asp Ser Lys His Pro Leu Ser Ala Ser Leu Glu
50 55 60

Asn Glu Asn Lys Leu Leu Leu Lys Gln Leu Gln Leu Val Leu Gln Glu
65 70 75 80

Phe Glu Lys Ile Tyr Thr Tyr Asn Gln Ala Leu Glu Ala Lys Leu Glu
85 90 95

Lys Asp Lys Gln Thr Thr Ser Ile Thr Asp Leu Tyr Asn Glu Val Ala
100 105 110

Lys Ser Asp Leu Gly Leu Val Lys Glu Thr Asn Ser Val Asn Pro Leu
115 120 125

Val Ser Ile Ile Met Thr Ser His Asn Thr Ala Gln Phe Ile Glu Ala
130 135 140

Ser Ile Asn Ser Leu Leu Leu Gln Thr Tyr Lys Asn Ile Glu Ile Ile
145 150 155 160

Ile Val Asp Asp Asp Ser Ser Asp Asn Thr Phe Glu Ile Ala Ser Arg
165 170 175

Ile Ala Asn Thr Thr Ser Lys Val Arg Val Phe Arg Leu Asn Ser Asn
180 185 190

Leu Gly Thr Tyr Phe Ala Lys Asn Thr Gly Ile Leu Lys Ser Lys Gly
195 200 205

Asp Ile Ile Phe Phe Gln Asp Ser Asp Asp Val Cys His His Glu Arg
210 215 220

Ile Glu Arg Cys Val Asn Ile Leu Leu Ala Asn Lys Glu Thr Ile Ala
225 230 235 240

Val Arg Cys Ala Tyr Ser Arg Leu Ala Pro Glu Thr Gln His Ile Ile
245 250 255

Lys Val Asn Asn Met Asp Tyr Arg Leu Gly Phe Ile Thr Leu Gly Met
260 265 270

His Arg Lys Val Phe Gln Glu Ile Gly Phe Phe Asn Cys Thr Thr Lys
275 280 285

Gly Ser Asp Asp Glu Phe Phe His Arg Ile Ala Lys Tyr Tyr Gly Lys
290 295 300

Glu Lys Ile Lys Asn Leu Leu Leu Pro Leu Tyr Tyr Asn Thr Met Arg
305 310 315 320

Glu Asn Ser Leu Phe Thr Asp Met Val Glu Trp Ile Asp Asn His Asn
325 330 335

Ile Ile Gln Lys Met Ser Asp Thr Arg Gln His Tyr Ala Thr Leu Phe
340 345 350

Gln Ala Met His Asn Glu Thr Ala Ser His Asp Phe Lys Asn Leu Phe
355 360 365

Gln Phe Pro Arg Ile Tyr Asp Ala Leu Pro Val Pro Gln Glu Met Ser
370 375 380

Lys Leu Ser Asn Pro Lys Ile Pro Val Tyr Ile Asn Ile Cys Ser Ile
385 390 395 400

Pro Ser Arg Ile Ala Gln Leu Arg Arg Ile Ile Gly Ile Leu Lys Asn
405 410 415

Gln Cys Asp His Phe His Ile Tyr Leu Asp Gly Tyr Val Glu Ile Pro
420 425 430

Asp Phe Ile Lys Asn Leu Gly Asn Lys Ala Thr Val Val His Cys Lys
435 440 445

Asp Lys Asp Asn Ser Ile Arg Asp Asn Gly Lys Phe Ile Leu Leu Glu
450 455 460

Glu Leu Ile Glu Lys Asn Gln Asp Gly Tyr Tyr Ile Thr Cys Asp Asp
465 470 475 480

Asp Ile Ile Tyr Pro Ser Asp Tyr Ile Asn Thr Met Ile Lys Lys Leu
485 490 495

Asn Glu Tyr Asp Asp Lys Ala Val Ile Gly Leu His Gly Ile Leu Phe
500 505 510

Pro Ser Arg Met Thr Lys Tyr Phe Ser Ala Asp Arg Leu Val Tyr Ser
515 520 525

Phe Tyr Lys Pro Leu Glu Lys Asp Lys Ala Val Asn Val Leu Gly Thr
530 535 540

Gly Thr Val Ser Phe Arg Val Ser Leu Phe Asn Gln Phe Ser Leu Ser
545 550 555 560

Asp Phe Thr His Ser Gly Met Ala Asp Ile Tyr Phe Ser Leu Leu Cys
565 570 575

Lys Lys Asn Asn Ile Leu Gln Ile Cys Ile Ser Arg Pro Ala Asn Trp
580 585 590

Leu Thr Glu Asp Asn Arg Asp Ser Glu Thr Leu Tyr His Gln Tyr Arg
595 600 605

Asp Asn Asp Glu Gln Gln Thr Gln Leu Ile Met Glu Asn Gly Pro Trp
610 615 620

Gly Tyr Ser Ser Ile Tyr Pro Leu Val Lys Asn His Pro Lys Phe Thr
625 630 635 640

Asp Leu Ile Pro Cys Leu Pro Phe Tyr Phe Leu
645 650

<210> 5
<211> 1854
<212> ADN
<213> Pasteurella multocida

<400> 5

atgagcttat ttaaacgtgc tactgagcta tttaagtcag gaaactataa agatgcacta 60

actctatatg aaaatatagc taaaatttat ggttcagaaa gccttgttaa atataatatt 120

<210> 6
<211> 617
<212> PRT
<213> Pasteurella multocida

<400> 6

Met Ser Leu Phe Lys Arg Ala Thr Glu Leu Phe Lys Ser Gly Asn Tyr
1 5 10 15

Lys Asp Ala Leu Thr Leu Tyr Glu Asn Ile Ala Lys Ile Tyr Gly Ser
20 25 30

Glu Ser Leu Val Lys Tyr Asn Ile Asp Ile Cys Lys Lys Asn Ile Thr
35 40 45

Gln Ser Lys Ser Asn Lys Ile Glu Glu Asp Asn Ile Ser Gly Glu Asn
50 55 60

Lys Phe Ser Val Ser Ile Lys Asp Leu Tyr Asn Glu Ile Ser Asn Ser
65 70 75 80

Glu Leu Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Gly Ala Pro Pro Leu Val Ser
85 90 95

Ile Ile Met Thr Ser His Asn Thr Glu Lys Phe Ile Glu Ala Ser Ile
100 105 110

Asn Ser Leu Leu Leu Gln Thr Tyr Asn Asn Leu Glu Val Ile Val Val
115 120 125

Asp Asp Tyr Ser Thr Asp Lys Thr Phe Gln Ile Ala Ser Arg Ile Ala
130 135 140

Asn Ser Thr Ser Lys Val Lys Thr Phe Arg Leu Asn Ser Asn Leu Gly
145 150 155 160

Thr Tyr Phe Ala Lys Asn Thr Gly Ile Leu Lys Ser Lys Gly Asp Ile
165 170 175

Ile Phe Phe Gln Asp Ser Asp Asp Val Cys His His Glu Arg Ile Glu
180 185 190

Arg Cys Val Asn Ala Leu Leu Ser Asn Lys Asp Asn Ile Ala Val Arg
195 200 205

Cys Ala Tyr Ser Arg Ile Asn Leu Glu Thr Gln Asn Ile Ile Lys Val
210 215 220

Asn Asp Asn Lys Tyr Lys Leu Gly Leu Ile Thr Leu Gly Val Tyr Arg
225 230 235 240

Lys Val Phe Asn Glu Ile Gly Phe Phe Asn Cys Thr Thr Lys Ala Ser
245 250 255

Asp Asp Glu Phe Tyr His Arg Ile Ile Lys Tyr Tyr Gly Lys Asn Arg
260 265 270

Ile Asn Asn Leu Phe Leu Pro Leu Tyr Tyr Asn Thr Met Arg Glu Asp
275 280 285

Ser Leu Phe Ser Asp Met Val Glu Trp Val Asp Glu Asn Asn Ile Lys
290 295 300

Gln Lys Thr Ser Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Leu His Glu Phe Gln Lys
305 310 315 320

