



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 335 005**

51 Int. Cl.:
C12P 21/06 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04717941 .1**
96 Fecha de presentación : **05.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1603541**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.2005**

54 Título: **Glicoproteína hialuronidasa soluble (sHASEGP), proceso para prepararla, usos y composiciones farmacéuticas que la comprenden.**

30 Prioridad: **05.03.2003 US 452360 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.03.2010

73 Titular/es: **HALOZYME, Inc.**
11588 Sorrento Valley Road, S17
San Diego, California 92121, US

72 Inventor/es: **Bookbinder, Louis, H.;**
Kundu, Anirban y
Frost, Gregory, I.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 335 005 T3

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

DESCRIPCIÓN

Glicoproteína hialuronidasa soluble (sHASEGP), proceso para prepararla, usos y composiciones farmacéuticas que la comprenden.

5 **Referencia cruzada con solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica prioridad de acuerdo con 35 U.S.C. § 119 (e) respecto al documento U.S. de Número de Serie 60/452.360, presentado el 5 de marzo de 2003.

10 **Antecedentes de la invención**

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere en general a glicoproteínas hialuronidasa solubles activas a pH neutro (sHASEGP), porciones de las mismas, particularmente dominios hialuronidasa. Más específicamente, la invención se refiere a modificaciones químicas, composiciones farmacéuticas, plásmidos de expresión, métodos para la fabricación y métodos terapéuticos que usan las glicoproteínas hialuronidasas y dominios de las mismas y las moléculas de ácido nucleico codificantes para la modificación terapéutica de glicosaminoglicanos en el tratamiento de una enfermedad y para el uso para aumentar la difusión de otras moléculas inyectadas de menos de 200 nanómetros de diámetro en un animal.

Información antecedente

25 Los glicosaminoglicanos (GAG) son polisacáridos lineales complejos de la matriz extracelular (ECM). Los GAG se caracterizan por estructuras disacáridas repetidas de una hexosamina N-sustituida y un ácido urónico, [hialuronano (HA), sulfato de condroitina (CS), condroitina (C), sulfato de dermatán (DS), sulfato de heparán (HS), heparina (H)], o una galactosa, [sulfato de queratán (KS)]. Excepto por el HA, todos se presentan unidos covalentemente a proteínas de núcleo. Los GAG con sus proteínas de núcleo se denominan estructuralmente proteoglicanos (PG).

30 El hialuronano (HA) se encuentra en mamíferos predominantemente en tejidos conjuntivos, piel, cartílago y en líquido sinovial. El hialuronano también es el constituyente principal del humor vítreo del ojo. En el tejido conjuntivo, el agua de hidratación asociada con el hialuronano genera espacios entre tejidos, generando de este modo un entorno que conduce a movimiento y proliferación celular. El hialuronano desempeña un papel clave en fenómenos biológicos asociados con la motilidad celular incluyendo el desarrollo rápido, regeneración, reparación, embriogénesis, desarrollo embrionario, cicatrización de heridas, angiogénesis y oncogénesis (Toole 1991 *Cell Biol Extracell. Matrix*, Hay (ed.), Plenum Press, Nueva York, 1384-1386; Bertrand *et al.* 1992 *Int. J. Cancer* 52: 1-6; Knudson *et al.*, 1993 *FASEB J.* 7: 1233-1241). Además, los niveles de hialuronano se correlacionan con la agresividad tumoral (Ozello *et al.* 1960 *Cancer Res.* 20: 600-604; Takeuchi *et al.* 1976, *Cancer Res.* 36: 2133-2139; Kimata *et al.* 1983 *Cáncer Res.* 43: 1347-1354).

45 El HA se encuentra en la matriz extracelular de muchas células, especialmente en tejidos conjuntivos blandos. Al HA se le han asignado diversas funciones fisiológicas, tales como en la homeostasis del agua y de proteínas plasmáticas (Laurent TC *et al.* (1992) *FASEB J.* 6: 2397-2404). La producción de HA aumenta en células en proliferación y puede desempeñar un papel en la mitosis. También se ha implicado en la locomoción y en la migración celular. El HA parece desempeñar papeles importantes en la regulación, desarrollo y diferenciación celular (Laurent *et al.*, anteriormente).

50 El HA se ha usado en la medicina clínica. Su propiedades reológicas y protectoras de tejidos han demostrado utilidad en la cirugía oftálmica para proteger el endotelio corneal durante la cirugía de cataratas. El HA sérico es diagnóstico de enfermedad hepática y diversas afecciones inflamatorias, tales como artritis reumatoide. El edema intersticial causado por acumulación de HA puede causar disfunción en diversos órganos (Laurent *et al.*, anteriormente).

55 Las interacciones proteicas del hialuronano también están implicadas en la estructura de la matriz extracelular o "sustancia fundamental".

Las hialuronidasas son un grupo de enzimas activas a pH neutro y a pH ácido que se encuentran por todo el reino animal. Las hialuronidasas varían con respecto a la especificidad de sustrato y mecanismo de acción.

Existen tres clases generales de hialuronidasas:

60 1. Hialuronidasas de tipo mamífero, (EC 3.2.1.35) que son endo-beta-N-acetilhexosaminidasas con tetrasacáridos y hexasacáridos como los productos finales principales. Tienen actividades tanto hidrolítica como transglicosidasa y pueden degradar el hialuronano y los sulfatos de condroitina (CS), en concreto C4-S y C6-S.

65 2. Las hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.99.1), degradan el hialuronano y en diversos grados CS y DS. Son endo-beta-N-acetilhexosaminidasas que funcionan mediante una reacción de beta-eliminación que produce principalmente productos finales disacáridos.

ES 2 335 005 T3

3. Las hialuronidasas (EC 3.2.1.36) de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos son endo-beta-glucuronidasas que generan productos finales tetrasacáridos y hexasacáridos a través de la hidrólisis del enlace beta 1-3.

Las hialuronidasas de mamífero pueden dividirse adicionalmente en dos grupos: enzimas activas a pH neutro y activas a pH ácido. Existen seis genes de tipo hialuronidasa en el genoma humano, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 y PH20/SPAM1. HYALP1 es un pseudogén y no se ha demostrado que HYAL3 posea actividad enzimática hacia ningún sustrato conocido. HYAL4 es una condroitinasa y carece de actividad hacia hialuronano. HYAL1 es la enzima activa a pH ácido prototípica y PH20 es la enzima activa a pH neutro prototípica. Las hialuronidasas activas a pH ácido, tales como HYAL1 y HYAL2, carecen de actividad catalítica a pH neutro. Por ejemplo, la HYAL1 no tiene actividad catalítica *in vitro* sobre pH 4,5 (Frost *et al* Anal Biochemistry, 1997). HYAL2 es una enzima activa a pH ácido con una actividad específica muy baja *in vitro*.

Las enzimas de tipo hialuronidasa también pueden estar caracterizadas por las que están inmovilizadas en la membrana plasmática a través de un anclaje glicosilfosfatidilinositol tal como HYAL2 humana y PH20 humana (Danilkovitch-Miagkova, *et al*. Proc Natl Acad Sci USA. 15 de abril de 2003; 100 (8): 4580-5, Phelps *et al.*, Science 1988) y las que son solubles, tales como HYAL1 humana (Frost *et al*, Biochem Biophys Res Commun. 9 de julio de 1997; 236 (1): 10-5). Sin embargo, existen variaciones entre especies: por ejemplo, la PH20 bovina se unen muy débilmente a la membrana plasmática y no se ancla mediante un anclaje sensible a fosfolipasa (Lalancette *et al*, Biol Reprod., agosto 2001; 65 (2): 628-36.). Esta característica única de la hialuronidasa bovina ha permitido el uso de la enzima hialuronidasa de testículos bovinos soluble como un extracto para uso clínico (Wydase[®], Hyalase[®]). Otras especies de PH20 son enzimas ancladas a lípidos que no son insolubles sin el uso de detergentes o lipasas. Por ejemplo, la PH20 humana se ancla a la membrana plasmática a través de un anclaje GPI. Los intentos para preparar construcciones de ADN de PH20 humana que no introducirían un anclaje lipídico en el polipéptido dieron como resultado una enzima catalíticamente inactiva o una enzima insoluble (Arming *et al* Eur J Biochem. 1 de Agosto de 1997; 247 (3): 810-4). La hialuronidasa de esperma de macaco de origen natural se encuentra en forma tanto soluble como unida a membrana. Mientras que la forma unida a membrana de 64 kDa posee actividad enzimática a pH 7,0, la forma de 54 kDa sólo es activa a pH 4,0 (Cherr *et al*, Dev Biol. 10 de abril de 1996; 175 (1): 142-53). Por lo tanto, las formas solubles de PH20 carecen con frecuencia de actividad enzimática en condiciones neutras.

Las condroitinasas son enzimas que se encuentran por todo el reino animal. Estas enzimas degradan los glicosaminoglicanos a través de una reacción endoglicosidasa. Los ejemplos específicos de condroitinasas conocidas incluyen condroitinasa ABC (obtenida de *Proteus vulgaris*; Solicitud de Patente Japonesa abierta a inspección pública N° 6-153947, T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi y S. Suzuki, J. Biol. Chem., 243, 1523 (1968), S. Suzuki, H. Saito, T. Yamagata, K. Anno, N. Seno, Y. Kawai, y T. Furuhashi, J. Biol. Chem., 243, 1543 (1968)), condroitinasa AC (obtenida de *Flavobacterium heparinum*; T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi y S. Suzuki, J. Biol. Chem., 243, 1523 (1968)), condroitinasa AC II (obtenida de *Arthrobacter aureescens*; K. Hiyama y S. Okada, J. Biol. Chem., 250, 1824 (1975), K. Hiyama y S. Okada, J. Biochem. (Tokyo), 80, 1201 (1976)), hialuronidasa ACIII (obtenida de *Flavobacterium* sp. Hp102; Hirofumi Miyazono, Hiroshi Kikuchi, Keiichi Yoshida, Kiyoshi Morikawa y Kiyochika Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023 (1989)), condroitinasa B (obtenida de *Flavobacterium eparinum*; Y. M. Michelacci y C. P. Dietrich, Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 973 (1974), Y. M. Michelacci y C. P. Dietrich, Biochem. J., 151, 121 (1975), Kenichi Maeyama, Akira Tawada, Akiko Ueno y Keiichi Yoshida, Seikagaku, 57, 1189 (1985)), condroitinasa C (obtenida de *Flavobacterium* sp. Hp102; Hirofumi Miyazono, Hiroshi Kikuchi, Keiichi Yoshida, Kiyoshi Morikawa y Kiyochika Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023 (1939)) y similares.

Las glicoproteínas están compuestas por una cadena polipeptídica unida covalentemente a uno o más restos de carbohidrato. Existen dos amplias categorías de glicoproteínas que poseen carbohidratos acoplados a través de sus enlaces N-glicosídicos u O-glicosídicos a su proteína constituyentes. Los glicanos ligados a N y O se unen a polipéptidos a través de enlaces asparagina-N-acetil-D-glucosamina y serina(treonina)-N-acetil-D-galactosamina, respectivamente. Los oligosacáridos ligados a N complejos no contienen restos manosa terminales. Contienen sólo restos N-acetilglucosamina, galactosa y/o ácido siálico terminales. Los oligosacáridos híbridos contienen restos manosa terminales, así como restos N-acetilglucosamina, galactosa y/o ácido siálico terminales.

Con glicoproteínas ligadas a N, un precursor oligosacárido se une al grupo amino de asparagina durante la síntesis peptídica en el retículo endoplásmico. El resto oligosacárido se procesa después secuencialmente mediante una serie de enzimas específicas que deletrean y añaden restos de azúcares. El procesamiento se produce en el retículo endoplásmico y continúa con su paso a través del aparato cis-, medial- y trans-Golgi.

Sumario de la invención

Se proporcionan en este documento miembros de la familia de glicoproteínas hialuronidasas solubles activas a pH neutro, particularmente las proteínas hialuronidasas PH-20 humanas solubles (también denominadas en este documento sHASEGP). La sHASEGP proporcionada en este documento es un miembro de la familia de sHASEGP, denominada en este documento sHASEGP. También se proporciona el dominio hialuronidasa soluble y los usos del mismo.

La invención se basa en el descubrimiento de que puede producirse una actividad de hialuronidasa soluble activa a pH neutro con alto rendimiento en un sistema de expresión en mamíferos por introducción de ácidos nucleicos que carecen de aminoácidos que codifican una región estrecha en el extremo carboxi terminal del ADNc de PH20

ES 2 335 005 T3

humana. También se proporcionan modificaciones adicionales de la sHASEGP para aumentar la secreción mediante el uso de péptidos líder no nativos. Se proporcionan además métodos para modificar la sHASEGP para prolongar su semivida a modo de enmascaramiento de la proteína con polietilenglicol y modificaciones postraduccionales respecto a la glicosilación nativa. Los intentos previos para generar una sHASEGP humana secretada activa a pH neutro no tuvieron éxito. Se concluyó que los truncamientos del polipéptido sHASEGP humano daban como resultado tanto una pérdida de actividad enzimática a pH neutro como una incapacidad de las células para secretar la proteína recombinante en sistemas de expresión en mamíferos (Arming, *et al* Eur J Biochem 1 de agosto de 1997; 247 (3): 810-4). Es crítico generar una sHASEGP secretada que actúe a pH neutro para la producción comercial y la utilidad terapéutica como hialuronidasa. La invención, descrita en este documento, supera dichos retos.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una glicoproteína sustancialmente purificada que comprende un polipéptido hialuronidasa soluble activo a pH neutro que contiene al menos un resto azúcar ligado a N, estando el resto azúcar ligado a N unido covalentemente a un resto asparagina del polipéptido; la glicoproteína sustancialmente purificada comprende una secuencia de aminoácidos incluida en la SEC ID N°: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 91% con una secuencia de aminoácidos incluida en la SEC ID N°: 1; y la glicoproteína sustancialmente purificada es soluble. Los estudios que se muestran en este documento demuestran que la PH20 humana requiere glicanos ligados a N para la actividad catalítica, mientras que las hialuronidasas bovina y de veneno de abeja permanecen activas sin dichos glicanos ligados a N. Un dominio hialuronidasa humano desprovisto de restos ligados a N es catalíticamente inactivo. Por lo tanto, la tecnología de ADN recombinante clásica no permite la producción de una sHASEGP humana catalíticamente activa, a diferencia de la HASEGP de veneno de abeja, que puede producirse en *E. coli*.

La invención incluye métodos y células para la generación de un polipéptido glicoproteico sHASEGP ligado a N mediante el uso de una célula capaz de introducir dichos restos de azúcares ligados a N o por introducción de dichos restos ligados a N en un polipéptido sHASEGP. Se describen adicionalmente métodos para identificar apropiadamente sHASEGP glicosilados.

Se proporcionan modificaciones de sHASEGP para prolongar adicionalmente la semivida. Se proporcionan modificaciones químicas de una sHASEGP con polímeros tales como polietilenglicol y dextrano. Dichas modificaciones protegen a la sHASEGP de su eliminación de la circulación y del sistema inmune, así como receptores de glicosilación para manosa y asialoglicoproteína. Se proporcionan además métodos para unir a grupos funcionales específicos, tales como sitios de glicosilación, aminoácidos cargados positivamente y cisteínas.

También se proporcionan en este documento ensayos para identificar efectores, tales como compuestos, incluyendo moléculas pequeñas, y condiciones, tales como pH, temperatura y fuerza iónica, que modulan la activación, expresión o actividad de sHASEGP. En ensayos ejemplares, se evalúan los efectos de compuestos de ensayo sobre la capacidad de un dominio hialuronidasa de sHASEGP para escindir un sustrato conocido, típicamente un glicosaminoglicano o proteoglicano. Los agentes, generalmente compuestos, particularmente moléculas pequeñas, que modulan la actividad del dominio hialuronidasa son compuestos candidato para modular la actividad de la sHASEGP. Los dominios hialuronidasa también pueden usarse para producir anticuerpos específicos de hialuronidasa con actividad de alteración de la función. Los dominios hialuronidasa proporcionados en este documento incluyen, pero sin limitación, el dominio glicosil-hidrolasa N-terminal con porciones C-terminales del mismo truncadas que presenta actividad catalítica *in vitro*.

También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas y dominios hialuronidasa. Se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican un dominio hialuronidasa soluble o porciones catalíticamente activas del mismo y también los que codifican la sHASEGP de longitud completa. El ácido nucleico que codifica el dominio hialuronidasa y el ácido nucleico cadena abajo se exponen en la SEC ID N°: 6; y el dominio hialuronidasa de sHASEGP se expone en la SEC ID N°: 1 (aminoácidos 35-464). La secuencia proteica y la secuencia de ácido nucleico codificante de la sHASEGP de longitud completa se exponen en las SEC ID N°:1 y 6.