Ile His Asn Glu Arg Lys Leu Asn Glu Leu Lys Glu Ile Phe Ser Phe
325 330 335

Pro Arg Ile His Asp Ala Leu Pro Ile Ser Lys Glu Met Ser Lys Leu
340 345 350

Ser Asn Pro Lys Ile Pro Val Tyr Ile Asn Ile Cys Ser Ile Pro Ser
355 360 365

Arg Ile Lys Gln Leu Gln Tyr Thr Ile Gly Val Leu Lys Asn Gln Cys
370 375 380

Asp His Phe His Ile Tyr Leu Asp Gly Tyr Pro Glu Val Pro Asp Phe
385 390 395 400

Ile Lys Lys Leu Gly Asn Lys Ala Thr Val Ile Asn Cys Gln Asn Lys
405 410 415

Asn Glu Ser Ile Arg Asp Asn Gly Lys Phe Ile Leu Leu Glu Lys Leu
420 425 430

Ile Lys Glu Asn Lys Asp Gly Tyr Tyr Ile Thr Cys Asp Asp Asp Ile
435 440 445

Arg Tyr Pro Ala Asp Tyr Ile Asn Thr Met Ile Lys Lys Ile Asn Lys
450 455 460

Tyr Asn Asp Lys Ala Ala Ile Gly Leu His Gly Val Ile Phe Pro Ser
465 470 475 480

Arg Val Asn Lys Tyr Phe Ser Ser Asp Arg Ile Val Tyr Asn Phe Gln
485 490 495

Lys Pro Leu Glu Asn Asp Thr Ala Val Asn Ile Leu Gly Thr Gly Thr
500 505 510

Val Ala Phe Arg Val Ser Ile Phe Asn Lys Phe Ser Leu Ser Asp Phe
515 520 525

Glu His Pro Gly Met Val Asp Ile Tyr Phe Ser Ile Leu Cys Lys Lys
530 535 540

Asn Asn Ile Leu Gln Val Cys Ile Ser Arg Pro Ser Asn Trp Leu Thr
545 550 555 560

Glu Asp Asn Lys Asn Thr Glu Thr Leu Phe His Glu Phe Gln Asn Arg
565 570 575

Asp Glu Ile Gln Ser Lys Leu Ile Ile Ser Asn Asn Pro Trp Gly Tyr
580 585 590

Ser Ser Ile Tyr Pro Leu Leu Asn Asn Asn Ala Asn Tyr Ser Glu Leu
595 600 605

Ile Pro Cys Leu Ser Phe Tyr Asn Glu
610 615

<210> 7
<211> 565
<212> PRT
<213> Pasteurella multocida

<400> 7

Met Ser Leu Phe Lys Arg Ala Thr Glu Leu Phe Lys Ser Gly Asn Tyr
1 5 10 15

Lys Asp Ala Leu Thr Leu Tyr Glu Asn Ile Ala Lys Ile Tyr Gly Ser
20 25 30

Glu Ser Leu Val Lys Tyr Asn Ile Asp Ile Cys Lys Lys Asn Ile Thr
35 40 45

Gln Ser Lys Ser Asn Lys Ile Glu Glu Asp Asn Ile Ser Gly Glu Asn
50 55 60

Lys Phe Ser Val Ser Ile Lys Asp Leu Tyr Asn Glu Ile Ser Asn Ser
65 70 75 80

Glu Leu Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Gly Ala Pro Pro Leu Val Ser
85 90 95

Ile Ile Met Thr Ser His Asn Thr Glu Lys Phe Ile Glu Ala Ser Ile
100 105 110

Asn Ser Leu Leu Leu Gln Thr Tyr Asn Leu Glu Val Ile Val Val Asp
115 120 125

Asp Tyr Ser Thr Asp Lys Thr Phe Gln Ile Ala Ser Arg Ile Ala Asn
130 135 140

Ser Thr Ser Lys Val Lys Thr Phe Arg Leu Asn Ser Asn Leu Gly Thr
145 150 155 160

Tyr Phe Ala Lys Asn Thr Gly Ile Leu Lys Ser Lys Gly Asp Ile Ile
165 170 175

Phe Phe Gln Ser Asp Asp Val Cys His His Glu Arg Ile Glu Arg Cys
180 185 190

Val Asn Ala Leu Leu Ser Asn Lys Asp Asn Ile Ala Val Arg Cys Ala
195 200 205

Tyr Ser Arg Ile Asn Leu Glu Thr Gln Asn Ile Ile Lys Val Asn Asp
210 215 220

Asn Lys Tyr Lys Leu Gly Leu Ile Thr Leu Gly Val Tyr Arg Lys Val
225 230 235 240

Phe Asn Glu Ile Gly Phe Phe Asn Cys Thr Thr Lys Ala Ser Asp Asp
245 250 255

Glu Phe Tyr His Arg Ile Ile Lys Tyr Tyr Gly Lys Asn Arg Ile Asn
260 265 270

Asn Leu Phe Leu Pro Leu Tyr Tyr Asn Thr Met Arg Glu Asp Ser Leu
275 280 285

Phe Ser Asp Met Val Glu Trp Val Asp Glu Asn Asn Ile Lys Gln Lys
290 295 300

Thr Ser Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Leu His Glu Phe Gln Lys Ile His
305 310 315 320

Asn Glu Arg Lys Leu Asn Glu Leu Lys Glu Ile Phe Ser Phe Pro Arg
325 330 335

Ile His Asp Ala Leu Pro Ile Ser Lys Glu Met Ser Lys Leu Ser Asn
340 345 350

Pro Lys Ile Pro Val Tyr Ile Asn Ile Cys Ser Ile Pro Ser Arg Ile
355 360 365

Lys Gln Leu Gln Tyr Thr Ile Gly Val Leu Lys Asn Gln Cys Asp His
370 375 380

Phe His Ile Tyr Leu Asp Gly Tyr Pro Glu Val Pro Asp Phe Ile Lys
385 390 395 400

Lys Leu Gly Asn Lys Ala Thr Val Ile Asn Cys Gln Asn Lys Asn Glu
405 410 415

Ser Ile Arg Asp Asn Gly Lys Phe Ile Leu Leu Glu Lys Leu Ile Lys
420 425 430

Glu Asn Lys Asp Gly Tyr Tyr Ile Thr Cys Asp Asp Asp Ile Arg Tyr
435 440 445

Pro Ala Asp Tyr Thr Asn Thr Met Ile Lys Lys Ile Asn Lys Tyr Asn
450 455 460

Asp Lys Ala Ala Ile Gly Leu His Gly Val Ile Phe Pro Ser Arg Val
465 470 475 480

Asn Lys Tyr Phe Ser Ser Asp Arg Ile Val Tyr Asn Phe Gln Lys Pro
485 490 495

Leu Glu Asn Asp Thr Ala Val Asn Ile Leu Gly Thr Gly Thr Val Ala
500 505 510

Phe Arg Val Ser Ile Phe Asn Lys Phe Ser Leu Ser Asp Phe Glu His
515 520 525

Pro Gly Met Val Asp Ile Tyr Phe Ser Ile Leu Cys Lys Lys Asn Asn
530 535 540

Ile Leu Gln Val Cys Ile Ser Arg Pro Ser Asn Trp Leu Thr Glu Asp
545 550 555 560

Asn Lys Asn Thr Glu
565

<210> 8
<211> 538
<212> PRT
<213> Pasteurella multocida

<400> 8

Ser Asn Ser Glu Leu Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Gly Ala Pro Pro
1 5 10 15

Leu Val Ser Ile Ile Met Thr Ser His Asn Thr Glu Lys Phe Ile Glu
20 25 30

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

Val Val Asp Asp Tyr Ser Thr Asp Lys Thr Phe Gln Ile Ala Ser Arg
50 55 60

Ile Ala Asn Ser Thr Ser Lys Val Lys Thr Phe Arg Leu Asn Ser Asn
65 70 75 80

Leu Gly Thr Tyr Phe Ala Lys Asn Thr Gly Ile Leu Lys Ser Lys Gly
85 90 95

Asp Ile Ile Phe Phe Gln Ser Asp Asp Val Cys His His Glu Arg Ile
100 105 110

Glu Arg Cys Val Asn Ala Leu Leu Ser Asn Lys Asp Asn Ile Ala Val
115 120 125

Arg Cys Ala Tyr Ser Arg Ile Asn Leu Glu Thr Gln Asn Ile Ile Lys
130 135 140

Val Asn Asp Asn Lys Tyr Lys Leu Gly Leu Ile Thr Leu Gly Val Tyr
145 150 155 160

Arg Lys Val Phe Asn Glu Ile Gly Phe Phe Asn Cys Thr Thr Lys Ala
165 170 175

Ser Asp Asp Glu Phe Tyr His Arg Ile Ile Lys Tyr Tyr Gly Lys Asn
180 185 190

Arg Ile Asn Asn Leu Phe Leu Pro Leu Tyr Tyr Asn Thr Met Arg Glu
195 200 205

Asp Ser Leu Phe Ser Asp Met Val Glu Trp Val Asp Glu Asn Asn Ile
210 215 220

Lys Gln Lys Thr Ser Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Leu His Glu Phe Gln
225 230 235 240

Lys Ile His Asn Glu Arg Lys Leu Asn Glu Leu Lys Glu Ile Phe Ser

245 250 255

Phe Pro Arg Ile His Asp Ala Leu Pro Ile Ser Lys Glu Met Ser Lys
260 265 270

Leu Ser Asn Pro Lys Ile Pro Val Tyr Ile Asn Ile Cys Ser Ile Pro
275 280 285

Ser Arg Ile Lys Gln Leu Gln Tyr Thr Ile Gly Val Leu Lys Asn Gln
290 295 300

Cys Asp His Phe His Ile Tyr Leu Asp Gly Tyr Pro Glu Val Pro Asp
305 310 315 320

Phe Ile Lys Lys Leu Gly Asn Lys Ala Thr Val Ile Asn Cys Gln Asn
325 330 335

Lys Asn Glu Ser Ile Arg Asp Asn Gly Lys Phe Ile Leu Leu Glu Lys
340 345 350

Leu Ile Lys Glu Asn Lys Asp Gly Tyr Tyr Ile Thr Cys Asp Asp Asp
355 360 365

Ile Arg Tyr Pro Ala Asp Tyr Thr Asn Thr Met Ile Lys Lys Ile Asn
370 375 380

Lys Tyr Asn Asp Lys Ala Ala Ile Gly Leu His Gly Val Ile Phe Pro
385 390 395 400

Ser Arg Val Asn Lys Tyr Phe Ser Ser Asp Arg Ile Val Tyr Asn Phe
405 410 415

Gln Lys Pro Leu Glu Asn Asp Thr Ala Val Asn Ile Leu Gly Thr Gly
420 425 430

Thr Val Ala Phe Arg Val Ser Ile Phe Asn Lys Phe Ser Leu Ser Asp
435 440 445

Phe Glu His Pro Gly Met Val Asp Ile Tyr Phe Ser Ile Leu Cys Lys
450 455 460

Lys Asn Asn Ile Leu Gln Val Cys Ile Ser Arg Pro Ser Asn Trp Leu
465 470 475 480

Thr Glu Asp Asn Lys Asn Thr Glu Thr Leu Phe His Glu Phe Gln Asn
485 490 495

Arg Asp Glu Ile Gln Ser Lys Leu Ile Ile Ser Asn Asn Pro Trp Gly
500 505 510

Tyr Ser Ser Ile Tyr Pro Leu Leu Asn Asn Asn Ala Asn Tyr Ser Glu
515 520 525

Leu Ile Pro Cys Leu Ser Phe Tyr Asn Glu
530 535

<210> 9
<211> 1864
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de sintasa de heparosano de Pateruella multocida optimizada genéticamente para la expresión en E. coli

<400> 9

ggtaccgagc ctgtttaaac gtgcgaccga actgttcaaa agcggtaact ataaagatgc 60
gctgaccctg tatgaaaata ttgcgaaaat ttatggtagc gaaagcctgg ttaaatataa 120
catcgatatc tgcaagaaaa acattaccca gagcaaaagc aacaaaattg aagaagataa 180
cattagcggt gaaaacaaat ttagcgtgag cattaaagat ctgtataacg aaattagcaa 240
cagcgaactg ggcattacca aagaacgcct gggcgcgccg ccgctggtta gcattattat 300
gaccagccac aacaccgaaa aatttattga agcgagcatc aatagcctgc tgctgcagac 360
ctataacaat ctggaagtga ttgttgtgga tgattatagc accgataaaa cctttcagat 420
tgcaagccgt atcgcaaaca gcaccagcaa agttaaaacc tttcgcctga atagcaacct 480
gggcacctat tttgccaaaa acaccggtat tctgaaaagc aaaggcgata tcattttctt 540
tcaggatagc gatgatgtgt gccatcatga acgcattgaa cgctgtgtga acgcgctgct 600
gagcaataaa gataacattg cggtgcgctg cgcctatagc cgtattaacc tggaaaccca 660
gaacattatc aaagttaacg ataacaaata taaactgggt ctgattaccc tgggcgtgta 720
tcgtaaagtt tttaatgaaa ttggcttttt caattgcacc accaaagcaa gcgatgatga 780
attctatcat cgtattatta aatattatgg caaaaaccgt atcaacaacc tgttcctgcc 840
gctgtattat aacaccatgc gtgaagatag cctgtttagc gatatggtgg aatgggtgga 900
tgaaaataac attaaacaga aaaccagcga tgcgcgccag aactatctgc atgaattcca 960
gaaaattcat aacgaacgta aactgaacga actgaaagaa atcttcagct ttccgcgtat 1020
tcacgatgcg ctgccgatta gcaaagaaat gagcaaactg agcaacccga aaatcccggt 1080
gtatattaac atttgcagca tcccgagccg tattaaacag ctgcagtata ccattggtgt 1140
gctgaaaaac cagtgcgatc attttcatat ctatctggat ggctatccgg aagtgcctga 1200
ttttattaaa aaactgggca acaaagcaac cgttattaac tgccagaaca aaaacgaaag 1260

```
cattcgtgat aacggcaaat ttattctgct ggaaaaactg attaaagaaa acaaagatgg     1320
ttattatatt acctgcgatg atgatattcg ttatccggcg gattatatta acaccatgat     1380
taagaaaatt aacaaatata acgataaagc ggcgattggc ctgcatggcg ttatcttccc     1440
gagccgcgtg aacaaatatt ttagcagcga tcgtatcgtg tataattttc agaaaccgct     1500
ggaaaatgat accgcggtga atattctggg caccggcacc gttgcgttcc gtgtgagcat     1560
ttttaataaa tttagcctga gcgatttcga acatccgggc atggtggata tttattttag     1620
cattctgtgc aagaaaaaca acattctgca ggtttgcatt agccgtccta gcaattggct     1680
gaccgaagat aacaaaaata ccgaaaccct gttccacgaa tttcagaacc gtgatgaaat     1740
ccagagcaaa ctgattatta gcaacaatcc gtggggctat agcagcatct atccgctgct     1800
gaacaacaac gcaaactata gcgaactgat tccgtgcctg agcttttata atgaataagg     1860
atcc                                                                  1864
```

<210> 10
<211> 1864
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de sintasa de heparosano de Pateruella multocida optimizada genéticamente para la expresión en E. coli

<400> 10

ggtaccgagc ctgtttaaac gtgcgaccga actgtttaaa agcggcaact ataaagatgc 60
gctgaccctg tatgaaaaca ttgcgaaaat ttatggcagc gaaagcctgg tgaaatacaa 120
catcgatatc tgcaagaaaa acatcaccca gagcaaaagc aacaaaatcg aagaagataa 180
catcagcggc gaaaacaaat ttagcgtgag cattaaagat ctgtataacg aaattagcaa 240
cagcgaactg ggcattacca aagaacgtct gggcgcgccg ccgctggtta gcattattat 300
gaccagccat aacaccgaaa aatttattga agcgagcatt aacagcctgc tgctgcagac 360
ctataacaac ctggaagtga ttgtggtgga tgattatagc accgataaaa cctttcagat 420
tgcgagccgt attgcgaaca gcaccagcaa agtgaaaacc tttcgtctga acagcaacct 480
gggcacctat tttgcgaaaa acaccggcat tctgaaaagc aaaggcgata ttatcttttt 540
ccaggatagc gatgatgtgt gccatcatga acgtattgaa cgttgcgtga acgcgctgct 600
gagcaacaaa gataacattg cggtgcgttg cgcgtatagc cgtattaacc tggaaaccca 660
gaacattatt aaagtgaacg ataacaaata taaactgggc ctgattaccc tgggcgtgta 720
tcgtaaagtg tttaacgaaa ttggtttctt taactgcacc accaaagcga gcgatgatga 780
attctaccat cgtatcatca aatactacgg caaaaaccgt atcaacaacc tgtttctgcc 840
gctgtactac aacaccatgc gtgaagatag cctgtttagc gatatggtgg aatgggtgga 900