También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que hibridan con dicho ácido nucleico codificante de sHASEGP a lo largo de su longitud completa o a lo largo de al menos aproximadamente el 70%, 80% o 90% de la longitud completa y codifican el dominio hialuronidasa o una porción del mismo. La hibridación se efectúa generalmente en condiciones de rigurosidad al menos reducida, generalmente al menos moderada y con frecuencia elevada.

El fragmento de ácido nucleico aislado es ADN, incluyendo genómico o ADNc, o es ARN o puede incluir otros componentes, tales como ácido peptidonucleico u otros análogos de nucleótidos. El ácido nucleico aislado puede incluir componentes adicionales, tales como promotores heterólogos o nativos y otras secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción, estos genes pueden unirse a otros genes, tales como genes indicadores u otros genes indicadores o genes que codifican indicadores.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que incluye la secuencia de moléculas que es complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica sHASEGP o la porción de la misma.

También se proporcionan fragmentos de los mismos u oligonucleótidos que pueden usarse como sondas o cebadores y que contienen al menos aproximadamente 10, 14, 16 nucleótidos, generalmente menos de 1000 o menos de o igual a 100, expuestos en la SEC ID N°: 6 (o la complementaria de la misma); o contienen al menos aproximada-

ES 2 335 005 T3

mente 30 nucleótidos (o la complementaria de los mismos) o contienen oligonucleótidos que hibridan a lo largo de su longitud completa (o al menos aproximadamente el 70, 80 o 90% de la misma) con cualquiera de dichos fragmentos u oligonucleótidos. La longitud de los fragmentos está en función del propósito para el que se usen y/o de la complejidad del genoma de interés. Generalmente las sondas y cebadores contienen menos de aproximadamente 50, 150 ó 500 nucleótidos.

También se proporcionan plásmidos que contienen cualquiera de las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en este documento. También se proporcionan células que contienen los plásmidos. Dichas células incluyen, pero sin limitación, células bacterianas, células de levaduras, células fúngicas, células vegetales, células de insecto y células animales.

También se proporcionan sistemas de expresión en mamíferos potenciados usando líderes de señal capaces de una secreción eficaz de sHASEGP. Un ejemplo de dicha secuencia de aminoácidos de péptido líder secretor eficaz y de la proteína de fusión con sHASEGP se encuentra en las SEC ID N°: 43 y 46.

También se proporciona un método para producir una glicoproteína sustancialmente purificada que comprende introducir un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención unido operativamente a un promotor adecuado en una célula capaz de incorporar restos de azúcares ligados a N en el polipéptido; cultivar la célula en condiciones por las que se exprese por la célula un polipéptido codificado; y recuperar el polipéptido o polipéptidos expresados.

También se proporcionan células, generalmente células eucariotas, tales como células de mamífero y células de levadura, en las que el polipéptido sHASEGP se expresa en la superficie de las células. Dichas células se usan en ensayos de selección de fármacos para identificar compuestos que modulan la actividad del polipéptido sHASEGP. Estos ensayos, incluyendo ensayos de unión *in vitro*, y ensayos basados en transcripción en los que se evalúa la transducción de señales mediada directa o indirectamente, tal como por activación de factores procrecimiento, por la sHASEGP.

También se proporcionan péptidos codificados por dichas moléculas de ácido nucleico. Entre esos polipéptidos se incluye el dominio hialuronidasa de sHASEGP o un polipéptido con cambios de aminoácidos de modo que la especificidad y/o actividad hialuronidasa permanezca sustancialmente sin cambios. En particular, se proporciona una glicoproteína sHASEGP de mamífero sustancialmente purificada que incluye una forma secretada catalíticamente activa a pH neutro.

La invención también incluye un dominio catalítico hialuronidasa y puede incluir además otros dominios. La sHASEGP puede formar homodímeros y también puede formar heterodímeros con alguna otra proteína, tal como una proteína unida a membrana. También se proporciona una glicoproteína sustancialmente purificada que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% con la sHASEGP, determinándose el porcentaje de identidad usando algoritmos y penalizaciones por huecos convencionales que maximizan el porcentaje de identidad.

Se contemplan en este documento variantes de corte y empalme de la sHASEGP, particularmente aquellos con un dominio hialuronidasa catalíticamente activo.

En otras realizaciones, se proporcionan polipéptidos sustancialmente purificados que incluyen un dominio hialuronidasa de un polipéptido sHASEGP o una porción catalíticamente activa del mismo, pero que no incluyen la secuencia completa de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1. Entre estos hay polipéptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% o 100% con la SEC ID N°: 1 ó 3.

En una realización específica, se proporciona un ácido nucleico que codifica una glicoproteína hialuronidasa eucariota denominada sHASEGP. En particular, el ácido nucleico incluye la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 6, particularmente expuesta como los nucleótidos 106-1446 de la SEC ID N°: 6 o una porción de la misma que codifique un polipéptido catalíticamente activo.

También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que hibridan en condiciones de rigurosidad al menos reducida, generalmente rigurosidad moderada, más típicamente rigurosidad elevada con la SEC ID N°: 6 o secuencias degeneradas de la misma.

En una realización, el fragmento de ácido nucleico aislado hibrida con una molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 6 (o secuencias degeneradas de la misma) en condiciones de alta rigurosidad. Una sHASEGP de longitud completa se expone en la SEC ID N°: 1 y está codificada por la SEC ID N°: 6 o secuencias degeneradas de la misma.

También se proporcionan muteínas del dominio hialuronidasa de sHASEGP, particularmente muteínas en las que el resto Cys en el dominio hialuronidasa que está libre, es decir, que no forma enlaces disulfuro con ningún otro resto Cys en el dominio hialuronidasa, se sustituye con otra sustitución de aminoácido, típicamente, aunque no necesariamente, con una sustitución de aminoácido conservativo o una sustitución que no elimine la actividad, y muteínas en las que se elimina un sitio o sitios de glicosilación específicos.

ES 2 335 005 T3

Se proporcionan en este documento polipéptidos sHASEGP, incluyendo pero sin limitación, variantes de corte y empalme de la misma y ácidos nucleicos que codifican sHASEGP y dominios, derivados y análogos de la misma. También se proporcionan glicoproteínas hialuronidasa secretadas de cadena sencilla que tienen un extremo N-terminal funcionalmente equivalente al generado por activación de una peptidasa señal para formar sHASEGP. Existen siete sitios de glicosilación ligados a N potenciales en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de la sHASEGP como se ejemplifica en la SEC ID N°: 1. Se forman enlaces disulfuro entre los restos Cys C60-C351 y los restos Cys C224 a C238 para formar el dominio hialuronidasa de núcleo. Sin embargo, son necesarias cisteínas adicionales en el extremo carboxi terminal para una actividad catalítica enzimática a pH neutro, de modo que la sHASEGP de los aminoácidos 36 a Cys 464 en la SEC ID N°:1 comprende el dominio hialuronidasa de sHASEGP humana mínimamente activo. Por lo tanto, el sitio de glicosilación ligado a N N-490 no es necesario para una actividad de sHASEGP apropiada.

La glicosilación ligada a N de la sHASEGP es crítica para su actividad catalítica y su estabilidad. Mientras que la alteración del tipo de glicano que modifica una glicoproteína puede tener efectos drásticos sobre la antigenicidad, plegamiento estructural, solubilidad y estabilidad de una proteína, se piensa que la mayoría de las enzimas no requieren glicosilación para una actividad enzimática óptima. Por lo tanto, las sHASEGP son únicas a este respecto, de modo que la eliminación de la glicosilación ligada a N puede dar como resultado una inactivación casi completa de la actividad hialuronidasa. La presencia de glicanos ligados a N es crítica para generar una sHASEGP activa. Se incluyen sistemas de expresión de proteínas adecuados para la introducción de restos de glicosilación ligados a N críticos en sHASEGP. Además, se incluye la introducción de polipéptido sHASEGP desglicosilado en presencia de extractos capaces de introducir glicanos ligados a N. En un aspecto de la invención, se describe una glicosilación compleja protegida terminalmente con sialación, aunque también se contemplan otras protegidas terminalmente con restos manosa libres. Preferiblemente, se encuentran restos de ácido siálico en los restos terminales de glicosilación ligada a N en sHASEGP.

Los oligosacáridos ligados a N se incluyen en varios tipos principales (de oligomanosa, complejos, híbridos, sulfatados), teniendo todos núcleos de 3-GlcNAc-GlcNAc (Man) unidos mediante el nitrógeno amida de restos Asn que se incluyen en secuencias -Asn-Xaa-Thr/Ser- (en las que Xaa no es Pro). Se ha descrito la glicosilación en un sitio -Asn-Xaa-Cys- para proteína de coagulación C. Con frecuencia se asignan indirectamente los sitios ligados N por aparición de un ciclo "en blanco" durante la secuenciación. La identificación positiva puede realizarse después de la liberación del oligosacárido por PNGasa F, que convierte la Asn glicosilada en Asp. Después de la liberación por PNGasa F, los oligosacáridos ligados a N pueden purificarse usando cromatografía Bio-Gel P-6, sometándose la combinación de oligosacáridos a cromatografía preparativa de intercambio aniónico a pH elevado (HPAEC) (Townsend *et al.*, (1989) Anal. Biochem. 182, 1-8). Se pueden resolver ciertos isómeros de oligosacáridos usando HPAEC. Los restos fucosa desplazarán las posiciones de elución antes en el cromatograma de HPAEC, mientras que los restos ácido siálico adicionales aumentarán el tiempo de retención. El tratamiento simultáneo de glicoproteínas cuyas estructuras de oligosacáridos se conocen (por ejemplo, fetuina bovina, glicoproteína ácida α -1, ovoalbúmina, ARNasa B, transferrina) puede facilitar la asignación de los picos de oligosacáridos. Los oligosacáridos recogidos pueden caracterizarse por una combinación de análisis de composición y de enlaces por metilación (Waeghe *et al.*; (1983), Carbohydr Res. 123, 281-304), asignándose las configuraciones anoméricas mediante espectroscopía de RMN (Van Halbeek (1993) en Methods Enzymol 230).

También se proporcionan formulaciones de sHASEGP. Pueden formularse sHASEGP en formas liofilizadas y soluciones estabilizadas. Las formulaciones que contienen iones metálicos específicos, tales como calcio, magnesio o sodio son útiles para una actividad óptima a pH neutro. Además de formulaciones en solución estabilizadas, se contemplan en este documento formulaciones de liberación lenta para una eliminación prolongada de glicosaminoglicanos. También se proporcionan en este documento kits que proporcionan jeringas preenvasadas de sHASEGP para la administración de pequeños volúmenes de sHASEGP para procedimientos quirúrgicos intraoculares y otros procedimientos de volúmenes pequeños. También se proporcionan formulaciones salinas equilibradas para uso *ex vivo* en procedimientos de tecnología reproductiva artificial.

También se proporciona el uso de sHASEGP en la eliminación de glicosaminoglicanos. Las sHASEGP abren canales en el espacio intersticial a través de la degradación de glicosaminoglicanos que permiten la difusión de moléculas de un tamaño menor de 500 nm. Estos canales permanecen durante un período de 24-48 horas dependiendo de la dosis y de la formulación. Dichos canales pueden usarse para facilitar la difusión de moléculas añadidas exógenamente tales como fluidos, moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos y vectores de terapia génica y otras moléculas de un tamaño inferior a 500 nm.

Las sHASEGPS también pueden usarse para eliminar glicosaminoglicanos en exceso tal como los que aparecen después de isquemia-reperusión, inflamación, arterioesclerosis, edema, cáncer, lesión de médula espinal y otras formas de cicatrización. En algunos casos, las sHASEGP pueden administrarse por vía sistémica mediante infusión intravenosa. Esto puede ser útil cuando el acceso local no está fácilmente disponible, tal como el corazón o el cerebro o en el caso de una neoplasia diseminada, en la que la enfermedad está por todo el cuerpo. Son preferibles sHASEGP supersialadas para aumentar la semivida en suero y la distribución sobre enzimas hialuronidasa nativas que carecen de ácidos siálicos terminales.

En algunos casos, tales como lesión de médula espinal, glaucoma y tratamientos cosméticos, se prefiere un suministro sostenido.

En otras indicaciones, es preferible una sola dosis de acción corta. La eliminación temporal de glicosaminoglicanos puede usarse para aumentar el suministro de soluciones y fármacos en espacios intersticiales. Esto puede ser útil para la difusión de anestesia y para la administración de fluidos, moléculas y proteínas terapéuticas. La administración subcutánea e intramuscular de moléculas en presencia de sHASEGP también facilita su distribución sistémica más rápidamente. Dichos métodos son muy útiles cuando el acceso intravenoso no está disponible o cuando es necesario un suministro sistémico más rápido de moléculas. El suministro de otras moléculas de gran tamaño, tales como Factor VIII, que están escasamente biodisponibles tras la administración subcutánea, puede inyectarse con sHASEGP para aumentar su disponibilidad.

También se proporcionan usos de sHASEGP para la eliminación enzimática de la matriz del cumulus que rodea los ovocitos. La eliminación de la matriz del cumulus usando una sHASEGP purificada sin los contaminantes tóxicos de la hialuronidasa obtenida de extractos permite una recuperación más suave del ovocito con mayores viabilidades. Además, pueden prepararse sHASEGP sin el uso de extractos de ganado u otros organismos que llevan virus y otros patógenos tales como encefalopatías espongiiformes transmisibles.

También pueden usarse inyecciones de pequeños volúmenes de sHASEGP para uso intraocular para espacios pequeños. Pueden inyectarse sHASEGP en la cámara anterior del ojo para eliminar sustratos viscoelásticos en exceso que se administran durante la cirugía. La inyección intraocular de sHASEGP también puede usarse para reducir la presión intraocular en el glaucoma, para disolver agregados vítreos, o "desprendimientos", para limpiar una hemorragia de humor vítreo, para el tratamiento de la degeneración macular, para promover el desprendimiento de vitreorretinal en la retinopatía diabética y mezclarse con otras enzimas para promover la reformación de la córnea junto con lentes correctoras. Se reconocerá que en algunos casos, el uso de una sHASEGP de larga duración tal como una sHASEGP pegilada será deseable.

Pueden imaginarse coformulaciones de sHASEGP con otras sustancias para plumas inyectables para volúmenes pequeños o administración subcutánea rápida. Pueden formularse ejemplos tales como Epipen®, insulina y otros fluidos. Los métodos de la invención incluyen administración del polipéptido sHASEGP o composiciones farmacéuticas que contienen sHASEGP antes de, simultáneamente con o después de la administración de otras moléculas terapéuticas. La sHASEGP puede administrarse en un sitio diferente del sitio de administración de la molécula terapéutica o la sHASEGP puede administrarse en el mismo sitio que el sitio de administración de la molécula terapéutica.

Por lo tanto, se proporciona en este documento una familia de glicoproteínas hialuronidasas secretadas activas a pH neutro eucariotas denominadas sHASEGP y dominios funcionales, especialmente dominios hialuronidasa (o catalíticos) de las mismas, mutéfnas y otros derivados y análogos de las mismas. También se proporcionan en este documento ácidos nucleicos que codifican las sHASEGP. Además se proporcionan formulaciones y usos de dichas sHASEGP para tratar enfermedades y para el uso como enzimas modificadoras de tejidos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un mapa de vector del vector HZ24 de sHASEGP.

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un especialista en la técnica a la que pertenece la invención o invenciones. Todas las patentes, solicitudes de patentes, solicitudes publicadas y publicaciones, secuencias de Genbank, páginas web y otros materiales publicados a los que se hace referencia por toda la descripción de este documento, a menos que se indique otra cosa, se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de que exista una pluralidad de definiciones para los términos de este documento, prevalecen las de esta sección.

Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección de este tipo, se entiende que dichos identificadores pueden cambiar y que información particular en internet puede ir y venir, pero puede encontrarse información equivalente buscando en internet. La referencia a las mismas prueba la disponibilidad y la difusión pública de dicha información.

Como se usan en este documento, las abreviaturas para cualquier grupo protector, aminoácido y otros compuestos están, a menos que se indique otra cosa, de acuerdo con el uso común, abreviaturas reconocidas, o la TUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (véase, (1972) Biochem. 11: 942-944).

Como se usa en este documento, la hialuronidasa eucariota se refiere a una familia diversa de endoglucosaminidasas de glicosaminoglicanos en las que un resto glutamato en la hialuronidasa hidroliza los enlaces beta 1,4 del hialuronano y sulfatos de condroitina a través de un mecanismo catalítico ácido-base.