tgaaaacaac attaaacaga aaaccagcga tgcgcgtcag aactatctgc atgaattcca 960

gaaaatccat aacgaacgta aactgaacga actgaaagaa atttttagct ttccgcgtat 1020

tcatgatgcg ctgccgatta gcaaagaaat gagcaaactg agcaacccga aaattccggt 1080

gtatattaac atttgcagca ttccgagccg tattaaacag ctgcagtata ccattggcgt 1140

gctgaaaaac cagtgcgatc attttcatat ttatctggat ggctatccgg aagtgccgga 1200

ttttatcaag aaactgggca acaaagcgac cgtgattaac tgccagaaca aaaacgaaag 1260

cattcgtgat aacggcaaat tcatcctgct ggaaaaactg atcaaagaaa acaaagatgg 1320

ctactacatc acctgcgatg atgatatccg ttatccggcg gattacatca acaccatgat 1380

taagaaaatc aacaaataca acgataaagc ggcgattggc ctgcatggcg tgatttttcc 1440

gagccgtgtg aacaaatatt ttagcagcga tcgtattgtg tataactttc agaaaccgct 1500

ggaaaacgat accgcggtga acattctggg caccggcacc gtggcgtttc gtgtgagcat 1560

ttttaacaaa tttagcctga gcgattttga acatccgggc atggtggata tttattttag 1620

cattctgtgc aagaaaaaca acattctgca ggtgtgcatt agccgtccga gcaactggct 1680

gaccgaagat aacaaaaaca ccgaaaccct gtttcatgaa tttcagaacc gtgatgaaat 1740

tcagagcaaa ctgattatta gcaacaaccc gtggggctat agcagcattt atccgctgct 1800

gaacaacaac gcgaactata gcgaactgat tccgtgcctg agcttttata acgaataagg 1860

atcc 1864

<210> 11
<211> 1860
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia HS de Pasteurella multocida optimizada genéticamente para expresión en Bacillus

<400> 11

```
atgggtacct cactgtttaa acgtgctacg gaacttttta aaagcggaaa ctacaaagat      60
gctcttacat tgtacgaaaa catcgccaaa atctatggca gcgaatctct ggttaaatac     120
aacatcgata tctgcaagaa aaatatcacg caatcaaaaa gcaacaaaat cgaagaagat     180
aacatctcag gagaaaacaa attttctgtt tcaatcaaag atttatataa cgaaattagc     240
aattctgaat tgggcatcac aaaagaacgg ttaggcgcac cgcctttggt gtctattatc     300
atgacatcac ataacacgga aaaatttatc gaagccagca tcaactctct gcttttacag     360
acatacaaca accttgaagt catcgttgtg gatgattact ctacagataa aacgtttcaa     420
atcgcttcaa gaatcgccaa ttcaacaagc aaagtaaaaa cgtttcgctt aaacagcaat     480
ttgggcacat actttgctaa aaacacgggc atcttaaaaa gcaaaggaga tatcattttc     540
```

tttcaggatt ctgatgatgt ctgccatcat gaaagaattg aacgctgtgt aaatgccttg 600
ctgagcaaca aagataatat tgcagtccgt tgcgcgtatt ctcggatcaa cctggaaaca 660
caaaacatca tcaaagtaaa cgataacaaa tacaaattgg gcctgattac gcttggagtt 720
tatcgtaaag tgtttaacga aatcggcttt ttcaattgta caacgaaagc ctctgatgat 780
gaattttacc atagaatcat caaatactat ggaaaaaatc gcattaataa cctgtttctg 840
ccgttgtact acaacacaat gcgtgaagat tcattattta gcgatatggt cgaatgggta 900
gatgaaaaca acatcaaaca aaaaacgtca gatgcacggc agaactactt gcatgaattt 960
caaaaaatcc ataacgaacg taaactgaac gaacttaaag aaatttttag ctttccgaga 1020
attcatgatg cgctgcctat ctcaaaagaa atgtctaaac tttcaaaccc gaaaatccct 1080
gtttacatca acatttgctc aattccgtct cgcatcaaac aattacagta cacaatcgga 1140
gtgttgaaaa accagtgtga tcattttcat atctacttgg atggctatcc ggaagttcct 1200
gattttatca aaaaattggg aaacaaagca acggtgatca actgccaaaa caaaaacgaa 1260
agcatcagag ataacggcaa atttatcctt ttagaaaaat tgatcaaaga aaacaaagat 1320
ggatactaca tcacatgtga tgatgatatt cgctatcctg cggattatat taatacgatg 1380
attaagaaaa ttaacaaata caacgataaa gcagcgatcg gcctgcatgg agttatcttt 1440
ccgtctcgtg tgaacaaata cttttcaagc gatcggatcg tctacaactt tcagaaacct 1500
ttagaaaacg atacagcagt aaacatcttg ggcacaggaa cggtcgcgtt tagagtatca 1560
atctttaaca aattttctct gtcagatttt gaacatccgg gcatggttga tatctacttt 1620
agcatcctgt gcaagaaaaa taacatcctt caagtgtgta tctcaagacc tagcaattgg 1680
ctgacagaag ataacaaaaa cacagaaacg ctttttcatg aatttcaaaa ccgcgatgaa 1740
atccagagca aacttatcat ctctaacaac ccgtggggat attcttcaat ctaccctttg 1800
ctgaacaaca acgcaaacta ctcagaactg atcccgtgtc ttagctttta taacgaataa 1860

Reivindicaciones

1. Un método para producir recombinantemente un polímero de heparosano de alto peso molecular, comprendiendo el método los pasos de:

cultivar una célula huésped recombinante que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de sintasa de heparosano en condiciones apropiadas para la expresión de la sintasa de heparosano, en la que al menos uno de:

(a) el polipéptido que tiene actividad de sintasa de heparosano es al menos 90% idéntico a al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8, y la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido se ha optimizado genéticamente para la expresión en la célula huésped recombinante;
(b) el polipéptido que tiene actividad de sintasa de heparosano tiene adiciones de 1-20 aminoácidos, deleciones y/o sustituciones cuando se compara con al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8, y la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido ha sido genéticamente optimizado para la expresión en la célula huésped recombinante;
(c) el polipéptido está codificado por la secuencia de nucleótidos de al menos una de las SEQ ID NOS: 9-11;
(d) el polipéptido está codificado por una secuencia de nucleótidos que es idéntica al menos en un 90% a al menos una de las SEQ ID NOS: 9-11; y
(e) la secuencia de nucleótidos codifica una sintasa de heparosano de *Pasteurella*; y

aislar el polímero de heparosano producido por la sintasa de heparosano, donde el polímero de heparosano aislado es biocompatible con un paciente mamífero y biológicamente inerte dentro de los compartimentos extracelulares de un paciente mamífero, y en el que el polímero de heparosano aislado está representado por la estructura $(\text{-GlcUA-beta1,4-GlcNAc-alfa-1,4-})_n$, en donde n es un número entero positivo mayor que o igual a 2.000.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la célula huésped recombinante comprende además al menos un gen que codifica una enzima para la síntesis de un precursor de azúcar heparosano, en donde al menos un gen que codifica una enzima para la síntesis de un precursor de azúcar de heparosano se selecciona del grupo que consiste en una pirofosforilasa, una transferasa, una mutasa, una deshidrogenasa y una epimerasa, capaz de producir UDP-GlcNAc o UDP-GlcUA.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además al menos uno de los pasos de:

(a) reticulación del polímero de heparosano aislado; y/o
(b) unir covalentemente y/o no covalentemente el polímero de heparosano aislado a al menos una porción de una superficie de un sustrato; opcionalmente, cuando el sustrato se selecciona del grupo que consiste en sílice, silicio, semiconductores, vidrio, polímeros, nanotubos, nanopartículas, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, metales y combinaciones de los mismos; opcionalmente en donde al menos una porción del sustrato es un metal seleccionado del grupo que consiste en oro, cobre, acero inoxidable, níquel, aluminio, titanio, aleaciones termosensibles y combinaciones de los mismos.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la célula huésped recombinante es una célula huésped recombinante de E. coli.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el polímero de heparosano aislado se define adicionalmente por tener un valor para n en un intervalo de aproximadamente 2,000 a aproximadamente 17,000.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polímero de heparosano aislado no es sustancialmente susceptible a hialuronidasas o heparanasas de mamíferos y, por lo tanto, no se degrada sustancialmente in vivo en compartimentos extracelulares de un paciente mamífero.

7. Una composición de biomaterial, comprendiendo la composición:

un polímero de heparosano aislado, en el que el polímero de heparosano aislado es biocompatible con un paciente mamífero y biológicamente inerte en compartimentos extracelulares de un paciente mamífero, estando representado el polímero de heparosano aislado por la estructura $(\text{-GlcUA-beta1,4-GlcNAc-alfa-1,4-})_n$, en donde n es un número entero positivo mayor que o igual a 2.000.