Son de interés particular las sHASEGP de origen de mamíferos, incluyendo seres humanos. Los especialistas en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de un solo aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson *et al.*, (1987) Molecular Biology of the Gene, 4ª Edición, The Benjamin/Cummings Pub. co., pág. 224).

ES 2 335 005 T3

Como se usa en este documento, una sHASEGP anclada a membrana, se refiere a una familia de hialuronidasas ancladas a membrana que comparten características estructurales comunes como se describen en este documento.

5 Como se usa en este documento, una hialuronidasa soluble se refiere a un polipéptido caracterizado por su solubilidad en condiciones fisiológicas. La HASEGP soluble puede diferenciarse por ejemplo por su reparto en la fase acuosa de una solución de Triton X-114 calentada a 37°C (Bordier *et al* J Biol Chem., 25 de febrero de 1981; 256 (4): 1604-7). Por otro lado, la HASEGP anclada por lípidos se repartirá en la fase rica en detergente, pero se repartirá en la fase pobre en detergente o acuosa después el tratamiento con fosfolipasa C.

10 Por lo tanto, la referencia, por ejemplo, a “sHASEGP” incluye todas las glicoproteínas codificadas por la familia de genes de sHASEGP incluyendo, pero sin limitación: sHASEGP humana, sHASEGP de ratón o una molécula equivalente obtenida de cualquier otra fuente o que se ha preparado de forma sintética o que presenta la misma actividad. Las secuencias de moléculas de ácido nucleico codificantes y las secuencias de aminoácidos codificadas de sHASEGP ejemplares y/o dominios de las mismas se exponen, por ejemplo, en la SEC ID N°: 4. El término también incluye sHASEGP con sustituciones de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad de cada miembro y también incluye variantes de corte y empalme de las mismas. Los especialistas en esta técnica conocen sustituciones adecuadas, incluyendo, aunque no necesariamente, sustituciones conservativas de aminoácidos, y pueden realizarse sin eliminar la actividad biológica, tal como la actividad catalítica de la molécula resultante.

20 Como se usa en este documento, una sHASEGP, cada vez que se hace referencia a la misma en este documento, incluye un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos incluida en la SEC ID N°: 1; o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 91% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1.

25 En particular, se describe el polipéptido sHASEGP con los dominios hialuronidasa que se indican en la SEC ID N°: 4. El polipéptido es un polipéptido de una o dos cadenas. También se proporcionan porciones más pequeñas del mismo que conservan la actividad hialuronidasa. Los dominios hialuronidasa de las sHASEGP varían en tamaño y constitución, incluyendo inserciones y deleciones en bucles superficiales. Por lo tanto, para los fines de este documento, el dominio catalítico es una porción de una sHASEGP, como se define en este documento, y es homólogo a un dominio de otras secuencias de tipo hialuronidasa, tales como HYAL1, HYAL2, HYAL3, que se han identificado previamente; no se reconoció sin embargo, que una forma de cadena sencilla aislada del dominio hialuronidasa humano pudiera funcionar en ensayos *in vitro*. Los restos aspartato y glutamato necesarios para la actividad están presentes en motivos conservados.

35 Como se usa en este documento, un “dominio hialuronidasa neutro de una sHASEGP soluble” se refiere a un dominio beta-1,4-endoglucosaminidasa de una sHASEGP que presenta actividad hialuronidasa a pH neutro, es soluble en condiciones como se describen y comparte homología y características estructurales con los dominios hialuronidasa de la familia de glicosil-hidrolasas pero contiene secuencias adicionales en el extremo carboxi terminal que son necesarias para la actividad a pH neutro. Por tanto, es al menos la porción mínima del dominio que presenta actividad hialuronidasa como se evalúa mediante ensayos *in vitro* convencionales y permanece soluble. Se contemplan en este documento dichos dominios hialuronidasa y porciones catalíticamente activas de los mismos. También se proporcionan formas truncadas del dominio hialuronidasa que incluyen el fragmento más pequeño del mismo que actúa catalíticamente como una forma de cadena sencilla.

45 Un dominio hialuronidasa de una sHASEGP, cada vez que se hace referencia al mismo en este documento, incluye al menos una o todas de o cualquier combinación de o una porción catalíticamente activa de: un polipéptido glicoproteico ligado a N que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1; un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones de rigurosidad reducida, moderada o elevada con la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 6; un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1; un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1; y/o un dominio hialuronidasa de un polipéptido codificado por una variante de corte y empalme de la sHASEGP.

55 Por lo tanto, para los fines de este documento, el dominio hialuronidasa es una porción de una sHASEGP, como se define en este documento, y es homólogo a un dominio de otras sHASEGP. Como con la clase más grande de enzimas de la familia de hialuronidasas, los dominios catalíticos de sHASEGP comparten un alto grado de identidad de secuencia de aminoácidos. Los restos Asp y Glu necesarios para la actividad están presentes en motivos conservados.

60 Por forma activa se entiende una forma activa *in vivo* y/o *in vitro*. Como se describe en este documento, el dominio hialuronidasa también puede existir como una glicoproteína secretada soluble. Se muestra en este documento que, al menos *in vitro*, las formas de cadena sencilla de las sHASEGP y los dominios catalíticos o porciones enzimáticamente activas de las mismas (típicamente truncamientos C-terminales) presentan actividad hialuronidasa. Por lo tanto, se proporcionan en este documento formas aisladas de los dominios hialuronidasa de sHASEGP y su uso en ensayos de selección de fármacos *in vitro* para la identificación de agentes que modulen la actividad de las mismas.

65 Como se usa en este documento, el dominio catalíticamente activo de una sHASEGP se refiere al dominio endoglucosaminidasa activo a pH neutro como se define por la actividad *in vitro* hacia un sustrato de glicosaminoglicano.

ES 2 335 005 T3

Las sHASEGP de interés incluyen las que son activas frente a sulfatos de condroitina y proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) *in vivo* e *in vitro*; y las que son activas frente a hialuronano. Como se usa en este documento, una sHASEGP humana es una codificada por un ácido nucleico, tal como ADN, presente en el genoma de un ser humano, incluyendo todas las variantes alélicas y variaciones conservativas siempre que no sean variantes que se encuentren en otros mamíferos.

Como se usa en este documento, un ácido nucleico que codifica un dominio hialuronidasa o porción catalítica activa de una “sHASEGP” debe interpretarse que se refiere a un ácido nucleico que codifica sólo el dominio hialuronidasa de cadena sencilla detallado o una porción activa del mismo y no las otras porciones contiguas de la sHASEGP como una secuencia continua.

Como se usan en este documento, los términos “enfermedad” o “trastorno” se refieren a una afección patológica en un organismo que es el resultado de, por ejemplo, una infección o defecto genético, y que se caracteriza por síntomas identificables.

Como se usa en este documento, una variante de corte y empalme se refiere a una variante producida por procesamiento diferencial de un transcrito primario de ácido nucleico genómico, tal como ADN, que da como resultado más de un tipo de ARNm. Se proporcionan en este documento variantes de corte y empalme de sHASEGP.

Como se usa en este documento, el dominio hialuronidasa de una proteína sHASEGP se refiere al dominio hialuronidasa de una sHASEGP que presenta una actividad endoglucosaminidasa a pH neutro. Por lo tanto, es al menos la porción mínima de la proteína que presenta actividad endoglucosaminidasa como se evalúa por ensayos convencionales *in vitro*. Los dominios hialuronidasa humanos ejemplares incluyen al menos una porción suficiente de secuencias de aminoácidos expuestas en la SEC ID N°: 4 que presentan actividad endoglucosaminidasa.

También se contemplan moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene actividad endoglucosaminidasa en un ensayo hialuronidasa *in vitro* y que tienen una identidad de secuencia de al menos el 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86 %, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la longitud completa de un dominio hialuronidasa de un polipéptido sHASEGP, o que hibrida a lo largo de su longitud completa o a lo largo de al menos aproximadamente el 70%, 80% o 90% de la longitud completa con un ácido nucleico que codifica un dominio hialuronidasa, particularmente en condiciones de rigurosidad moderada, generalmente elevada.

Para los dominios hialuronidasa, los restos en la región N-terminal pueden ser críticos aunque no suficientes para su actividad. Se muestra en este documento que el dominio hialuronidasa de la sHASEGP es catalíticamente activo. Por lo tanto, el dominio hialuronidasa requiere generalmente los aminoácidos N-terminales del mismo para su actividad; la porción C-terminal puede estar truncada hasta el último resto cisteína aunque requiere aminoácidos adicionales para ser óptimamente activa. La cantidad que puede eliminarse puede determinarse empíricamente ensayando el polipéptido para determinar su actividad hialuronidasa en un ensayo *in vitro* que evalúe la escisión catalítica.

Por lo tanto, se contemplan porciones más pequeñas de los dominios hialuronidasa, particularmente los dominios de cadena sencilla de la misma que conservan actividad hialuronidasa. Dichas versiones más pequeñas son generalmente versiones truncadas C-terminales de los dominios hialuronidasa. Los dominios hialuronidasa varían en tamaño y constitución, incluyendo inserciones y deleciones en bucles superficiales. Dichos dominios presentan una estructura conservada, incluyendo al menos una característica estructural, tal como el donador de protones y/o otras características de dominios hialuronidasa de endoglucosaminidasas. Por lo tanto, para los fines de este documento, el dominio hialuronidasa es una porción de cadena sencilla de una sHASEGP, como se define en este documento, pero es homólogo en sus características estructurales y en la retención de una similitud u homología de secuencia con el dominio hialuronidasa de otras secuencias de tipo hialuronidasa. La glicoproteína presenta actividad hialuronidasa como una cadena sencilla.

Como se usa en este documento, por homólogo se entiende una identidad de secuencia de ácido nucleico superior al 25%, tal como del 25%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%. Si es necesario, se especificará el porcentaje de homología. Los términos “homología” e “identidad” se usan con frecuencia indistintamente. En general, las secuencias se alinean de modo que se obtenga el mayor orden de coincidencias (véase, por ejemplo, Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part/, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carillo *et al.* (1988) *et al.* (1988) *Slam J Applied Math* 48]: 1073).

Mediante la identidad de secuencia, se determina el número de aminoácidos conservados mediante programas de algoritmos de alineamiento convencionales y se usan con las penalizaciones por huecos por defecto establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas hibridarían típicamente a una rigurosidad moderada o a una rigurosidad elevada a todo lo largo de la longitud del ácido nucleico o a lo largo de al menos aproximadamente el 70%, 80% o 90% de la molécula de ácido nucleico de longitud completa de interés. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que contienen codones degenerados en lugar de codones en la molécula de ácido nucleico que hibrida.

Puede determinarse si dos moléculas de ácido nucleico cualesquiera tienen secuencias de nucleótidos que tienen una “identidad” de al menos, por ejemplo, el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% usando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa “FASTA”, usando por ejemplo los parámetros por defecto como en Pearson *et al* (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85]: 2444 (otros programas incluyen el paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al*, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S] [F.], [et al, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990), Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, y [CARRILLO ETA/.] (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Por ejemplo, la función BLAST de la base de datos del National Center for Biotechnology Information puede usarse para determinar la identidad. Otros programas disponibles en el mercado o públicamente incluyen, el PROGRAMA “MEGALIGN” de DNASTAR (Madison, WI) y el programa “Gap” del University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG) (Madison, WI). Puede determinarse el porcentaje de homología o identidad de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, por comparación de la información de secuencia usando un programa informático GAP, por ejemplo, Needleman *et al*. (1970), J Mol Biol. 48: 443, según se revisó por Smith y Waterman Adv. Appl. Matemáticas (1981) 2:482). En resumen, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son similares, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unitaria (que contiene un valor de 1 para identidades y de 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov *et al* (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745, como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 por cada hueco y una penalización adicional de 0,10 por cada símbolo en cada hueco; y (3) ninguna penalización por huecos terminales. Por lo tanto, como se usa en este documento, el término “identidad” representa una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de ensayo y uno de referencia.

Como se usa en este documento, la expresión “identidad de al menos el 90% con” se refiere a porcentajes de identidad del 90 al 99,99 respecto a los polipéptidos de referencia. Una identidad a un nivel del 90% o más es indicativa del hecho de que, suponiendo para fines de ejemplificación que se compara una longitud de polinucleótido de ensayo y de referencia de 100 aminoácidos. No más del 10% (es decir, 10 de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de ensayo difieren de los del polipéptido de referencia. Pueden realizarse comparaciones similares entre polinucleótidos de ensayo y de referencia. Dichas diferencias pueden representarse como mutaciones puntuales distribuidas aleatoriamente a lo largo de la longitud completa de una secuencia de aminoácidos o pueden agruparse en una o más localizaciones de longitud variable hasta el máximo permisible, por ejemplo, una diferencia de 10/100 aminoácidos (una identidad de aproximadamente el 90%). Las diferencias se definen como sustituciones o deleciones de ácidos nucleicos o aminoácidos. A nivel de homologías o identidades por encima de aproximadamente el 85-90%, el resultado debería ser independiente del programa y del ajuste de parámetros por huecos; dichos altos niveles de identidad pueden evaluarse fácilmente, con frecuencia sin depender de un programa informático.

Como se usa en este documento, un cebador se refiere a un oligonucleótido que contiene dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, típicamente más de tres, a partir del que puede iniciarse la síntesis de un producto de extensión de cebador. Las condiciones experimentales que llevan a la síntesis incluyen la presencia de nucleósidos trifosfato y un agente para la polimerización y la extensión, tal como una ADN polimerasa y un tampón, temperatura y pH adecuados.

Como se usa en este documento, los animales incluyen cualquier animal, tal como, pero sin limitación, cabras, vacas, ciervos, ovejas, roedores, cerdos y seres humanos. Los animales no humanos, excluyen los seres humanos como el animal contemplado. Las sHASEGP proporcionadas en este documentos son de cualquier origen, animal, vegetal, procariota y fúngico. La mayoría de las sHASEGP son de origen animal, incluyendo origen de mamífero.

Como se usa en este documento, la terapia génica implica la transferencia de un ácido nucleico heterólogo, tal como DNA, a ciertas células, células diana de un mamífero, particularmente un ser humano, con un trastorno o afecciones para las que se busque dicha terapia. El ácido nucleico, tal como ADN, se introduce en las células diana seleccionadas de tal forma que el ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, se expresa y se produce un producto terapéutico codificado por el mismo.

Como alternativa, el ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, puede mediar de alguna forma la expresión de ADN que codifica el producto terapéutico, o puede codificar un producto, tal como un péptido o ARN que de algún modo medie, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. También puede usarse terapia génica para suministrar un ácido nucleico que codifique un producto génico que sustituya a un gen defectuoso o complemente un producto génico producido por el mamífero o la célula en la que se introduce. El ácido nucleico introducido puede codificar un compuesto terapéutico, tal como un inhibidor de factor de crecimiento del mismo, o un factor de necrosis tumoral o inhibidor del mismo, tal como un receptor por lo tanto, que no se produzca normalmente en el hospedador mamífero o que no se produzca en cantidades terapéuticamente eficaces o en un momento terapéuticamente útil. El ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, que codifica el producto terapéutico puede modificarse antes de la introducción en las células del hospedador afectado para aumentar o alterar de otro modo el producto o la expresión del mismo. La terapia génica también puede implicar el suministro de un inhibidor o represor u otro modulador de la expresión génica.

Como se usa en este documento, un ácido nucleico heterólogo es un ácido nucleico que (si es ADN codifica ARN) y proteínas que no se producen normalmente *in vivo* por la célula en la que se expresa o que media o codifica mediadores que alteran la expresión de un ácido nucleico endógeno, tal como ADN, afectando a la transcripción, traducción u otros

ES 2 335 005 T3

procesos bioquímicos regulables. También puede hacerse referencia a un ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, como un ácido nucleico extraño, tal como ADN. Cualquier ácido nucleico, tal como ADN que un especialista en la técnica reconocería o consideraría heterólogo o extraño para la célula en la que se exprese se incluye en este documento mediante la expresión ácido nucleico heterólogo; el ácido nucleico heterólogo incluye un ácido nucleico añadido de forma exógena que también se exprese de forma endógena. Los ejemplos de ácidos nucleicos heterólogos incluyen, pero sin limitación, un ácido nucleico que codifique proteínas marcadoras rastreables, tales como una proteína que confiera una resistencia a fármacos, un ácido nucleico que codifique sustancias terapéuticamente eficaces, tal como agentes anticancerosos, enzimas y hormonas y un ácido nucleico tal como ADN, que codifique otros tipos de proteínas, tales como anticuerpos. Los anticuerpos que están codificados por el ácido nucleico heterólogo pueden secretarse o expresarse en la superficie de la célula en la que se ha introducido el ácido nucleico heterólogo.

Generalmente el ácido nucleico heterólogo no es endógeno para la célula en la que se introduce, pero se ha obtenido de otra célula o se ha preparado sintéticamente.

Generalmente, aunque no necesariamente, dicho ácido nucleico codifica ARN y proteínas que no se producen normalmente por la célula en la que se expresa.

Como se usa en este documento, un producto terapéuticamente eficaz es un producto que está codificado por un ácido nucleico heterólogo, típicamente ADN, que tras la introducción del ácido nucleico en un hospedador, se expresa un producto que mejora o elimina los síntomas, manifestaciones de una enfermedad heredada o adquirida, o que cura la enfermedad.

Como se usa en este documento, relatar que una glicoproteína consiste esencialmente en el dominio hialuronidasa significa que la única porción de sHASEGP del polipéptido es un dominio hialuronidasa o una porción catalítica activa del mismo. El polipéptido puede incluir opcionalmente y generalmente incluirá secuencias de aminoácidos adicionales no derivadas de sHASEGP.

Como se usa en este documento, un dominio se refiere a una porción de una molécula, por ejemplo glicoproteínas o los ácidos nucleicos codificantes, que es estructuralmente y/o funcionalmente diferente de otras porciones de la molécula.

Como se usa en este documento, la hialuronidasa se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis de glicosaminoglicanos.

Para mayor claridad, la referencia a hialuronidasa se refiere a todas las formas, y se designarán específicamente las formas particulares. Para los fines de este documento, el dominio hialuronidasa incluye las formas unida a membrana y soluble de una proteína sHASEGP.

Como se usan en este documento, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo ácidos peptidonucleicos (PNA) y una mezcla de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser mono- o bicatenarios. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, opcionalmente marcados con un marcador detectable tal como un marcador fluorescente o radiomarcador, se contemplan moléculas monocatenarias. Dichas moléculas son típicamente de una longitud tal que su diana es estadísticamente única o de bajo número de copias (típicamente menor de 5, generalmente menor de 3) para sondear o cebar una genoteca. Generalmente una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 ó 30 posiciones contiguas de complementariedad de secuencia con o identidad con un gen de interés. Las sondas y cebadores pueden ser de 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de longitud.

Como se usa en este documento, un ácido nucleico que codifica un fragmento o porción de una sHASEGP se refiere a un ácido nucleico que codifica sólo el fragmento o porción relatada de sHASEGP y no las otras porciones contiguas de la sHASEGP.

Como se usa en este documento, una unión operativa de un ácido nucleico heterólogo con secuencias reguladoras y efectoras de nucleótidos, tales como promotores, potenciadores, sitios de terminación de la transcripción y de la traducción y otras secuencias señal se refiere a la relación entre dicho ácido nucleico, tal como ADN, y dichas secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, la unión operativa de ADN heterólogo a un promotor se refiere a la relación física entre el ADN y el promotor de modo que la transcripción de dicho ADN se inicia a partir del promotor mediante una ARN polimerasa que reconoce específicamente, se une a y transcribe el ADN en la fase de lectura. Por lo tanto, las expresiones unido operativamente o asociado funcionalmente se refieren a la relación funcional de un ácido nucleico, tal como ADN, con secuencias reguladoras y efectoras de nucleótidos tales como promotores, potenciadores, sitios de terminación de la transcripción y de la traducción y otras secuencias señal. Por ejemplo, la unión operativa de ADN a un promotor se refiere a la relación física y funcional entre el ADN y el promotor de modo que la transcripción de dicho ADN se inicia a partir del promotor mediante una ARN polimerasa que reconoce específicamente, se une a y transcribe el ADN. Para optimizar la expresión y/o la transcripción *in vitro* puede ser necesario eliminar, añadir o alterar porciones 5' no traducidas de los clones para eliminar codones de inicio de la traducción (es decir, inicio) extra alternativos potencialmente inapropiados u otras secuencias que pueden interferir con o reducir la expresión, a nivel de transcripción o traducción. Como alternativa, pueden insertarse sitios de unión al ribosoma de consenso (véase, por ejemplo, Kozak J. Biol. Chem. 266: 19867-19870 (1991)) inmediatamente 5' del codón de inicio y pueden aumentar la expresión. Puede determinarse empíricamente cómo de deseable (o necesaria) es dicha modificación.

Como se usa en este documento, una secuencia complementaria con al menos una porción de una ARN, en relación con oligonucleótidos antisentido, se refiere a una secuencia que tiene una complementariedad suficiente para ser capaz de hibridar con el ARN, generalmente en condiciones de rigurosidad moderadas u elevadas, formando un dúplex estable; en el caso de ácidos nucleico antisentido de sHASEGP bicatenarios, puede ensayarse por lo tanto una sola
 5 cadena del dúplex de ADN (o ARNbc) o puede ensayarse la formación de un tríplex. La capacidad para hibridar depende del grado de complementariedad y de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más largo es el ácido nucleico que hibrida, más emparejamientos erróneos de bases con un ARN que codifica sHASEGP puede contener y aún así formar un dúplex estable (o tríplex, según sea el caso). Un especialista en la técnica puede
 10 determinar un grado tolerable de emparejamientos erróneos mediante el uso de procedimientos convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Para los fines de este documento, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos en cualquiera de las sHASEGP y dominios hialuronidasa de las mismas con tal de que la proteína resultante presente actividad hialuronidasa. Las sustituciones de aminoácidos contempladas incluyen sustituciones conservativas, tales como las expuestas en la Tabla 1,
 15 que no eliminan la actividad proteolítica. Como se describen en este documento, también se contemplan sustituciones que alteran propiedades de las proteínas, tales como eliminación de sitios de escisión y otros sitios de este tipo; dichas sustituciones generalmente no son conservativas pero pueden efectuarse fácilmente por los especialistas en la técnica.

Las sustituciones conservativas adecuadas de aminoácidos se conocen por los especialistas en la técnica y pueden realizarse generalmente sin alterar la actividad biológica, por ejemplo, la actividad enzimática de la molécula resultante. Los especialistas en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de un solo aminoácido en regiones no
 20 esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson *et al.* Biology of the Gene, 4^a Edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., pág. 224). También se incluye en la definición el fragmento catalíticamente activo de una sHASEGP, particularmente, una porción hialuronidasa de cadena sencilla. Se realizan sustituciones de aminoácidos conservativas, por ejemplo, de acuerdo con las expuestas en la Tabla 1 de la
 25 forma siguiente:

Tabla 1 Resto original Sustitución conservativa Ala (A) Gly; Ser, Abu Arg (R), Lys, orn Asn (N) Gln; His Cys (C) Ser Gin (Q) Asn Glu (E) ASP Gly (G) Ala; Pro His (H) Asn; Gin He (I), Leu, Val, Met; Nle; Nva Leu (L), Val, Met;
 30 Nle; Nv Lys (K) Arg; Gin; Glu Met (M) Leu, Tyr; Ile; NLe Val Ornitina Lys, Arg Phe (F) Met; Leu, Tyr Ser (S) Thr Thr (T) Ser Trp (W) Tyr Tyr (Y) Trp; Phe Val (V) ILE; Leu; Met; Nle; Nv. También se permiten otras sustituciones y pueden determinarse empíricamente o de acuerdo con sustituciones conservativas conocidas.

Como se usa en este documento, Abu es ácido 2-aminobutírico; Orn es ornitina. Como se usan en este documento, los aminoácidos que aparecen en las diversas secuencias de aminoácidos que aparecen en este documento se identifican de acuerdo con sus abreviaturas de tres letras o de una letra bien conocidas. Los nucleótidos que aparecen en los diversos
 35 fragmentos de ADN se designan con las denominaciones de una sola letra convencionales usadas rutinariamente en la técnica.

Como se usa en este documento, una sonda o cebador basado en una secuencia de nucleótidos descrita en este documento incluye al menos 10, 14, típicamente al menos 16 posiciones contiguas de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N^o: 6, y sondas de al menos 30, 50 ó 100 posiciones contiguas de la secuencia de nucleótidos de la SEC
 40 ID N^o: 6. La longitud de la sonda o cebador para hibridación única está en función de la complejidad del genoma de interés.

Como se usa en este documento, la mejoría de los síntomas de un trastorno particular por administración de una composición farmacéutica particular se refiere a cualquier reducción, ya sea de duración permanente o temporal o transitoria, que pueda atribuirse a o asociarse con la administración de la composición.
 50

Como se usan en este documento, los polinucleótidos antisentido se refieren a secuencias sintéticas de bases de nucleótidos complementarias a ARNm o a la cadena sentido de ADN bicatenario. La mezcla de polinucleótidos sentido y antisentido en condiciones apropiadas conduce a la unión de las dos moléculas o hibridación. Cuando estos polinucleótidos se unen a (hibridan con) ARNm, se produce la inhibición de la síntesis de proteínas (traducción). Cuando
 55 estos polinucleótidos se unen a ADN bicatenario, se produce la inhibición de la síntesis de ARN (transcripción).

La inhibición resultante de la traducción y/o transcripción conduce a una inhibición de la síntesis de la proteína codificada por la cadena sentido. La molécula de ácido nucleico antisentido contiene típicamente un número suficiente de nucleótidos para unirse específicamente a un ácido nucleico diana, generalmente al menos 5 nucleótidos contiguos, con frecuencia al menos 14 ó 16 ó 30 nucleótidos contiguos o nucleótidos modificados complementarios a la porción
 60 codificante de una molécula de ácido nucleico que codifica un gen de interés, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un dominio hialuronidasa de cadena sencilla de una sHASEGP.

Como se usa en este documento, una matriz se refiere a un grupo de elementos, tales como anticuerpos, que contiene tres o más miembros. Una matriz direccionable es una en la que los miembros de la matriz pueden identificarse, típicamente, por su posición en un soporte en fase sólida. Por lo tanto, en general los miembros de la matriz están inmovilizados en loci identificables separados en la superficie de una fase sólida.
 65

ES 2 335 005 T3

Como se usa en este documento, un anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina, ya sea natural o producida parcialmente o totalmente de forma sintética, que incluye cualquier derivado de la misma que conserve la capacidad de unión específica del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo incluye cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo o sustancialmente homólogo a un dominio de unión a inmunoglobulina. Los anticuerpos incluyen miembros de cualquier reivindicación de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

Como se usa en este documento, un fragmento de anticuerpo se refiere a cualquier derivado de un anticuerpo que tiene una longitud inferior a la completa, que conserva al menos una porción de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(AB)₂, Fv de cadena sencilla (scFV), Fv, diacuerpos dsFV y fragmentos Fd. El fragmento puede incluir múltiples cadenas unidas entre sí, tal como mediante puentes disulfuro. Un fragmento de anticuerpo contiene generalmente al menos aproximadamente 50 aminoácidos y, típicamente, al menos 200 aminoácidos.

Como se usa en este documento, un fragmento de anticuerpo Fv está compuesto por un dominio pesado variable (VH) y un dominio ligero variable unidos por interacciones no covalentes.

Como se usa en este documento, un dsFV se refiere a un Fv con un enlace disulfuro intermolecular generado por ingeniería genética.

Como se usa en este documento, un fragmento F(AB)₂ es un fragmento de anticuerpo que es el resultado de la digestión de una inmunoglobulina con pepsina a pH 4,0-4,5; puede expresarse de forma recombinante para producir el fragmento equivalente.

Como se usan en este documento, los fragmentos Fab son fragmentos de anticuerpo que son el resultado de la digestión de una inmunoglobulina con papaína; pueden expresarse de forma recombinante para producir el fragmento equivalente.

Como se usan en este documento, los scFV se refieren a fragmentos de anticuerpo que contienen una cadena ligera variable V y una cadena pesada variable (VH) conectadas covalentemente por un enlazador polipeptídico en cualquier orden. El enlazador es de una longitud tal que los dos dominios variables se enlazan sin una interferencia sustancial. Los enlazadores incluidos son restos (Gly-Ser)_n con algunos restos Glu o Lys dispersados por todos los mismos para aumentar la solubilidad.

Como se usan en este documento, los anticuerpos humanizados se refieren a anticuerpos que están modificados para incluir secuencias de aminoácidos humanas de modo que la administración a un ser humano no provoque una respuesta inmune. Se conocen métodos para la preparación de dichos anticuerpos. Por ejemplo, para producir dichos anticuerpos, el hibridoma u otra célula procariota o eucariota tal como una *E. coli* o una célula CHO, que expresa ese anticuerpo monoclonal se altera mediante técnicas de ADN recombinante para expresar un anticuerpo en el que la composición de aminoácidos de la región no variable esté basada en anticuerpos humanos. Se han diseñado programas informáticos para identificar dichas regiones.

Como se usan en este documento, los diacuerpos son scFV diméricos; los diacuerpos tienen típicamente enlazadores peptídicos más cortos que los scFV y generalmente dimerizan.

Como se usa en este documento, la producción por medios recombinantes mediante el uso de métodos de ADN recombinante se refiere al uso de métodos bien conocidos de biología molecular para expresar proteínas codificadas por ADN clonado.

Como se usa en este documento, el término "evaluar" pretende incluir la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una sHASEGP, o un dominio de la misma, presente en la muestra, y también de obtener un índice, proporción, porcentaje, valor visual o de otro tipo indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta y por supuesto no es necesario que las especies químicas detectadas realmente sean el propio producto de proteólisis, sino que pueden ser por ejemplo un derivado del mismo o alguna sustancia adicional.

Como se usa en este documento, la actividad biológica se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o respuestas fisiológicas que son el resultado de la administración *in vivo* de un compuesto, composición u otra mezcla. La actividad biológica, por lo tanto, incluye los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de dichos compuestos, composiciones y mezclas. Pueden observarse actividades biológicas en sistemas *in vitro* diseñados para ensayar o usar dichas actividades. Por lo tanto, para los fines de este documento, la actividad biológica de una luciferasa es su actividad oxigenasa, por la que, tras la oxidación de un sustrato, se produce luz.

Como se usa en este documento, la actividad funcional se refiere a un polipéptido o porción del mismo que presenta una o más actividades asociadas con una proteína de longitud completa.

Las actividades funcionales incluyen, pero sin limitación, actividad biológica, actividad catalítica o enzimática, antigenicidad (capacidad para unirse o competir con un polipéptido por la unión a un anticuerpo antipolipéptido), inmunogenicidad, capacidad para formar multímeros, capacidad para unirse específicamente a un receptor o ligando para el polipéptido.

ES 2 335 005 T3

Como se usa en este documento, un conjugado se refiere a los compuestos proporcionados en este documento que incluyen una o más sHASEGP, incluyendo una sHASEGP, particularmente dominios hialuronidasa de cadena sencilla de la misma y uno o más agentes de direccionamiento. Estos conjugados incluyen los producidos por medios recombinantes como proteínas de fusión, los producidos por medios químicos, tales como por acoplamiento químico a través de, por ejemplo, acoplamiento a grupos sulfhidrilo y los producidos por cualquier otro método por el que al menos una sHASEGP, o un dominio de la misma, se une directa o indirectamente mediante un enlazador o enlazadores a un agente de direccionamiento.

Como se usa en este documento, un agente de direccionamiento es cualquier resto, tal como una proteína o una porción eficaz de la misma, que proporciona una unión específica del conjugado a un receptor de superficie celular que puede internalizar el conjugado o la porción sHASEGP del mismo. Un agente de direccionamiento también puede ser uno que promueva o facilite, por ejemplo, el aislamiento o la purificación por afinidad del conjugado; la unión del conjugado a una superficie; o la detección del conjugado o complejos que contienen el conjugado.

Como se usa en este documento, un conjugado de anticuerpo se refiere a un conjugado en el que el agente de direccionamiento es un anticuerpo.

Como se usa en este documento, un derivado o análogo de una molécula se refiere a una porción derivada de o una versión modificada de la molécula.

Como se usa en este documento, una cantidad eficaz de un compuesto para tratar una enfermedad particular es una cantidad que es suficiente para mejorar o de algún modo reducir los síntomas asociados con la enfermedad. Dicha cantidad puede administrarse como una sola dosificación o puede administrarse de acuerdo con un régimen, por el que sea eficaz. La cantidad puede curar la enfermedad pero típicamente se administra para mejorar los síntomas de la enfermedad. Puede ser necesaria una administración repetida para conseguir la mejoría deseada de síntomas.