8. La composición de biomaterial de la reivindicación 7, en la que el polímero de heparosano aislado se define además por tener un valor para n en un intervalo de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 17.000.

9. La composición de biomaterial de la reivindicación 7 u 8, en la que el polímero de heparosano es lineal.

10. La composición de biomaterial de la reivindicación 7 u 8, en la que el polímero de heparosano está reticulado.

11. La composición de biomaterial de cualquiera de las reivindicaciones 7 - 10, define además que está en estado gel, semisólido y/o en partículas, y en la que la composición de biomaterial se define además como una composición de biomaterial implantable.

12. La composición de biomaterial de una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, definida además como una composición de biomaterial líquido, y en la que la composición de biomaterial se define además como una composición de biomaterial inyectable.

13. La composición de biomaterial de cualquiera de las reivindicaciones 7-12, comprendiendo además un sustrato adicional al que el polímero opaco aislado está unido covalentemente y/o no covalentemente, opcionalmente en el que el sustrato se selecciona del grupo que consiste en sílice, silicio, semiconductores, vidrio, polímeros, nanotubos, nanopartículas, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, metales y combinaciones de los mismos; opcionalmente en donde al menos una porción del sustrato es un metal seleccionado del grupo que consiste en oro, cobre, acero inoxidable, níquel, aluminio, titanio, aleaciones termosensibles y combinaciones de los mismos.

14. La composición de biomaterial de una cualquiera de las reivindicaciones 7-13, en la que el polímero de heparosano aislado no es sustancialmente susceptible a hialuronidasas o heparanasas de mamíferos y, por lo tanto, no se degrada sustancialmente in vivo en compartimentos extracelulares de un paciente mamífero.

15. Secuencia de nucleótidos aniónicos en un polipéptido codificante que tiene la actividad de sintasa de laparosina, en la que al menos uno de:

(a) el polipéptido que tiene actividad de sintasa de heparosano es idéntico a al menos uno de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8, y la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido ha sido optimizada genéticamente para la expresión en la célula huésped recombinante; y
(b) el polipéptido que tiene actividad de sintasa de heparosano tiene adiciones de 1-20 aminoácidos, deleciones y/o sustituciones cuando se compara con al menos una de las SEQ ID NOS: 2, 4 y 6-8, y la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido se ha optimizado genéticamente para la expresión en la célula huésped recombinante;
(c) el polipéptido está codificado por la secuencia de nucleótidos de al menos una de las SEQ ID NOS; 9-11; y
(d) el polipéptido está codificado por una secuencia de nucleótidos que es idéntica al menos en un 90% a al menos una de las SEQ ID NOS: 9-11.

16. La secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 15, en la que la célula huésped para la cual la secuencia de nucleótidos ha sido optimizada por codon es E. coli.

17. Una célula huésped recombinante, que comprende la secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 15 o 16.

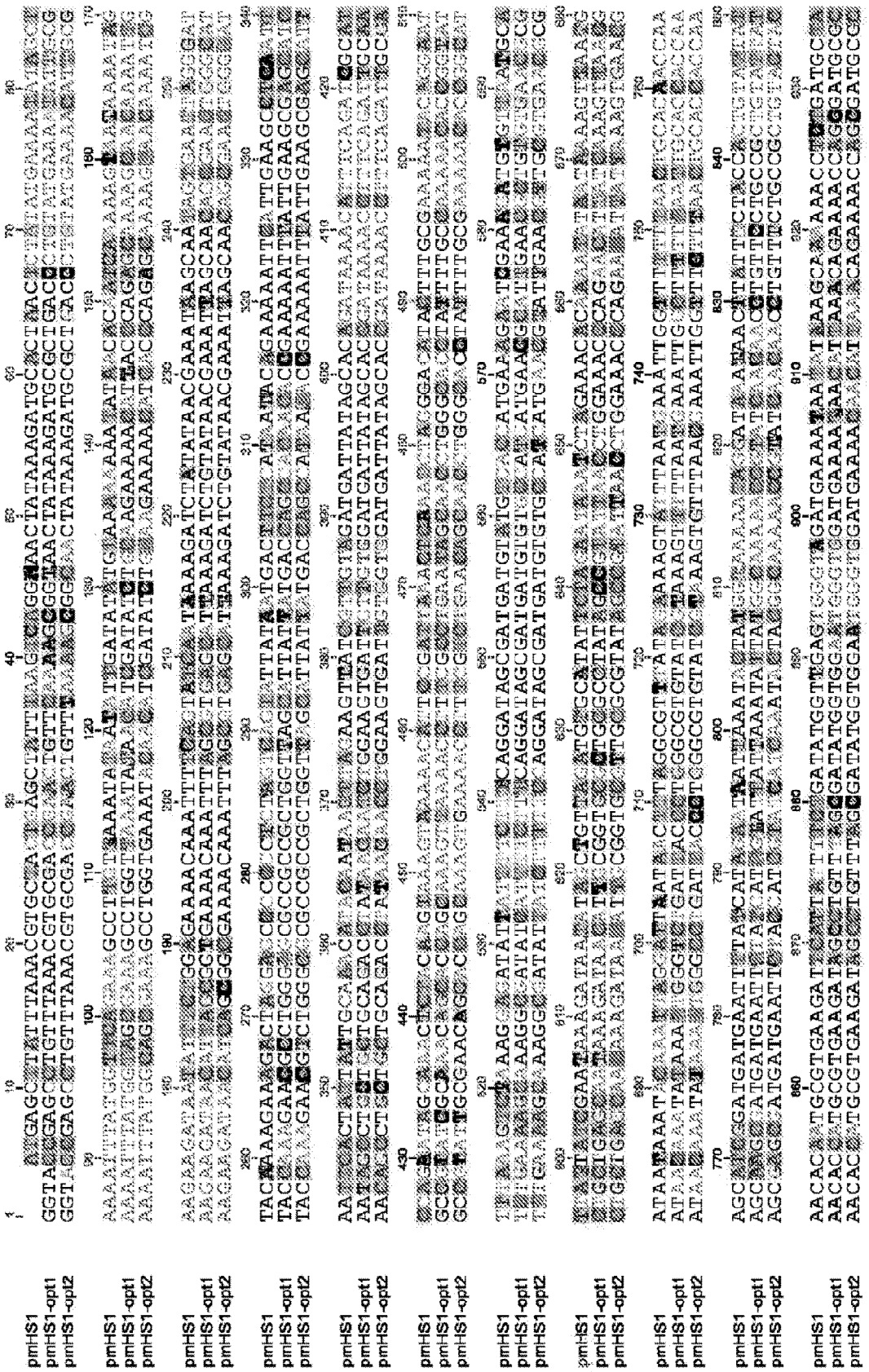

FIGURA 1A

FIGURA 1A (CONTINUACIÓN)