Como se usa en este documento el término equivalente, cuando se refiere a dos secuencias de ácidos nucleicos significa que las dos secuencias en cuestión codifican la misma secuencia de aminoácidos o proteínas equivalentes. Cuando se usa el término equivalente en relación con dos proteínas o péptidos, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos con sólo sustituciones de aminoácidos (tales como, pero sin limitación, cambios conservativos tales como los expuestos en la Tabla 1 anterior) que no alteran sustancialmente la actividad o función de la proteína o péptido. Cuando el término equivalente se refiere a una propiedad, no es necesario que la propiedad esté presente en el mismo grado (por ejemplo, dos péptidos pueden presentar velocidades diferentes del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades son habitualmente sustancialmente iguales. El término complementario, cuando se refiere a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de hibridar, típicamente con menos del 25%, 15%, 5% o 0% de emparejamientos erróneos entre nucleótidos opuestos. Si es necesario, se especificará el porcentaje de complementariedad. Típicamente las dos moléculas se seleccionan de modo que hibridarán en condiciones de alta rigurosidad.

Como se usa en este documento, un agente que modula la actividad de una proteína o la expresión de un gen o ácido nucleico disminuye o aumenta o altera de otro modo la actividad de la proteína o, de algún modo regula positivamente o negativamente o altera de otro modo la expresión del ácido nucleico en una célula.

Como se usa en este documento, un inhibidor de la actividad de una sHASEGP incluye cualquier sustancia que impide o disminuye la producción, modificación o modificaciones postraduccionales, maduración o localización en membrana de la sHASEGP o cualquier sustancia que interfiera con o disminuya la eficacia proteolítica de la misma, particularmente de una forma de cadena sencilla en un ensayo de exploración *in vitro*.

Como se usa en este documento, un método para tratar o prevenir una enfermedad neoplásica se refiere a que cualquiera de los síntomas, tal como el tumor, metástasis del mismo, la vascularización de los tumores u otros parámetros por los que se caracteriza la enfermedad, se reduce, mejora, previene, sitúa en un estado de remisión o se mantiene en un estado de remisión. También significa que los sellos característicos de la enfermedad neoplásica y de la metástasis pueden eliminarse, reducirse o prevenirse mediante el tratamiento. Los ejemplos no limitantes de los sellos característicos incluyen la degradación descontrolada de la membrana basal y de la matriz extracelular proximal, migración, división y organización de las células endoteliales en nuevos capilares funcionales y la persistencia de dichos capilares funcionales.

Como se usan en este documento, las sales farmacéuticamente aceptables, ésteres u otros derivados de los conjugados incluyen cualquier sal, éster o derivado que pueda prepararse fácilmente por los especialistas en esta técnica usando métodos conocidos para dicha derivatización y que producen compuestos que pueden administrarse a animales o seres humanos sin efectos tóxicos sustanciales y que son principios activos farmacéuticos o profármacos.

Como se usa en este documento, un profármaco es un compuesto que, tras la administración *in vivo* se metaboliza o convierte de otro modo en la forma biológicamente, farmacéuticamente o terapéuticamente activa del compuesto. Para producir un profármaco, el compuesto activo farmacéutico se modifica de modo que el compuesto activo se regenera mediante procesos metabólicos. El profármaco puede estar diseñado para alterar la estabilidad metabólica o las características de transporte de un fármaco, para enmascarar efectos secundarios o toxicidad, para mejorar el sabor

de un fármaco o para alterar otras características o propiedades de un fármaco. En virtud de los conocimientos de procesos farmacodinámicos y del metabolismo de fármacos *in vivo*, los especialistas en esta técnica, una vez conocido un compuesto farmacéuticamente activo, pueden diseñar profármacos del compuesto (véase, por ejemplo, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, Nueva York, páginas 388-392).

5 Como se usa en este documento, un fármaco identificado mediante los métodos de selección proporcionados en este documento se refiere a cualquier compuesto que es un candidato para usar como compuesto terapéutico o candidato para el diseño de un compuesto terapéutico. Dichos compuestos pueden ser moléculas pequeñas, incluyendo moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, peptidomiméticos, moléculas antisentido o ARNbc, tal como ARNi, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos recombinantes y otros compuestos de este tipo que pueden servir como candidatos a fármaco o compuestos candidato.

15 Como se usa en este documento, un peptidomimético es un compuesto que mimetiza la conformación y ciertas características estereoquímicas de la forma biológicamente activa de un péptido particular. En general, los peptidomiméticos están diseñados para mimetizar ciertas propiedades deseables de un compuesto, pero no las propiedades indeseables, tales como flexibilidad, que conducen a una pérdida de una conformación biológicamente activa y rotura de enlaces. Pueden prepararse peptidomiméticos a partir de compuestos biológicamente activos por sustitución de ciertos grupos o enlaces que contribuyen a las propiedades indeseables con bioisómeros. Los especialistas en la técnica conocen bioisómeros. Por ejemplo, el bioisómero de metileno CH₂S se ha usado como una sustitución de amida en análogos de encefalina (véase, por ejemplo, Spatola (1983) págs. 267-357 en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Weinstein, Ed. volumen 7, Marcel Dekker, Nueva York). La morfina, que puede administrarse por vía oral, es un compuesto que es un peptidomimético del péptido endorfina. Para los fines de este documento, los péptidos cíclicos se incluyen entre los peptidomiméticos.

25 Como se usa en este documento, una región promotora o elemento promotor se refiere a un segmento de ADN o ARN que controla la transcripción del ADN o ARN al que se une operativamente. La región promotora incluye secuencias específicas que son suficientes para el reconocimiento de una ARN polimerasa, su unión y el inicio de la transcripción.

30 Esta porción de la región promotora se denomina promotor. Además, la región promotora incluye secuencias que modulan esta actividad de reconocimiento, unión e inicio de la transcripción de la ARN polimerasa. Estas secuencias pueden actuar en *cis* o pueden ser sensibles a factores que actúan en *trans*. Los promotores, dependiendo de la naturaleza de la regulación, pueden ser constitutivos o estar regulados. Los promotores ejemplares contemplados para el uso en procariontes incluyen los promotores de bacteriófagos T7 y T3.

35 Como se usa en este documento, un receptor se refiere a una molécula que tiene una afinidad por un ligando dado. Los receptores pueden ser moléculas de origen natural o sintéticas. También puede hacerse referencia a los receptores en la técnica como antiligandos. Como se usan en este documento, los términos receptor y antiligando se usan indistintamente. Pueden usarse receptores en su estado no alterado o como agregados con otras especies. Pueden unirse receptores, covalentemente o no covalentemente, o en contacto físico con, a un miembro de unión, directa o indirectamente a través de una sustancia de unión específica o enlazador. Los ejemplos de receptores incluyen, pero sin limitación: anticuerpos, receptores de membrana celular, receptores de superficie y receptores de internalización, anticuerpos monoclonales y antiseros reactivos con determinantes antigénicos específicos tales como virus, células u otros materiales, fármacos, polinucleótidos, ácidos nucleicos, péptidos, factores, lectinas, azúcares, polisacáridos, células, membranas celulares y orgánulos.

45 Los ejemplos de receptores y aplicaciones que usan dichos receptores incluyen, pero sin limitación: a) enzimas: proteínas de transporte específicas o enzimas esenciales para la supervivencia de microorganismos que podrían servir como dianas para selección de antibióticos [ligando]; b) anticuerpos: puede investigarse la identificación de un sitio de unión a ligando en una molécula de anticuerpo que se combine con el epítipo de un antígeno de interés; la determinación de una secuencia que mimetice un epítipo antigénico puede conducir al desarrollo de vacunas en las que el inmunógeno se basa en una o más de dichas secuencias o conducir al desarrollo de agentes de diagnóstico relacionados o compuestos útiles en tratamientos terapéuticos tales como enfermedades autoinmunes; c) ácidos nucleicos: identificación de ligandos, tales como proteínas o ARN, sitios de unión; d) polipéptidos catalíticos: polímeros, incluyendo polipéptidos que son capaces de promover una reacción química que implica la conversión de uno o más reactivos con uno o más productos; dichos polipéptidos incluyen generalmente un sitio de unión específico para al menos un reactivo o intermedio de reacción y una funcionalidad activa próxima al sitio de unión, en los que la funcionalidad es capaz de modificar químicamente el reactivo unido (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.215.899); e) receptores de hormonas: la determinación de los ligandos que se unen con alta afinidad a un receptor es útil en el desarrollo de terapias de reemplazo de hormonas, por ejemplo, la identificación de ligandos que se unen a dichos receptores puede conducir al desarrollo de fármacos para controlar la presión sanguínea; y f) receptores de opiato: la determinación de ligandos que se unen a los receptores de opiato en el cerebro es útil en el desarrollo de sustitutos menos adictivos para la morfina y fármacos relacionados.

65 Como se usa en este documento, una muestra se refiere a cualquier cosa que puede contener un analito para el que se desee un ensayo de analito. La muestra puede ser una muestra biológica, tal como un fluido biológico o un tejido biológico. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, moco, esperma, líquido amniótico o similares. Los tejidos biológicos son

ES 2 335 005 T3

agregados de células, habitualmente de una clase particular junto con su sustancia intercelular que forma uno de los materiales estructurales de una estructura humana, animal, vegetal, bacteriana, fúngica o viral incluyendo tejidos conjuntivo, epitelial, muscular y nervioso. Los ejemplos de tejidos biológicos también incluyen órganos, tumores, ganglios linfáticos, arterias y células individuales.

5 Como se usa en este documento: la rigurosidad de hibridación en la determinación del porcentaje de emparejamientos erróneos es de la forma siguiente: 1) alta rigurosidad: SSPE 0,1 x, SDS al 0,1%, 65°C 2) rigurosidad media: SSPE 0,2x, SDS al 0,1% SDS, 50°C 3) rigurosidad baja: SSPE 1,0x, SDS al 0,1 %, 50°C. Los especialistas en esta técnica saben que la etapa de lavado selecciona híbridos estables y también conocen los ingredientes del SSPE (véase, por ejemplo, Sambrook, E, F, Fritsch, T, Maniatis, en: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold spring Harbor Laboratory Press 1989 Vol 3, p. B. 13, véanse también numerosos catálogos que describen soluciones de laboratorio usadas comúnmente). El SSPE es NaCl 0,18 tamponado con fosfato a pH 7,4. Además, los especialistas en la técnica reconocen que la estabilidad de híbridos se determina por la Tm, que está en función de la concentración de ión sodio y la temperatura ($T_m = 81,5^\circ\text{C} - 16,6 + 0,41 (\% \text{ G} + \text{C}) - 600/\text{L}$), de modo que los únicos parámetros en las condiciones de lavado críticos para la estabilidad del híbrido son la concentración de ión sodio en el SSPE (o SSC) y la temperatura.

Se entiende que pueden conseguirse rigurosidades equivalentes usando tampones, sales y temperaturas alternativas. A modo de ejemplo y no como limitación, los procedimientos que usan condiciones de baja rigurosidad son de la forma siguiente (véase también Shilo y Weinberg, Proc. Natl. Acad. Sci USA 78: 6789-6792 (1981)): Filtros que contienen ADN se tratan previamente durante 6 horas a 40°C en una solución que contiene formamida al 35%, SSC 5X, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,1%, Ficoll al 0,1%, BSA al 1% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 500 µg/ml. El SSC (10x) es cloruro sódico 1,5 M y citrato de sodio 0,15 M ajustado a un pH de 7.

Las hibridaciones se realizan en la misma solución con las siguientes modificaciones: PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, ADN de esperma 100 VG/M, sulfato de dextrano al 10% (p/v) y se usa sonda marcada con 32P de $5-20 \times 10^6$ cpm. Los filtros se incubaron en mezcla de hibridación durante 18-20 horas a 40°C y después se lavan durante 1,5 horas a 55°C en una solución que contiene SSC 2X, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM y SDS al 0,1%. La solución de lavado se sustituye con solución recién preparada y se incuban 1,5 horas adicionales a 60°C. Los filtros se transfirieron en seco y se exponen a autorradiografía. Si es necesario, los filtros se lavan una tercera vez a 65-68°C y se vuelven a exponer a película. Se conocen bien en la técnica otras condiciones de baja rigurosidad que pueden usarse, por ejemplo, como se emplean para hibridaciones cruzadas entre especies).

A modo de ejemplo, y no como limitación, los procedimientos que usan condiciones de rigurosidad moderada incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, procedimientos que usan dichas condiciones de rigurosidad moderada de la forma siguiente: Filtros que contienen ADN se tratan previamente durante 6 horas a 55°C en una solución que contiene SSC 6X, solución de Denhart 5X, SDS al 0,5% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml. Las hibridaciones se realizan en la misma solución y se usa sonda marcada con 32P $5-20 \times 10^6$. Los filtros se incuban en mezcla de hibridación durante 18-20 horas a 55°C y después se lavan dos veces durante 30 minutos a 60°C en una solución que contiene SSC 1X y SDS al 0,1%. Los filtros se transfirieron en seco y se exponen a autorradiografía. Otras condiciones de rigurosidad moderada que pueden usarse son bien conocidas en la técnica. El lavado de los filtros se realiza a 37°C durante 1 hora en una solución que contiene SSC 2X, SDS al 0,1%.

A modo de ejemplo y no como limitación, los procedimientos que usan condiciones de alta rigurosidad son de la forma siguiente: Se realiza una hibridación previa de filtros que contienen ADN durante de 8 horas a una noche a 65°C en tampón compuesto por SSC 6X, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,02% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 500 µg/ml. Los filtros hibridan durante 48 horas a 65°C en mezcla de prehibridación que contiene ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml y sonda marcada con 32P de $5-20 \times 10^6$ CPM. El lavado de los filtros se realiza a 37°C durante 1 hora en una solución que contiene SSC 2X, PVP al 0,01%, Ficoll al 0,01% y BSA al 0,01%. Esto se sigue de un lavado en SSC 0,1 X a 50°C durante 45 minutos antes de la autorradiografía. Se conocen bien en la técnica otras condiciones de alta rigurosidad que pueden usarse.

El término sustancialmente idéntico o sustancialmente homólogo o similar varía con el contexto como entienden los especialistas en la técnica pertinente, y generalmente se refiere a una identidad de al menos el 60% o 70%, preferiblemente se refiere a de al menos el 80%, el 85% o más preferiblemente a de al menos el 90% y más preferiblemente de al menos el 95%.

Como se usa en este documento, sustancialmente idéntico a un producto significa sustancialmente similar de modo que la propiedad de interés permanece suficientemente sin cambios, de modo que el producto sustancialmente idéntico puede usarse en lugar del producto.

Como se usa en este documento, sustancialmente puro significa suficientemente homogéneo para parecer libre de impurezas fácilmente detectables como se determina por métodos de análisis convencionales, tales como cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), usadas por los especialistas en la técnica para evaluar dicha pureza, o suficientemente puro de modo que una purificación adicional no alteraría de forma detectable las propiedades físicas y químicas, tales como actividades enzimáticas y biológicas de la sustancia. Los especialistas en la técnica conocen métodos para purificación de los compuestos para produ-

ES 2 335 005 T3

5 cir compuestos sustancialmente químicamente puros. Un compuesto sustancialmente químicamente puro puede ser sin embargo una mezcla de esteroisómeros o isómeros. En tales casos, una purificación adicional puede aumentar la actividad específica del compuesto.

5 Como se usa en este documento, una célula diana se refiere a una célula que expresa una sHASEGP *in vivo*.

10 Como se usa en este documento, una sustancia de ensayo (o compuesto de ensayo) se refiere a un compuesto químicamente definido (por ejemplo, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas/inorgánicas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, lípidos, polisacáridos, sacáridos o híbridos entre estas moléculas tales como glicoproteínas, etc.) o mezclas de compuestos (por ejemplo, una biblioteca de compuestos de ensayo, extractos naturales o sobrenadantes de cultivo, etc.) cuyo efecto sobre una sHASEGP, particularmente una forma de cadena sencilla que incluye el dominio hialuronidasa o una porción suficiente del mismo para la actividad, como se determina por un método *in vitro*, tal como los ensayos proporcionados en este documento.

15 Como se usan en este documento, las expresiones agente terapéutico, régimen terapéutico, radioprotector o quimioterápico se refieren a fármacos convencionales y terapias farmacológicas, incluyendo vacunas, que son conocidos por los especialistas en la técnica. Se conocen bien en la técnica agentes radioterápicos.

20 Como se usa en este documento, el tratamiento se refiere a cualquier forma en la que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad se mejoren o se alteren beneficiosamente de otro modo.

El tratamiento también incluye cualquier uso farmacéutico de las composiciones de este documento.

25 Como se usa en este documento, un vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se usan para introducir un ácido nucleico heterólogo en células para la expresión o replicación del mismo. Los vectores permanecen típicamente episomales, pero pueden diseñarse para lograr la integración de un gen o porción del mismo en un cromosoma del genoma. También se contemplan vectores que sean cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de mamíferos. La selección y uso de dichos vehículos se conoce bien por los especialistas en la técnica. Un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que está unido operativamente con secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de lograr la expresión de dichos fragmentos de ADN. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, virus recombinante u otro vector que, tras la introducción en una célula hospedadora apropiada, dé como resultado la expresión del ADN clonado. Los especialistas en la técnica conocen bien vectores de expresión apropiados e incluyen los que pueden replicarse en células eucariotas y/o células procariotas y los que permanecen episomales o los que se integran en el genoma de células hospedadoras.

40 Como se usa en este documento, una secuencia de unión a proteínas se refiere a una proteína o secuencia peptídica que es capaz de la unión específica a otra proteína o secuencias peptídicas, generalmente, a un conjunto de proteínas o secuencias peptídicas o a una proteína o secuencia peptídica particular.

45 Como se usa en este documento, un marcador epitópico se refiere a una extensión corta de restos aminoacídicos que se corresponde con un epítipo para facilitar el análisis bioquímico e inmunológico posterior de la proteína o péptido marcado con epítipo. El marcaje con epítipo se consigue incluyendo la secuencia del marcador epitópico en la secuencia codificante de una proteína en un vector de expresión apropiado. Las proteínas marcadas con epítipo pueden purificarse por afinidad usando anticuerpos altamente específicos generados contra los marcadores.

50 Como se usa en este documento, una secuencia de unión a metal se refiere a una proteína o secuencia peptídica que es capaz de una unión específica a iones metálicos, generalmente a un conjunto de iones metálicos o a un ión metálico particular.

50 Como se usa en este documento, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o más artículos.

55 Como se usa en este documento, una composición se refiere a cualquier mezcla. Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, acuosa, no acuosa o cualquier combinación de las mismas.

60 Como se usa en este documento, un fluido se refiere a cualquier composición que puede fluir. Los fluidos incluyen por lo tanto composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones de este tipo.

60 Como se usa en este documento, un extracto celular se refiere a una preparación o fracción que se prepara a partir de una célula lisada o rota.

65 Como se usa en este documento, se dice que un agente se selecciona aleatoriamente cuando el agente se selecciona aleatoriamente sin considerar las secuencias específicas implicadas en la asociación de una proteína en solitario o con sus sustratos asociados, compañeros de unión, etc. Un ejemplo de agentes seleccionados aleatoriamente es el uso de una biblioteca química, una biblioteca combinatoria peptídica o un caldo de cultivo de un organismo o medio acondicionado.

ES 2 335 005 T3

Como se usa en este documento, se dice que un agente se selecciona o diseña de forma racional cuando el agente se selecciona en una base no aleatoria que tiene en cuenta la secuencia del sitio diana y/o su conformación en relación con el agente de acción. Como se describe en los Ejemplos, existen sitios de unión propuestos para sitios hialuronidasa y (catalíticos) en la glicoproteína que tiene la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 4. Los agentes pueden seleccionarse de forma racional o diseñarse de forma racional utilizando las secuencias peptídicas que componen estos sitios. Por ejemplo, un agente peptídico seleccionado de forma racional puede ser un péptido cuya secuencia de aminoácidos sea idéntica al ATP o a sitios o dominios de unión a calmodulina.

Se considera que los oligosacáridos tienen un extremo reductor y un extremo no reductor, independientemente de que el sacárido en el extremo reductor sea de hecho un azúcar reductor. De acuerdo con la nomenclatura aceptada, los oligosacáridos se representan en este documento con el extremo no reductor a la izquierda y el extremo reductor a la derecha. Todos los oligosacáridos descritos en este documento se describen con el nombre o abreviatura para el sacárido no reductor (por ejemplo, Gal) seguido de la configuración del enlace glicosídico (alfa o beta), el enlace de anillo, la posición de anillo del sacárido reductor implicada en el enlace y después el nombre o abreviatura del sacárido reductor (por ejemplo, GlcNAc). El enlace entre dos azúcares puede expresarse, por ejemplo, como 2,3, 2→3 ó (2,3). Cada sacárido es una piranosa.

Como se usa en este documento, un resto azúcar ligado a N se refiere a un oligosacárido unido a una sHASEGP a través del nitrógeno amida de restos Asn. Los oligosacáridos ligados a N se incluyen en varios tipos principales (de oligomanosa, complejos, híbridos, sulfatados), teniendo todos núcleos de 3-GlcNAc-GlcNAc (Man) unidos a través del nitrógeno amida de restos Asn que se incluyen en secuencias -Asn-Xaa-Thr/Ser- (en las que Xaa no es Pro). Los sitios ligados a N se asignan con frecuencia indirectamente por la aparición de un ciclo “en blanco” durante la secuenciación. Puede realizarse una identificación positiva después de la liberación del oligosacárido por PNGasa F, que convierte la Asn glicosilada en Asp. Después de la liberación por PNGasa F, los oligosacáridos ligados a N pueden purificarse usando cromatografía Bio-Gel P-6, sometándose a la combinación de oligosacáridos a cromatografía preparativa de intercambio aniónico a pH elevado (HPAEC) (Townsend *et al.*, (1989) Anal. Biochem. 182, 1-8). Se pueden resolver ciertos isómeros de oligosacáridos usando HPAEC. Los restos fucosa desplazarán las posiciones de elución antes en el cromatograma de HPAEC, mientras que los restos ácido siálico adicionales aumentarán el tiempo de retención. El tratamiento simultáneo de glicoproteínas cuyas estructuras de oligosacáridos se conocen (por ejemplo, fetuína bovina, glicoproteína ácida α -1, ovoalbúmina, ARNasa B, transferrina) puede facilitar la asignación de los picos de oligosacáridos. Los oligosacáridos recogidos pueden caracterizarse por una combinación de análisis de composición y de enlaces por metilación (Waeghe *et al.*; (1983), Carbohydr Res. 123, 281-304), asignándose las configuraciones anoméricas mediante espectroscopía de RMN (Van Halbeek (1993) en Methods Enzymol 230).

Como alternativa, pueden identificarse oligosacáridos mediante electroforesis de carbohidratos asistida por fluorescencia (FACE) Callewaert *et al.* (2001) Glycobiology 11, 275-281.

Como se usa en este documento, la expresión “ácido siálico” se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia del ácido siálico es el ácido N-acetilneuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico (con frecuencia abreviado como Neu5Ac, NeuAc, o NANA). Un segundo miembro de la familia es el ácido N-glicolil-neuramínico (Neu5Gc o NeuGc), en el que el grupo N-acetilo del NeuAc está hidroxilado. Un tercer miembro de la familia del ácido siálico es el ácido 2-ceto-3-desoxi-nonulosónico (KDN) (Nadano *et al.* (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori *et al.* (1990) J. Biol. Chem. 265:21811-21819. También se incluyen ácidos siálicos sustituidos en posición 9 tales como 9-O-C₁-C₆ acil-Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para una revisión de la familia del ácido siálico véase, por ejemplo, Varki (1992) Glycobiology 2: 25-40; Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, N.Y. (1992)). La síntesis y uso de compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialación se describe en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de octubre de 1992.

Como se usa en este documento, la PNGasa se refiere a una N-glicosidasa F específica de Péptido de Asparagina, tal como la péptido-N-glicosidasa F de *Flavobacterium maningoseptum*. Las enzimas PNGasa se caracterizan por su especificidad hacia oligosacáridos ligados a N más que ligados a O. La caracterización de la eficacia de PNGasa puede definirse tanto por electroforesis de SDS PAGE o electroforesis de carbohidratos asistida por fluorescencia.

Como se usa en este documento, una sialación sustancialmente terminada se refiere a oligosacáridos ligados a N que terminan con resto ácido siálico como azúcar terminal. Pueden identificarse ácidos siálicos terminales mediante análisis FACE de carbohidratos liberados después del tratamiento con neuraminidasa.

La vida circulatoria de las glicoproteínas en sangre es altamente dependiente de la composición y estructura de sus grupos carbohidrato ligados a N. Este hecho es de una importancia directa para las glicoproteínas terapéuticas que pretenden administrarse por vía parenteral. En general, la semivida circulatoria máxima de una glicoproteína requiere que sus grupos carbohidrato ligados a N terminen en la secuencia NeuAc-Gal-GlcNAc. Sin el ácido siálico terminal (NeuAc) la glicoproteína se aclara rápidamente de la sangre mediante un mecanismo que implica el reconocimiento de los restos N-acetilgalactosamina (GalNAc) o galactosa (Gal) subyacentes (Goochee *et al.* (1991) Biol/Technology 9:1347-1355). Por esta razón, asegurar la presencia de ácido siálico terminal en grupos carbohidrato ligados a N de glicoproteínas terapéuticas es una consideración importante para su desarrollo comercial.

Las glicoproteínas circulantes están expuestas a sialidasas (o neuraminidasas) que pueden eliminar los restos ácido siálico terminales. Típicamente, la eliminación del ácido siálico expone restos galactosa y estos restos se reconocen y se unen por receptores específicos de galactosa en los hepatocitos (revisado en Ashwell y Harford (1982) Ann. Rev. Biochem. 51: 531). El hígado también contiene otros receptores específicos de azúcar que median la eliminación de glicoproteínas de la circulación. Las especificidades de dichos receptores también incluyen N-acetilglucosamina, manosa, fucosa y fosfomanosa. Las glicoproteínas eliminadas por los receptores galactosa de los hepatocitos experimentan una degradación sustancial y después entran en la bilis; las glicoproteínas eliminadas por el receptor de manosa de células de Kupffer entran en el sistema reticuloendotelial (revisado en Ashwell y Harford (1982) Ann. Rev. Biochem. 51:53).

Como se usa en este documento, la expresión Activa a pH Neutro se refiere a una glicoproteína sHASEGP con actividad catalítica hacia un sustrato de glicosaminoglicano *in vitro* a un pH de entre 5 y 8 en condiciones de sal menores de 150 mM y potencia tamponante menor de 50 mM.

Como se usa en este documento, una solución estabilizada se refiere a una sHASEGP que conserva más del 60% de su actividad inicial después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 30 días.

Como se usa en este documento, a menos que se especifique otra cosa, una unidad se expresa en unidades reductoras de turbidez (TRU). Una TRU se define como la cantidad de actividad hialuronidasa necesaria para reducir la turbidez de una solución acidificada de ácido hialurónico y es equivalente a las unidades U.S.P./National Formulary (NF XIII) (NFU). El ensayo enzimático de tipo ELISA descrito en este documento puede relacionarse con las unidades TRU, NFU y USP a través de una curva patrón de una muestra de hialuronidasa (por ejemplo, patrón de USP o WHO) estandarizada a través de la U.S.P. Por lo tanto, las actividades enzimáticas determinadas mediante el ensayo enzimático de tipo ELISA son en realidad TRU relativas, puesto que la actividad enzimática no se mide realmente usando el ensayo turbidimétrico (Dorfman *et al.*, 1948, J. Biol. Chem. 172: 367).

Como se usa en este documento, la potencia se define por la cantidad de proteína sHASEGP necesaria para degradar un sustrato *in vitro* basándose en una Unidad Reductora de Turbidez o Unidad Reductora de Turbidez Relativa.

Como se usa en este documento, la actividad específica se refiere a unidades de actividad por mg de proteína. La cantidad de proteína sHASEGP se obtiene por la absorción de una solución de sHASEGP a 280 nm asumiendo un coeficiente de extinción molar de aproximadamente 1,7, en unidades de $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

El polietilenglicol (PEG) se ha usado ampliamente en biomateriales, en biotecnología y medicina principalmente debido a que el PEG es un polímero biocompatible, no tóxico, no inmunogénico y soluble en agua (Zhao y Harris, ACS Symposium Series 680: 458-72, 1997). En el área de suministro de fármacos, se han usado ampliamente derivados de PEG en la unión covalente (es decir, "PEGilación") a proteínas para reducir la inmunogenicidad, proteólisis y aclaramiento renal y para aumentar la solubilidad (Zalipsky, Adv. Drug Del. Rev. 16:157-82, 1995). De forma similar, el PEG se ha unido a fármacos de bajo peso molecular relativamente hidrófobos para aumentar la solubilidad, reducir la toxicidad y alterar la biodistribución. Típicamente, los fármacos PEGilados se inyectan como soluciones.

Una aplicación estrechamente relacionada es la síntesis de redes de PEG reticuladas degradables o formulaciones para el uso en el suministro de fármacos puesto que gran parte de la misma química usada en el diseño de vehículos farmacológicos solubles degradables puede usarse también en el diseño de geles degradables (Sawhney *et al.*, Macromolecules 26:581-87, 1993). También se sabe que pueden formarse complejos intermoleculares por mezclas de soluciones de dos polímeros complementarios. Dichos complejos se estabilizan generalmente mediante interacciones electrostáticas (polianión-policación) y/o enlaces de hidrógeno (poliácido-polibase) entre los polímeros implicados y/o por interacciones hidrófobas entre los polímeros en un entorno acuoso (Krupers *et al.*, Eur. Polym J. 32: 785-790, 1996). Por ejemplo, la mezcla de soluciones de ácido poliacrílico (PAAc) y óxido polietileno (PEO) en las condiciones apropiadas da como resultado la formación de complejos basados en su mayor parte en la formación de enlaces de hidrógeno. La disociación de estos complejos en condiciones fisiológicas se ha usado para el suministro de fármacos libres (es decir, no PEGilados). Además, se han formado complejos de polímeros complementarios a partir de tanto homopolímeros como copolímeros.

En un aspecto, el polietilenglicol tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 3 kD a aproximadamente 50 kD y preferiblemente de aproximadamente 5 kD a aproximadamente 30 kD. Puede conseguirse la unión covalente del PEG al fármaco (conocida como "PEGilación") mediante técnicas de síntesis química conocidas. Por ejemplo, en un aspecto de la presente invención la PEGilación de una proteína puede conseguirse por reacción de PEG activado con NHS con la proteína en condiciones de reacción adecuadas.

Aunque se han descrito numerosas reacciones para la PEGilación, las que son más generalmente aplicables confieren direccionabilidad, utilizan condiciones de reacción suaves y no necesitan un procesamiento exhaustivo aguas abajo para eliminar catalizadores tóxicos o subproductos. Por ejemplo, el monometoxiPEG (mPEG) sólo tiene un hidroxilo terminal reactivo y por lo tanto su uso limita algo la heterogeneidad de la mezcla de producto de PEG-proteína resultante. La activación del grupo hidroxilo en el extremo del polímero opuesto al grupo metoxi terminal generalmente es necesaria para conseguir una PEGilación de proteína eficaz, siendo el objetivo hacer al PEG derivatizado más susceptible a un ataque nucleófilo. El nucleófilo de ataque es habitualmente el grupo amino épsilon de un resto lisilo, pero también pueden reaccionar otras aminas (por ejemplo, la amina alfa N-terminal o las aminas de anillo

de histidina) si las condiciones locales son favorables. Una unión más dirigida es posible en proteínas que contienen una sola lisina o cisteína. Al último resto puede dirigirse una PEG-maleimida para modificación específica con tiol. Como alternativa, una PEG hidrazida puede reaccionar con sHASEGP oxidada con periodato y reducirse en presencia de NaCNBH₃. Más específicamente, puede hacerse reaccionar azúcares CMP PEGilados con sHASEGP en presencia de glicosiltransferasas apropiadas. Una técnica es la técnica de “PEGilación” en la que varias moléculas poliméricas se acoplan al polipéptido en cuestión. Cuando se usa esta técnica el sistema inmune tiene dificultades para reconocer los epítomos en la superficie del polipéptido responsables para la formación de anticuerpos, reduciendo por lo tanto la respuesta inmune. Para polipéptidos introducidos directamente en el sistema circulatorio del cuerpo humano para dar un efecto fisiológico particular (es decir, compuestos farmacéuticos) la respuesta inmune potencial típica es una respuesta de IgG y/o IgM, mientras que los polipéptidos que se inhalan a través del sistema respiratorio (es decir, polipéptido industrial) pueden causar potencialmente una respuesta de IgE (es decir, una respuesta alérgica). Una de las teorías que explican la respuesta inmune reducida es que la molécula o moléculas poliméricas protegen epítomos en la superficie del polipéptido responsables de la respuesta inmune que conduce la formación de anticuerpos. Otra teoría o al menos un factor parcial es que cuanto más pesado es el conjugado, se obtiene una respuesta inmune más reducida.

Las moléculas poliméricas acopladas al polipéptido pueden ser cualquier molécula polimérica adecuada con un peso molecular como se define de acuerdo con la invención, incluyendo homopolímeros naturales y sintéticos, tales como polioles (es decir, poli-OH), poliaminas (es decir, poli-NH₂) y ácidos policarboxílicos (es decir, poli-COOH) y heteropolímeros adicionales, es decir, polímeros que comprenden uno o más grupos de acoplamiento diferentes, por ejemplo, un grupo hidroxilo y grupos amina.