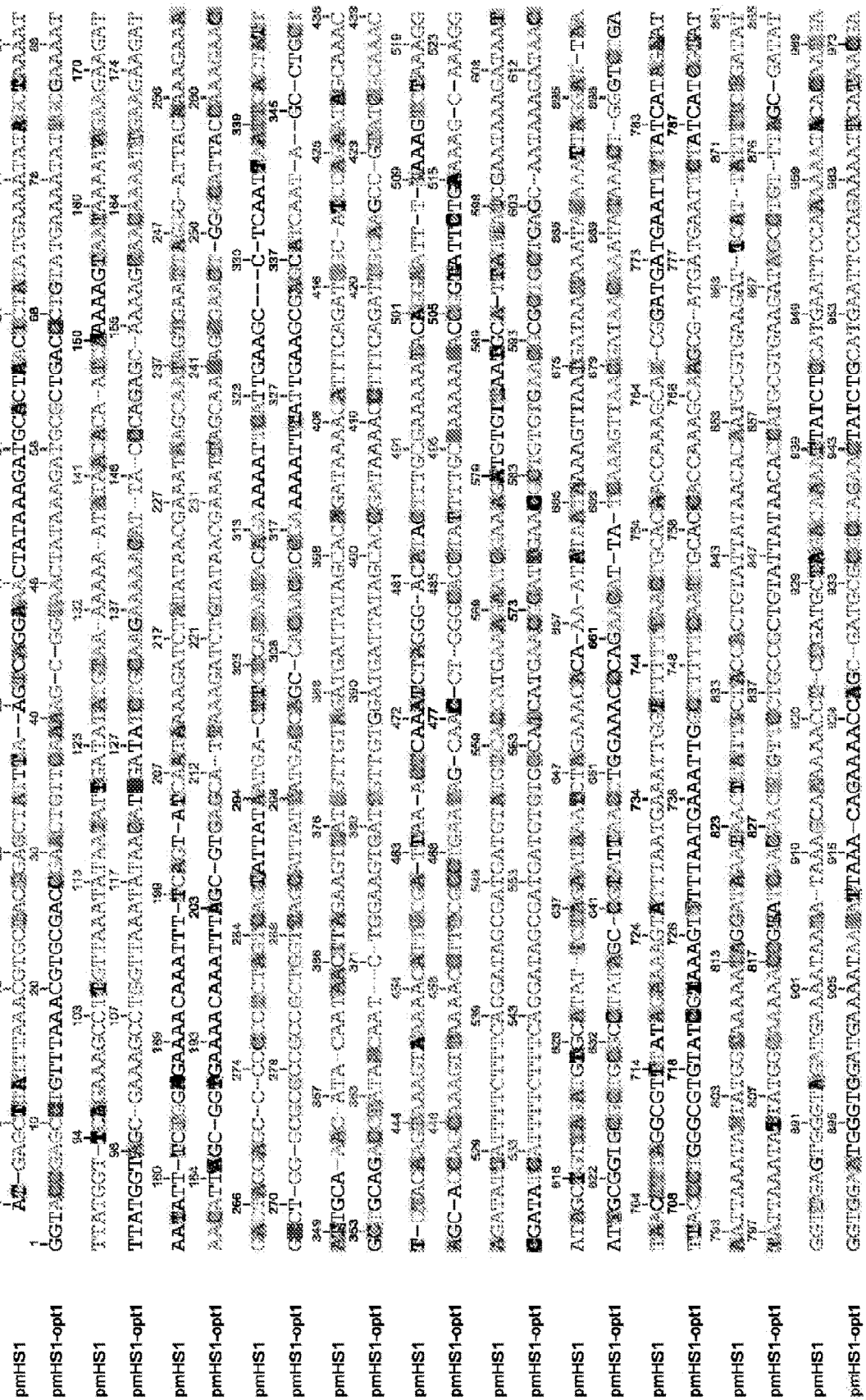

FIGURA 1B

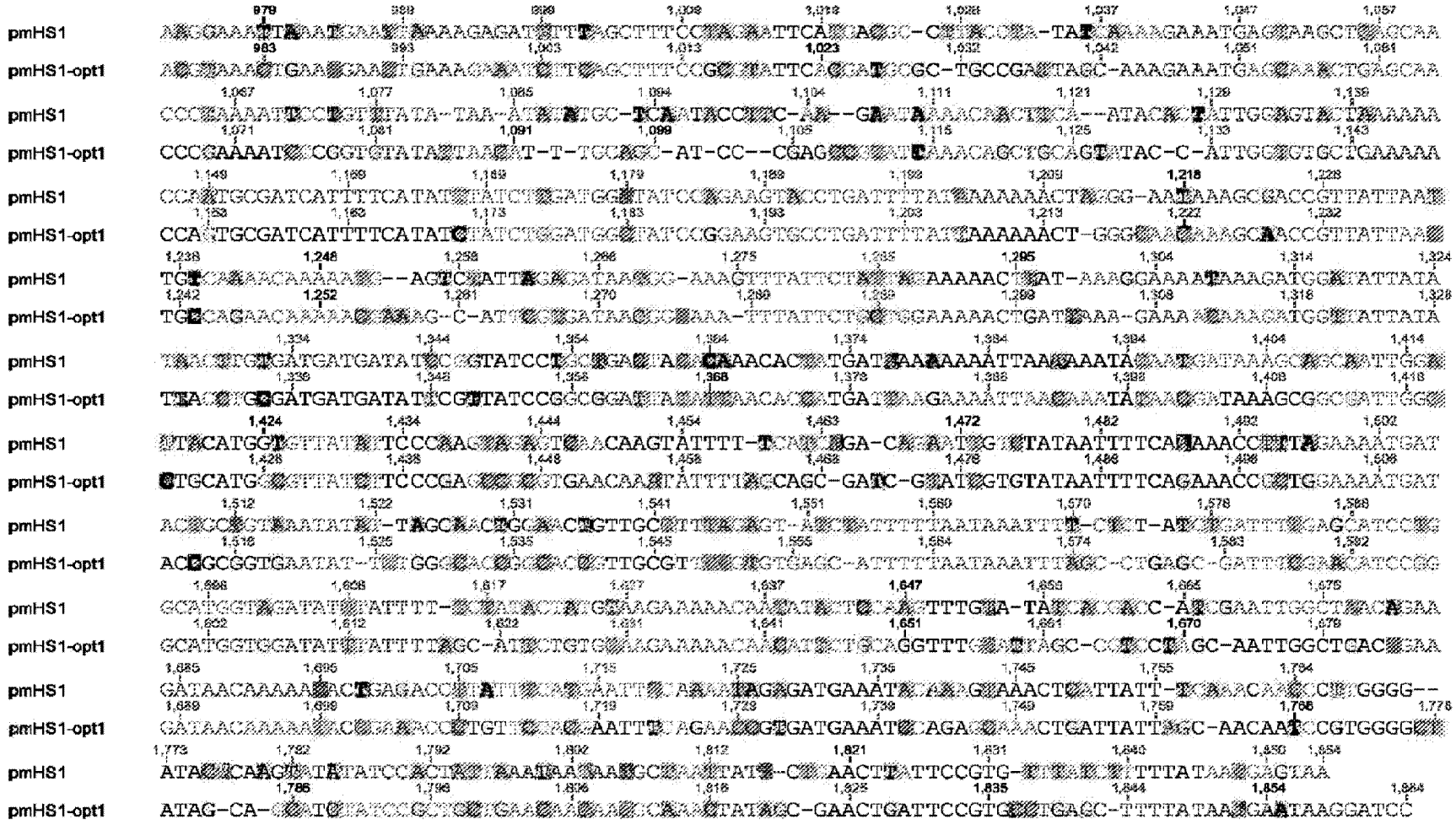

FIGURA 1B (CONTINUACIÓN)

```
PmHS-opt3    37 ATGGGTACCTCACTGTTTAAACGTGCTACGGAACTTTTTAAAAGCGGAAACTACAAAGAT
pmHS nativo  37 ATGGGTACCTCACTGTTTAAACGTGCTACAGAACTTTTTAAAAGCGGCAACTACAAAGAT

PmHS-opt3    97 GCTCTTACATTGTACGAAAACATCGCCAAAATCTATGGCAGCGAATCTCTGGTTAAATAC
pmHS nativo  97 GCTCTTACGTTGTACGAAAACATCGCCAAAATCTACGGAAGCGAATCTCTGGTTAAATAC

PmHS-opt3    157 AACATCGATATCTGCAAGAAAAATATCACGCAATCAAAAAGCAACAAAATCGAAGAAGAT
pmHS nativo  157 AACATCGATATCTGCAAGAAAAATATTACACAATCAAAAAGCAACAAAATCGAAGAAGAT

PmHS-opt3    217 AACATCTCAGGAGAAAACAAATTTTCTGTTTCAATCAAAGATTTATATAACGAAATTAGC
pmHS nativo  217 AACATCTCAGGCGAAAACAAATTTTCTGTTTCAATCAAAGATTTATATAACGAAATTAGC

PmHS-opt3    277 AATTCTGAATTGGGCATCACAAAAGAACGGTTAGGCGCACCGCCTTTGGTGTCTATTATC
pmHS nativo  277 AATTCTGAATTGGGCATCACAAAAGAACGGTTAGGAGCTCCGCCTTTGGTGTCTATTATC

PmHS-opt3    337 ATGACATCACATAACACGGAAAAATTTATCGAAGCCAGCATCAACTCTCTGCTTTTACAG
pmHS nativo  337 ATGACATCACATAACACGGAAAAATTTATCGAAGCCAGCATCAACTCTCTGCTTTTGCAG

PmHS-opt3    397 ACATACAACAACCTTGAAGTCATCGTTGTGGATGATTACTCTACAGATAAAACGTTTCAA
pmHS nativo  397 ACATACAACAACCTTGAAGTCATCGTTGTGGATGATTACTCTACAGATAAAACGTTTCAA

PmHS-opt3    457 ATCGCTTCAAGAATCGCCAATTCAACAAGCAAAGTAAAAACGTTTCGCTTAAACAGCAAT
pmHS nativo  457 ATCGCTTCAAGAATCGCCAATTCAACAAGCAAAGTAAAAACGTTTCGCTTAAACAGCAAC

PmHS-opt3    517 TTGGGCACATACTTTGCTAAAAACACGGGCATCTTAAAAAGCAAAGGAGATATCATTTTC
pmHS nativo  517 TTGGGAACATACTTTGCTAAAAACACGGGCATCTTGAAAAGCAAAGGAGATATCATTTTC

PmHS-opt3    577 TTTCAGGATTCTGATGATGTCTGCCATCATGAAAGAATTGAACGCTGTGTAAATGCCTTG
pmHS nativo  577 TTTCAGGATTCTGATGATGTCTGCCATCATGAAAGAATTGAACGCTGTGTAAATGCCTTG

PmHS-opt3    637 CTGAGCAACAAAGATAATATTGCAGTCCGTTGCGCGTATTCTCGGATCAACCTGGAAACA
pmHS nativo  637 CTGAGCAACAAAGATAATATTGCAGTCCGTTGCGCGTATTCTCGGATCAACCTGGAAACA

PmHS-opt3    697 CAAAACATCATCAAAGTAAACGATAACAAATACAAATTGGGCCTGATTACGCTTGGAGTT
pmHS nativo  697 CAAAACATCATCAAAGTAAACGATAACAAATACAAATTGGGCCTGATTACGCTTGGAGTT

PmHS-opt3    757 TATCGTAAAGTGTTTAACGAAATCGGCTTTTTCAATTGTACAACGAAAGCCTCTGATGAT
pmHS nativo  757 TATCGTAAAGTGTTTAACGAAATCGGCTTTTTCAATTGTACAACGAAAGCCTCTGATGAT

PmHS-opt3    817 GAATTTTACCATAGAATCATCAAATACTATGGAAAAAATCGCATTAATAACCTGTTTCTG
pmHS nativo  817 GAATTTTACCATAGAATCATCAAATACTATGGAAAAAATCGCATTAATAACCTGTTTCTG

PmHS-opt3    877 CCGTTGTACTACAACACAATGCGTGAAGATTCATTATTTAGCGATATGGTCGAATGGGTA
pmHS nativo  877 CCGTTGTACTACAACACAATGCGTGAAGATTCATTATTTAGCGATATGGTCGAATGGGTA

PmHS-opt3    937 GATGAAAACAACATCAAACAAAAAACGTCAGATGCACGGCAGAACTACTTGCATGAATTT
pmHS nativo  937 GATGAAAACAACATCAAACAAAAAACGTCAGATGCACGGCAGAACTACTTGCATGAATTT
```

FIGURA 1C

```
PmHS-opt3    997 CAAAAAATCCATAACGAACGTAAACTGAACGAACTTAAAGAAATTTTTAGCTTTCCGAGA
pmHS nativo  997 CAAAAAATCCATAACGAACGTAAACTGAACGAACTTAAAGAAATTTTTAGCTTTCCGCGG

PmHS-opt3   1057 ATTCATGATGCGCTGCCTATCTCAAAAGAAATGTCTAAACTTTCAAACCCGAAAATCCCT
pmHS nativo 1057 ATCCATGATGCGCTGCCTATCTCAAAAGAAATGTCTAAACTTTCAAACCCGAAAATCCCT

PmHS-opt3   1117 GTTTACATCAACATTTGCTCAATTCCGTCTCGCATCAAACAATTACAGTACACAATCGGA
pmHS nativo 1117 GTTTACATCAACATCTGCAGCATTCCGTCTCGCATCAAACAATTACAGTATACAATTGGC

PmHS-opt3   1177 GTGTTGAAAAACCAGTGTGATCATTTTCATATCTACTTGGATGGCTATCCGGAAGTTCCT
pmHS nativo 1177 GTGTTGAAAAACCAGTGTGATCATTTTCATATCTACTTGGATGGCTATCCGGAAGTTCCT

PmHS-opt3   1237 GATTTTATCAAAAAATTGGGAAACAAAGCAACGGTGATCAACTGCCAAAACAAAAACGAA
pmHS nativo 1237 GATTTTATCAAAAAATTGGGAAACAAAGCAACGGTGATCAACTGCCAAAACAAAAACGAA

PmHS-opt3   1297 AGCATCAGAGATAACGGCAAATTTATCCTTTTAGAAAAATTGATCAAAGAAAACAAAGAT
pmHS nativo 1297 AGCATCAGAGATAACGGCAAATTTATCCTTTTGGAAAAATTGATCAAAGAAAACAAAGAT

PmHS-opt3   1357 GGATACTACATCACATGTGATGATGATATTCGCTATCCTGCGGATTATATTAATACGATG
pmHS nativo 1357 GGATACTACATCACATGTGATGATGATATTCGCTATCCTGCGGATTATATTAATACGATG

PmHS-opt3   1417 ATTAAGAAAATTAACAAATACAACGATAAAGCAGCGATCGGCCTGCATGGAGTTATCTTT
pmHS nativo 1417 ATTAAGAAAATTAACAAATACAACGATAAAGCAGCGATCGGCCTGCATGGAGTTATCTTT

PmHS-opt3   1477 CCGTCTCGTGTGAACAAATACTTTTCAAGCGATCGGATCGTCTACAACTTTCAGAAACCT
pmHS nativo 1477 CCGTCTCGTGTGAACAAATACTTTTCAAGCGATCGGATCGTCTACAACTTTCAGAAACCT

PmHS-opt3   1537 TTAGAAAACGATACAGCAGTAAACATCTTGGGCACAGGAACGGTCGCGTTTAGAGTATCA
pmHS nativo 1537 TTGGAAAACGATACAGCAGTAAACATCTTGGGCACAGGAACGGTCGCGTTTAGAGTATCA

PmHS-opt3   1597 ATCTTTAACAAATTTTCTCTGTCAGATTTTGAACATCCGGGCATGGTTGATATCTACTTT
pmHS nativo 1597 ATCTTTAACAAATTTTCTCTGTCAGATTTTGAACATCCGGGCATGGTTGATATCTACTTT

PmHS-opt3   1657 AGCATCCTGTGCAAGAAAAATAACATCCTTCAAGTGTGTATCTCAAGACCTAGCAATTGG
pmHS nativo 1657 AGCATCCTGTGCAAGAAAAATAACATCCTTCAAGTGTGTATCTCAAGACCTAGCAATTGG

PmHS-opt3   1717 CTGACAGAAGATAACAAAAACACAGAAACGCTTTTTCATGAATTTCAAAACCGCGATGAA
pmHS nativo 1717 CTGACAGAAGATAACAAAAACACAGAAACGCTTTTTCATGAATTTCAAAACCGCGATGAA

PmHS-opt3   1777 ATCCAGAGCAAACTTATCATCTCTAACAACCCGTGGGGATATTCTTCAATCTACCCTTTG
pmHS nativo 1777 ATCCAGAGCAAACTTATCATCTCTAACAACCCGTGGGGATACTCTTCAATCTACCCTTTG

PmHS-opt3   1837 CTGAACAACAACGCAAACTACTCAGAACTGATCCCGTGTCTTAGCTTTTATAACGAATAA
pmHS nativo 1837 CTGAACAACAACGCAAACTACTCAGAACTGATCCCGTGTCTTAGCTTTTATAACGAATAA
```

FIGURA 1C (CONTINUADA)