Los ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas del grupo que comprende óxidos de polialquileno (PAO), tales como polialquilenglicoles (PAG), incluyendo polipropilenglicoles (PEG), metoxipolietilenglicoles (mPEG) y polipropilenglicoles, éteres de PEG-glicidilo (Epoxy-PEG), PEG-oxicarbonylimidizadol (CDI-PEG) polietilenglicoles ramificados (PEG), alcohol polivinílico (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, poli-D,L-aminoácidos, ácido polietileno-co-maleico anhídrido, ácido poliestireno-co-málico anhídrido, dextranos incluyendo carboximetildextranos, heparina, albúmina homóloga, celulosa, incluyendo metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa, hidrolizados de quitosana, almidones tales como almidones de hidroxietilo y almidones de hidroxipropilo, glucógeno, agarosas y derivados de las mismas, goma guar, pululano, inulina, goma xantana, carragenina, pectina, hidrolizados de ácido algínico y biopolímeros.

Las moléculas poliméricas preferidas son moléculas poliméricas no tóxicas tales como (m)polietilenglicol (mPEG), que requiere además una química relativamente simple para su acoplamiento covalente a grupos de unión en la superficie de la enzima.

Los óxidos de polialquileno (PAO) que se observan generalmente, tales como óxidos de polietileno, tales como PEG y especialmente mPEG son las moléculas poliméricas preferidas ya que estas moléculas poliméricas, en comparación con polisacáridos tales como dextrano, pululano y similares, tienen pocos grupos reactivos capaces de entrecruzarse, no siendo deseable.

B. Perfiles de expresión tisular de sHASEGP

Aunque anteriormente se pensaba que era específica de testículo, la sHASEGP humana se expresa en múltiples tejidos en seres humanos cuando se usan técnicas más sensibles tales como RT-PCR. El transcrito de sHASEGP se encuentra en médula (cerebro), endotelio microvascular, próstata, mama, retina, melanocitos humanos combinados, corazón fetal y útero gestante. La sHASEGP también se expresa en tumores de células germinales. Generalmente es necesaria la detección basada en RT-PCR de transcritos de sHASEGP para detectar niveles en tejidos distintos de testículo.

ES 2 335 005 T3

C. Ensayos para actividad enzimática de sHASEGP

Ensayo de microtitulación turbidométrico para determinar la actividad hialuronidasa

5 La actividad hialuronidasa puede detectarse por medio de un ensayo turbidimétrico modificado en solución de suero acidificado. Los reactivos necesarios son los siguientes:

10	Agua desionizada 2X esterilizada por UV o agua estéril para irrigación	Braun	R5000-01
15	Hylumed Medical - Hialuronato Sódico, HA de Alto Peso Molecular	Genzyme Advanced Biomaterials	4876
20	Patrón de Referencia de Hialuronidasa	USP	31200
25	Acetato Potásico, Granular, USP, ACS	JTBaker	2914-01
30	Ácido Acético, Glacial, 99+ %	Sigma	A-6283
35	Fosfato Sódico Monobásico Monohidrato, USP Granular	Mallinkrodt	7774
40	Fosfato Sódico Dibásico Anhidro, USP	Mallinkrodt	7771
45	Cloruro Sódico, Cristales, GR, ACS	EMScience	SX0420-5
	Hidrolizado Enzimático de Gelatina	Sigma	G-0262
	Suero de Caballo, rebaño donante, ensayo de cultivo celular, cultivo de hibridoma ensayado, origen de Estados Unidos	Sigma	H-1270
	Albúmina de Suero Humano al 20 %	Griffols	
	Ácido Clorhídrico, Reactivo ACS	Sigma	H-7020
	Cloruro de Calcio, Dihidrato, Granular USP, -FCC	JTBaker	1336-01

Se preparan los siguientes reactivos: *Solución de Tampón Acetato*- 14,0 g de acetato potásico y 25,0 ml de ácido acético glacial en agua para hacer 1000 ml. *Solución de Tampón Fosfato*- 2,5 g de fosfato sódico monobásico, 1,0 g de fosfato sódico dibásico anhidro y 8,2 g de cloruro sódico en agua para hacer 1000 ml. *Solución Madre de Diluyente Enzimático*- 500 ml de Solución de Tampón Fosfato con 500 ml de agua. *Solución de Trabajo de Diluyente Enzimático*- 33 mg de gelatina hidrolizada en 50 ml de solución madre de diluyente enzimático preparada en un intervalo de 2 horas antes del uso. *Solución de Tampón de Estabilización de Muestras (Solución "SSB")*- 125 μ l de una Solución de Albúmina Sérica Humana al 20% y 50 μ l de una solución de Cloruro de Calcio 1 M en 50 ml de Solución de Trabajo de Diluyente Enzimático y se mezcla minuciosamente. *Solución Madre de Suero*- Diluir 1 volumen de Suero de Caballo con 9 volúmenes de Solución de Tampón Acetato. Ajustar con ácido clorhídrico 4 N a un pH de 3,1 y dejar la solución reposar a temperatura ambiente durante de 18 a 24 h. Almacenar la solución a 4°C y usar en 30 días. *Solución de Trabajo de Suero*- 10 ml de la Solución Madre de Suero en 30 ml de la Solución de Tampón Acetato ajustados a temperatura ambiente. *Solución Madre de Ácido Hialurónico*- Ácido Hialurónico Sódico a una concentración de 5,0 mg/ml en agua. *Solución de Trabajo de Ácido Hialurónico*- 0,75 ml de la Solución Madre de Ácido Hialurónico en 4,25 ml de la Solución de Tampón Fosfato. *Solución Madre Convencional*- Un recipiente de Hialuronidasa Patrón de Referencia USP a una concentración de 1000 Unidades/ml en agua, dividida en alícuotas en porciones de 50 μ l y almacenada a -20°C. *Solución de Trabajo Convencional*- 40 μ l de Solución Madre Convencional en 960 μ l de Solución de Trabajo de Diluyente Enzimático fría para obtener una solución que tiene una concentración conocida de 40 Unidades/ml, preparada inmediatamente antes del uso en el ensayo.

ES 2 335 005 T3

Todas las muestras enzimáticas se diluyen en una placa de 96 pocillos de “Baja Unión a Proteína” de acuerdo con las siguientes directrices:

5 a) El intervalo de sensibilidad máxima de este ensayo está entre 10-30 Unidades/ml. Para minimizar el número de veces que debe repetirse un ensayo para obtener resultados que estén dentro del intervalo, se determina primero el número aproximado de unidades totales/ml para la muestra y después se selecciona una dilución (número absoluto) de modo que la concentración final sea de aproximadamente 20 Unidades/ml.

10 b) Los volúmenes de Muestra Mínimos necesarios para realizar un ensayo son los siguientes: Fracciones FPLC = 50 μ l, Sobrenadantes de Cultivo Tisular = 1 ml, Material Purificado/Concentrado/Etapa Final = 10 μ l.

c) Para muestras con diluciones seriadas, se realizan diluciones 1:10 en la placa de 96 pocillos de “Baja Unión a Proteínas” por triplicado por pipeteo de 360 μ l de la solución “SSB” y 40 μ l de la muestra en cada pocillo.

15 Para la preparación de Patrón USP se prepara la Curva Patrón de USP en la placa de 96 pocillos de “Baja Unión a Proteína” de la forma siguiente:

Curva Patrón USP

Pocillos: Patrón:		Sol. de Diluyente	Sol. de Trabajo	Conc. Final (en			
		Enzimático (en μl):	Convencional (en μl):	Unidades/ml):			
25	A1-A3	St01	0	100	40		
	B1-B3	St02	20	80	32		
	C1-C3	St03	40	60	24		
30	D1-D3	St04	60	40	16		
	E1-E3	St05	80	20	8		
35	F1-F3	St06	90	10	4		
	G1-G3	St07	100	0	0		

40 Para la preparación del control de Ácido Hialurónico en las columnas 1-3, se prepara el Control de H.A. en la placa de 96 pocillos “de Fondo Plano” de la forma siguiente:

Controles de H.A.:					
Pocillos: Control:		Sol. de Trabajo de Ácido Hialurónico (en μl):	Sol. de Trabajo de Diluyente Enzimático (en μl):		
45	H1-H3	Co01	0	60	

55 La Placa de Reacción: se pipetea 30 μ l por pocillo de Solución de Trabajo de Ácido Hialurónico usando una pipeta de transferencia de 8 canales de 50 μ l en una placa de microtitulación de 96 pocillos “de Fondo Plano”, dejando vacíos los pocillos H1-H3. Se pipetea 60 μ l/pocillo de Solución de Trabajo de Diluyente Enzimático en los pocillos H1-H3 de la misma placa como el control de HA.

Solución de Trabajo de Suero: se dispensan 40 ml de Solución de Trabajo de Suero en una cubeta de transferencia y próxima al termobloque.

60 Etapa de precalentamiento: Una vez que se han preparado ambas placas, la placa de 96 pocillos de Baja Unión a Proteína que contiene las muestras diluidas, patrones, controles y la placa de 96 pocillos de fondo plano que contiene la Solución de Trabajo de Ácido Hialurónico se colocan en un termobloque y se deja que se calienten durante 5 min a 37°C.

65 La Reacción se inicia mediante la adición de Enzima a Sustrato: 30 μ l de la placa de enzima en todos los pocillos de la columna n° 1 de la placa de fondo plano de 96 Pocillos (que contiene el sustrato) usando una pipeta de 8 canales de 5-50 μ l. La mezcla de reacción de Enzima/Sustrato se aspira 5 veces (retirando la solución hacia arriba y hacia abajo con la transferencia durante los primeros 15 segundos para asegurar una mezcla de muestra completa. Después

ES 2 335 005 T3

de mezclar la enzima y el sustrato, las puntas se expulsan y se carga un nuevo conjunto de puntas en la pipeta de transferencia para la siguiente columna. Se reinicia un temporizador y a tiempo (t) = 0:30, se repite este proceso para la columna 2. En el siguiente intervalo de 30 segundos (t) = 1:00, se repite este proceso para la columna 3. Este proceso se repite desplazándose de izquierda a derecha a través de la placa, cada 30 segundos hasta que todos los pocillos contengan tanto enzima como sustrato.

Interrupción de la reacción: Cuando el temporizador alcanza 6 minutos (t) = 6:00, se pipetea 240 μ l de la Solución de Trabajo de Suero en cada pocillo, usando una pipeta de transferencia de 8 canales de 50-300 μ l en la columna 1 de la placa de fondo plano de 96 pocillos a partir de la Reserva de Reactivo de 50 ml adyacente. La mezcla se aspira 3 veces (retirando la solución hacia arriba y hacia abajo con la pipeta de transferencia) durante los primeros 10 segundos para asegurar una mezcla completa. El proceso se repite cada 30 segundos, avanzando desde la columna 1 a la 12.

Tras completarse la última columna (columna 12), la placa de reacción se retira del termobloque y la placa se coloca en la bandeja de lectura del lector de placas a 640 nM. Se genera un ajuste de curva lineal a partir de la curva patrón que permite la extrapolación de las muestras de ensayo.

Ensayos alternativos para hialuronidasa

Ensayo de microtitulación de hialuronano biotinilado

Los grupos carboxilo libres o restos ácido gluorónico de Hialuronano se biotinilan en una reacción de una etapa usando biotina-hidrazida (Pierce), Sulfo NHS (Pierce) y 1-Etildimetilaminopropil-carbodiimida (Sigma). Este sustrato de HA biotinilado se acopla covalentemente a una placa de microtitulación de 96 pocillos en una segunda reacción. A la finalización de la reacción enzimática, se detecta el sustrato residual con una reacción de avidina-peroxidasa que puede leerse en un lector de placas de ELISA convencional. Puesto que el sustrato está unido covalentemente a la placa de microtitulación, no aparecen artefactos tales como desplazamiento dependiente de pH del sustrato biotinilado. La sensibilidad permite una medición rápida de la actividad de hialuronidasa a partir de células cultivadas y muestras biológicas con una variación entre ensayos de menos del 10%.

La actividad específica de hialuronidasa se expresa en unidades reductoras de turbidez (TRU). Una TRU se define como la cantidad de actividad hialuronidasa necesaria para reducir la turbidez de una solución acidificada de ácido hialurónico y es equivalente a las unidades U.S.P./National Formulary (NF XIII) (NFU). El ensayo enzimático de tipo ELISA usado para la purificación se relaciona con las unidades TRU, NFU y U.S.P. a través de una curva patrón de una muestra de hialuronidasa (por ejemplo, USP) estandarizada a través de la U.S.P. Por lo tanto, las actividades enzimáticas determinadas por el ensayo enzimático de tipo ELISA son realmente TRU relativas, puesto que la actividad enzimática no se mide realmente usando el ensayo turbidimétrico (Dorfman *et al.*, 1948, J. Biol. Chem. 172: 367).

Muchos ensayos de hialuronidasa se han basado en la medición de la generación de nuevos grupos N-acetilamino reductores (Bonner y Cantey, Clin. Chim. Acta 13: 746-752, 1966), o pérdida de viscosidad (De Saiegui *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 121:548-554,1967) o turbidez (Dorfinan y Ott, J. Biol. Chem. 172:367,1948). Con sustratos purificados todos estos métodos son suficientes para la determinación de la presencia o ausencia de actividad endoglucosamídica.

También pueden usarse sustratos de glicosaminoglicanos sustancialmente purificados para un Ensayo de Desplazamiento en Gel. Se mezclan glicosaminoglicanos con sHASEGP combinante para ensayar la actividad endoglucosidasa, que da como resultado un cambio en la motilidad de sustrato dentro del gel. Puede obtenerse sulfato de condroitina-4 y 6, sulfato de dermatán, sulfato de heparán en Sigma Chemical. Puede obtenerse hialuronano de cordón umbilical humano en ICN. Cada sustrato de ensayo se diluye a 0,1 mg/ml en un intervalo de tampón de pH 3,5-7,5. Muestras de 10 μ l de sHASEGP purificada o medios acondicionados de células que expresan sHASEGP se mezclan también con 90 μ l de sustrato de ensayo en el tampón deseado y se incuban durante 3 horas a 37°C. Después de la incubación las muestras se neutralizan con tampón de muestras (Tris EDTA pH 8,0, Azul Bromofenol y glicerol) seguido de electroforesis. Los glicosaminoglicanos se detectan por tinción de los geles en Azul Alcian al 0,5% en Ácido Acético Glacial al 3% durante una noche, seguida de destainado en Ácido Acético Glacial al 7%. La degradación se determina por comparación de la motilidad de sustrato en presencia y ausencia de enzima.

La actividad hialuronidasa también puede detectarse mediante zimografía en gel de sustrato (Guentenhoner *et al.*, 1992, Matrix 388-396). En este ensayo se aplica una muestra a un gel de SDS-PAGE que contiene ácido hialurónico y las proteínas en la muestra se separan mediante electroforesis. El gel se incuba después en un tampón de ensayo enzimático y posteriormente se tiñen para detectar el ácido hialurónico en el gel. Se visualiza la actividad hialuronidasa como una zona aclarada en el gel de sustrato.

D. Identificación y aislamiento de genes de polipéptido sHASEGP

El gen de polipéptido sHASEGP y/o dominios del mismo pueden obtenerse por métodos bien conocidos en la técnica para aislamiento de ADN. Cualquier método conocido por los especialistas en la técnica para la identificación de ácidos nucleicos que codifican genes deseados puede usarse. Cualquier método disponible en la técnica puede usarse

ES 2 335 005 T3

para obtener un ADNc de longitud completa (es decir, que incluye la región codificante completa) o clon de ADN genómico que codifica un polipéptido sHASEGP. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede usarse para amplificar una secuencia que se expresa en tejidos normales, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican un polipéptido sHASEGP (SEC ID N°: 1 y 2) en una genoteca de genómico o ADNc. Pueden usarse cebadores oligonucleotídicos que hibridan con secuencias en los extremos terminales 3' y 5' de las secuencias identificadas como cebadores para amplificar por PCR secuencias a partir de una muestra de ácido nucleico (ARN o ADN, generalmente una genoteca de ADNc) a partir de una fuente apropiada (por ejemplo, testículo, próstata, mama).

Puede realizarse una PCR, por ejemplo, mediante el uso de un termociclador Perkin-Elmer Cetus y Taq polimerasa (Gene Amp). El ADN que se amplifica puede incluir ARNm, o ADNc o ADN genómico de cualquier especie eucariota. Se puede elegir sintetizar varios cebadores degenerados diferentes para el uso en las reacciones de PCR.