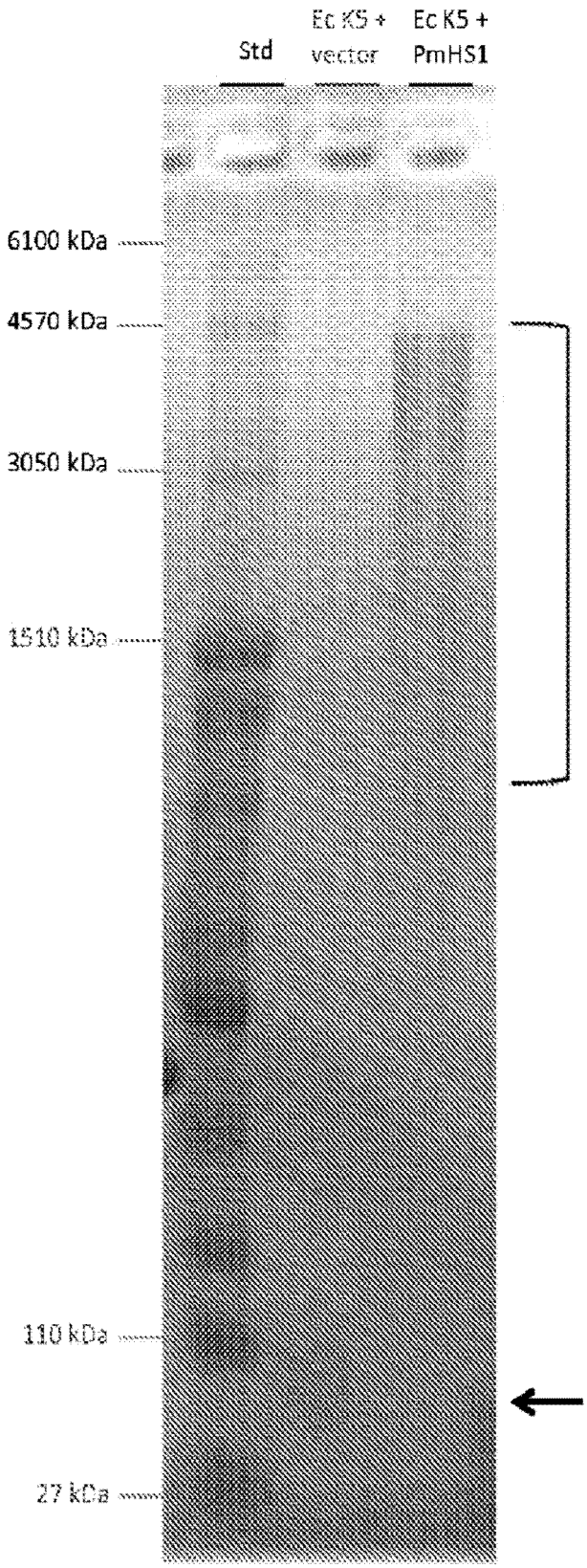
Std
Ec K5 + vector
Ec K5 + PmHS1
6100 kDa
4570 kDa
3050 kDa
1510 kDa
110 kDa
27 kDa

FIGURA 2

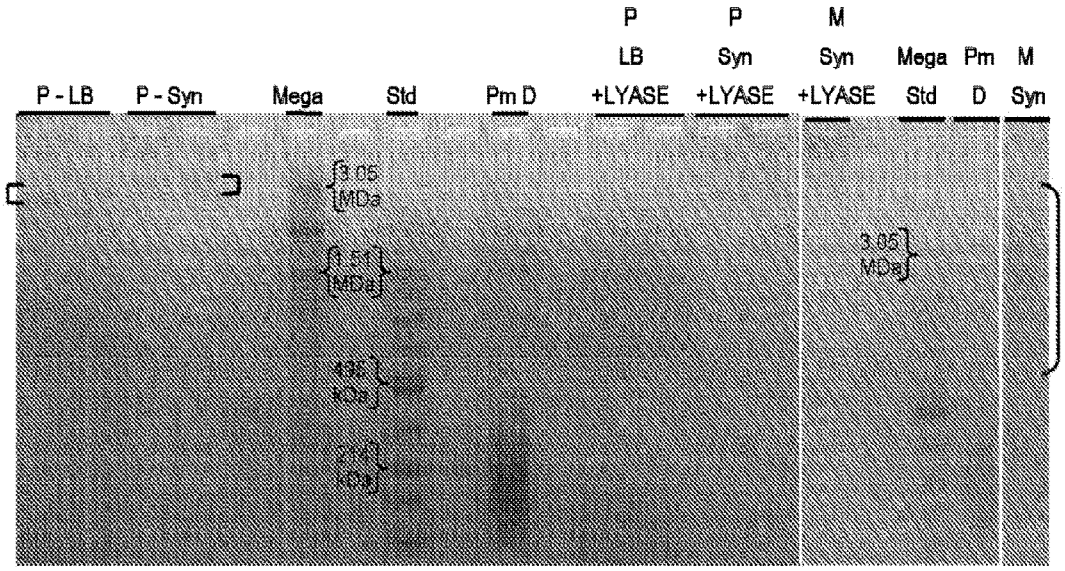
P - LB
P - Syn
Mega
Std
Pm D
P LB +LYASE
P Syn +LYASE
M Syn +LYASE
Mega Std
Pm D
M Syn
3.05 MDa
1.51 MDa
3.05 MDa

FIGURA 3

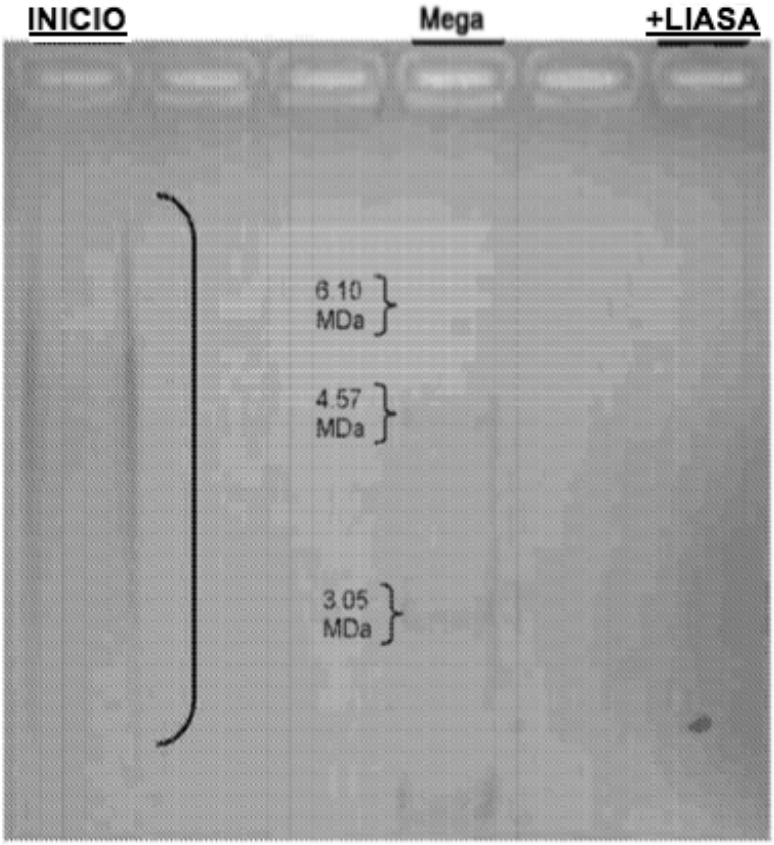

FIGURA 4

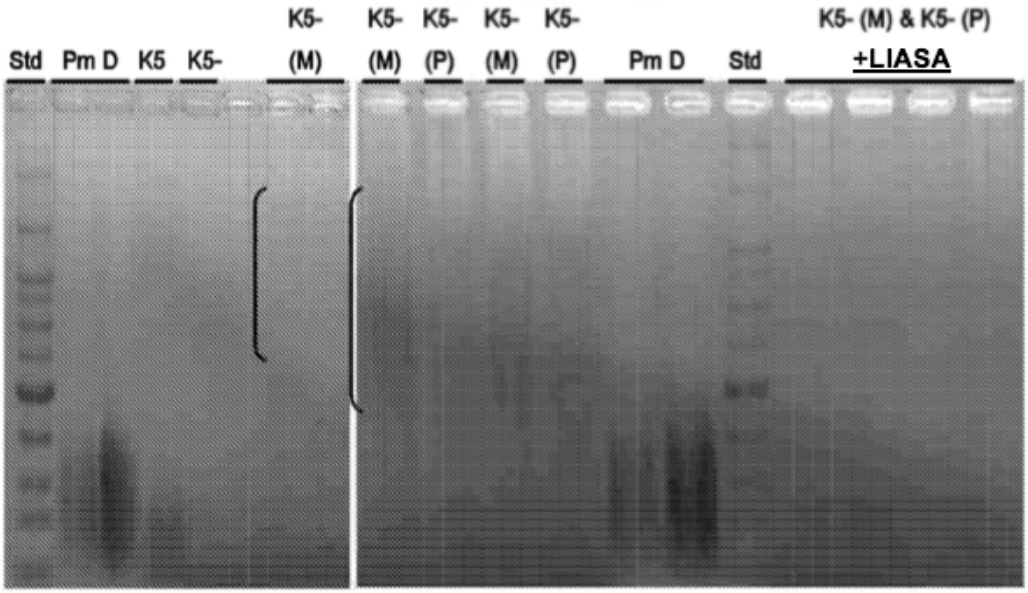

FIGURA 5