También es posible variar la rigurosidad de las condiciones de hibridación usadas en el cebado de las reacciones de PCR para amplificar homólogos de ácido nucleico (por ejemplo, para obtener secuencias de polipéptido sHASEGP de especies distintas de seres humanos o para obtener secuencias humanas con homología con polipéptido sHASEGP), permitiendo mayores o menores grados de similitud de secuencia de nucleótidos entre la secuencia de nucleótidos conocida y el homólogo de ácido nucleico que se está aislando. Para hibridación cruzada entre especies, se usan condiciones de baja rigurosidad a rigurosidad moderada. Para hibridación en la misma especie, se usan condiciones de moderadamente rigurosas a altamente rigurosas. Las condiciones pueden determinarse empíricamente.

Después de la amplificación con éxito del ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia polipeptídica de sHASEGP identificada o de un ácido nucleico que codifica toda o una porción de un homólogo polipeptídico de sHASEGP, ese segmento puede clonarse molecularmente y secuenciarse, y usarse como sonda para aislar un clon de ADNc o genómico completo. Esto a su vez permite la determinación de la secuencia de nucleótidos completa del gen, el análisis de su expresión y la producción de su producto proteico para su análisis funcional. Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos, puede determinarse una fase de lectura abierta que codifica el producto proteico del gen de polipéptido sHASEGP por cualquier método bien conocido en la técnica para determinar fases de lectura abiertas, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles públicamente para el análisis de secuencias de nucleótidos. Una vez que se define una fase de lectura abierta, es rutinario determinar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la fase de lectura abierta. De este modo, pueden identificarse las secuencias de nucleótidos de los genes de polipéptidos sHASEGP completos, así como las secuencias de aminoácidos de proteínas polipeptídicas sHASEGP y análogos.

Cualquier célula eucariota puede servir potencialmente como la fuente de ácido nucleico para la clonación molecular del gen de polipéptido sHASEGP. Los ácidos nucleicos pueden aislarse a partir de vertebrados, mamíferos, seres humanos, porcinos, bovinos, felinos, aves, equinos, caninos, así como fuentes de primates adicionales, insectos, plantas y otros organismos. El ADN puede obtenerse mediante procedimientos convencionales conocidos en la técnica a partir de ADN clonado (por ejemplo, una "genoteca" de ADN), por síntesis química, por clonación de ADNc o mediante la clonación de ADN genómico o fragmentos del mismo, purificados a partir de la célula deseada (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Glover, D. M. Ed., 1985, *DNA Cloning : A Practical Approach*, MRL Press, Ltd., Oxford, Reino Unido Vol. 1,11. Los clones derivados de ADN genómico pueden contener regiones de ADN reguladoras e intrónicas además de las regiones codificantes; los clones derivados de ADNc contendrán solamente secuencias exónicas. Para cualquier fuente, el gen se clona en un vector adecuado para la propagación del mismo.

En la clonación molecular del gen a partir de ADN genómico, se generan fragmentos de ADN, algunos de los cuales codificarán el gen deseado.

El ADN puede escindirse en sitios específicos usando diversas enzimas de restricción.

Como alternativa, se puede usar ADNasa en presencia de manganeso para fragmentar el ADN o el ADN puede romperse físicamente, por ejemplo, por sonicación. Los fragmentos de ADN lineal pueden separarse después de acuerdo con el tamaño mediante técnicas convencionales, incluyendo pero sin limitación, electroforesis en gel de agarosa y poliacrilamida y cromatografía en columna.

Una vez que se generan los fragmentos de ADN, la identificación del fragmento de ADN específico que contiene el gen deseado puede conseguirse de varias formas.

Por ejemplo, una porción del gen de polipéptido sHASEGP (de cualquier especie) (por ejemplo, un producto de amplificación de PCR obtenido como se ha descrito anteriormente o un oligonucleótido que tiene una secuencia de una porción de la secuencia de nucleótidos conocida) o su ARN específico, o un fragmento del mismo, puede purificarse y marcarse y los fragmentos de ADN generados pueden explorarse mediante hibridación de ácido nucleico con la sonda marcada (Benton y Davis, *Science* 196: 180 (1977); Grunstein y Hogness, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 72: 3961 (1975)). Los fragmentos de ADN con una homología sustancial con la sonda hibridarán. También es posible identificar el fragmento apropiado mediante digestión o digestiones con enzimas de restricción y la comparación de los tamaños de fragmento con los esperados de acuerdo con un mapa de restricción conocido, si dicho mapa está disponible, o por análisis de secuencia de ADN y comparación con la secuencia de nucleótidos conocida de polipéptido sHASEGP. Puede realizarse una selección adicional en base a las propiedades del gen. Como alternativa,

ES 2 335 005 T3

la presencia del gen puede detectarse mediante ensayos basados en las propiedades físicas, químicas o inmunológicas de su producto expresado. Por ejemplo, pueden seleccionarse clones de ADNc o clones de ADN que seleccionen por hibridación el ARNm apropiado que produce una proteína que, por ejemplo, tiene una migración electroforética, un comportamiento de concentración isoeléctrica, mapas de digestión proteolítica, propiedades antigénicas, actividad hialuronidasa similares o idénticas. Si está disponible un anticuerpo anti-polipéptido sHASEGP, la proteína puede identificarse por unión de anticuerpo marcado con los clones que sintetizan supuestamente el polipéptido sHASEGP en un procedimiento de tipo ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).

Las alternativas para aislar el ADN genómico de polipéptido sHASEGP incluyen, pero sin limitación, sintetizar químicamente la secuencia génica a partir de una secuencia conocida o convertir el ADNc en el ARNm que codifique el polipéptido sHASEGP.

Por ejemplo, el ARN para clonar ADNc del gen de polipéptido sHASEGP puede aislarse de células que expresan la proteína. Los ácidos nucleicos identificados y aislados pueden insertarse después en un vector de clonación apropiado. Pueden usarse un gran número de sistemas de vector-hospedador conocidos en la técnica. Los vectores posibles incluyen, pero sin limitación, plásmidos o virus modificados, pero el sistema vector debe ser compatible con la célula hospedadora usada. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, bacteriófagos tales como derivados de lambda o plásmidos tales como derivados de plásmidos pBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). La inserción en un vector de clonación puede conseguirse, por ejemplo, por ligación del fragmento de ADN en un vector de clonación que tenga extremos terminales cohesivos complementarios.

Si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente. Como alternativa, puede producirse cualquier sitio deseado por ligación de secuencias de nucleótidos (enlazadores) en los extremos terminales del ADN; estos enlazadores ligados pueden incluir oligonucleótidos sintetizados químicamente específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen de polipéptido sHASEGP pueden modificarse por formación de colas homopoliméricas.

Las moléculas recombinantes pueden introducirse en células hospedadoras por transformación, transfección, infección, electroporación, precipitación con calcio y otros métodos, de modo que se generen muchas copias de la secuencia génica.

En realizaciones específicas, la transformación de células hospedadoras con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen de polipéptido sHASEGP aislado, ADNc o secuencias de ADN sintetizadas, permite la generación de múltiples copias del gen.

Por lo tanto, el gen puede obtenerse en grandes cantidades por cultivo de transformantes, aislamiento de las moléculas de ADN recombinante a partir de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperación del gen insertado a partir del ADN recombinante aislado.

E. Vectores, plásmidos y células que contienen ácidos nucleicos que codifican un polipéptido sHASEGP o dominio hialuronidasa del mismo y expresión de vectores de polipéptidos sHASEGP y células

Para la expresión recombinante de uno o más de los polipéptidos sHASEGP, el ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido sHASEGP puede insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contenga los elementos necesarios para la transfección y traducción de la secuencia codificante de proteína insertada. Las señales de transcripción y traducción necesarias también pueden suministrarse mediante el promotor nativo para genes de sHASEGP y/o sus regiones flanqueantes.

También se proporcionan vectores que contienen un ácido nucleico que codifica las sHASEGP que pueden introducirse en un sistema de expresión capaz de producir una sHASEGP soluble activa a pH neutro.

También se proporcionan células que contienen los vectores. Las células incluyen células eucariotas y procariotas y los vectores adecuados para el uso en las mismas.

Se proporcionan células eucariotas, incluyendo Células de Ovario de Hámster Chino deficientes en dihidrofolato reductasa (DG44), que contienen los vectores. Las células adecuadas incluyen células de levadura, células fúngicas, células vegetales, células de insecto y células animales. Las células se usan para producir un polipéptido sHASEGP o dominio Hialuronidasa del mismo mediante (a) cultivo de las células descritas anteriormente en condiciones por las que el polipéptido sHASEGP codificado o dominio hialuronidasa del polipéptido sHASEGP se expresa por la célula y, después (b) recuperación de la proteína de dominio hialuronidasa expresada. En las realizaciones ejemplificadas, el dominio hialuronidasa se secreta en el medio.

En una realización, se proporcionan vectores que incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad Hialuronidasa y contiene toda o una porción de sólo el dominio hialuronidasa, o múltiples copias del mismo, de una proteína sHASEGP. También se proporcionan vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio hialuronidasa y porciones adicionales de una proteína sHASEGP de hasta, e in-

cluyendo, una proteína sHASEGP de longitud completa, así como múltiples copias de la misma. Los vectores pueden seleccionarse para la expresión de la proteína sHASEGP o dominio hialuronidasa de la misma en la célula o de modo que la proteína sHASEGP se exprese como una proteína secretada. Como alternativa, los vectores pueden incluir las señales necesarias para la secreción de proteínas codificadas. Cuando el dominio hialuronidasa se expresa, el ácido nucleico está unido a un ácido nucleico que codifica una señal de secreción, tal como la secuencia señal de factor de conjugación de *Saccharomyces cerevisiae* o una porción de la misma, o la secuencia señal nativa.

Para generar una sHASEGP soluble activa a pH neutro son necesarias células capaces de introducir glicosilación ligada a N. En la realización preferida, las células de mamífero de Ovario de Hámster Chino deficientes en dihidrofolato reductasa tales como DG44 se someten a electroporación con un plásmido que codifica un promotor de mamífero fuerte, tal como CMV, un ácido nucleico que codifica una sHASEGP seguido de un sitio interno de entrada al ribosoma, el gen de la dihidrofolato reductasa de ratón y la secuencia de poliadenilación de SV40, como se muestra en la SEC ID N° 51. Dichas células se cultivan después en un medio químicamente definido en ausencia de hipoxantina y timidina, seguido de una amplificación génica adicional con concentraciones crecientes de metotrexato.

Pueden usarse una diversidad de sistemas de vector-hospedador para expresar la secuencia codificante de proteína. Éstos incluyen, pero sin limitación, sistemas de células de mamífero infectadas con virus, por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas de células de insecto infectadas con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico o ADN cosmídico. Los elementos de expresión de vectores varían en sus potencias y especificidades. Dependiendo del sistema de vector-hospedador usado, puede usarse uno cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados. Obsérvese que la expresión bacteriana de ADN de sHASEGP no dará como resultado por sí misma una sHASEGP catalíticamente activa, pero cuando se combina con la maquinaria de glicosilación apropiada puede glicosilarse artificialmente como tal.

Cualquier método conocido por los especialistas en la técnica para la inserción de fragmentos de ácido nucleico en un vector puede usarse para construir vectores de expresión que contengan un gen quimérico que contenga las señales de control de la transcripción/traducción apropiadas y secuencias codificantes de proteína. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante y sintéticas *in vitro* y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptido sHASEGP o dominios, derivados, fragmentos u homólogos del mismo puede regularse mediante una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que los genes o fragmentos de los mismos se expresen en un hospedador transformado con la molécula o moléculas de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede controlarse mediante cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. En una realización específica, el promotor no es nativo respecto a los genes para el polipéptido sHASEGP. Los promotores que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, el promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290: 304-310 (1981), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, Cell 22: 787-797 (1980), el promotor de timidina quinasa de herpes (Wagner *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445 (1981), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster *et al.*, Nature 296: 39-42 (1982)); vectores de expresión procariotas tales como el promotor de β -Lactamasa (Villa-Kamaroff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731 (1978)) o el Promotor de TAC (Deboer *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25 (1983)); véase también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": en Scientific American 242: 79-94 (1980)); vectores de expresión en plantas que contienen el promotor de opalina sintetasa (Herrera-Estrella *et al.* Nature 303: 209-213 (1984)) o el promotor del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner *et al.* Nucleic Acids RES. 9: 2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bisfosfato carboxilasa (Herrera-Estrella *et al.*, Nature 310: 115-120 (1984)); elementos promotores de levaduras y otros hongos tales como el promotor Gal4, el promotor de la alcohol deshidrogenasa, el promotor de la fosfoglicerol quinasa, el promotor de la fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control de la transcripción animales que presentan especificidad de tejido y que se han usado en animales transgénicos: región de control del gen de elastasa I, que es activo en células acinares pancreáticas (Swift *et al.* Cell 38: 639-646 (1984); Omitz *et al.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409 (1986); Macdonald, Hepatology 7: 425-515 (1987)); región de control del gen de la insulina, que es activo en células beta pancreáticas (Hanahan *et al.* Nature 315: 115-122 (1985)), región de control del gen de la inmunoglobulina, que es activo en células linfoides (Grosschedl *et al.* Cell 38: 647-658 (1984); Adams *et al.* Nature 318: 533-538 (1985); Alexander *et al.* Mol. Cell Biol. 7: 1436-1444 (1987)), región de control del virus del tumor mamario de ratón, que es activo en células testiculares, mamarias, linfoides y mastocitos (Leder *et al.* Cell 45 : 485-495 (1986)), región de control del gen de albúmina, que es activo en el hígado (PINCKERT *et al.* Genes and Devel. 1: 268-276 (1987)), región de control del gen de alfa-fetoproteína, que es activo en hígado (Krumlauf *et al.* Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648 (1985); Hammer *et al.* Science 235:53-58 1987)), región de control del gen de antitripsina alfa-1, que es activo en el hígado (Kelsey *et al.* Genes and Devel. 1: 161-171 (1987)), región de control del gen de betaglobina, que es activo en células mieloides (Mogran *et al.* Nature 315: 338-340 (1985); Kollias *et al.* Cell 46: 89-94 (1986)), región de control del gen de la proteína básica de mielina, que es activo en los oligodendrocitos del cerebro (Readhead *et al.* Cell 48: 703-712 (1987)), región de control del gen de la cadena ligera de miosina 2, que es activo en músculo esquelético (Sani, Nature 314: 283-286 (1985)), y región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropinas, que es activo en células gonadotróficas del hipotálamo (Mason *et al.* Science 234: 1372-1378 (1986)).

En una realización específica, se usa un vector que contiene un promotor unido operativamente a ácidos nucleicos que codifican un polipéptido sHASEGP o un dominio, fragmento, derivado u homólogo del mismo, uno o más orígenes de replicación y, opcionalmente, uno o más marcadores de selección (por ejemplo, un gen de resistencia a antibiótico).

También pueden ser necesarias señales de inicio específicas para una traducción eficaz de una secuencia de sHASEGP. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. En los casos en los que se inserta sHASEGP, su codón de inicio y sus secuencias cadena arriba en el vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias señales de control de la traducción adicionales. Sin embargo, en los casos en los que sólo se inserta la secuencia codificante o una porción de la misma, deben proporcionarse señales de control de la transcripción exógenas incluyendo el codón de inicio ATG. Además, el codón de inicio debe estar en la fase de lectura correcta para asegurar la transcripción del inserto completo. Los elementos transcripcionales y codones de inicio exógenos pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de expresión puede aumentarse mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular que se use (Scharf D *et al* (1994) *Results Probl Cell Differ* 20: 125-62; Bittner *et al* (1987) *Methods in Enzymol* 153: 516-544).

Además, puede seleccionarse una cepa de célula hospedadora por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la forma deseada. Dichas modificaciones del polipéptido incluyen, pero sin limitación, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccional que escinde una forma "prepro" de la proteína también puede ser importante para una inserción, plegamiento y/o función correctas. Diferentes células hospedadoras tales como CHO (DG44, DXB 11, CHO-K1), HeLa, MDCK, 293, WI83, etc. tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraducionales y pueden seleccionarse para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña introducida.

Para producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, pueden transformarse líneas celulares que expresen de forma estable sHASEGP usando vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación o elementos de expresión endógenos y un gen marcador de selección. Después de la introducción del vector, puede dejarse que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a un medio selectivo. El propósito del marcador de selección es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan con éxito las secuencias introducidas. Pueden proliferar grupos resistentes de células transformadas de forma estable usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo celular.

Puede usarse cualquier número de sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Éstos incluyen, pero sin limitación, los genes de timidina quinasa de virus herpes simple (Wigler M *et al* (1977) *Cell* 11: 223-32) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy I *et al* (1980) *Cell* 22: 817-23), que pueden emplearse en células TK- o APRT-, respectivamente. Además puede usarse la resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas como base para la selección. Por ejemplo, el DHFR que confiere resistencia a metotrexato (Wigler M *et al* (1980) *Proc Natl Acad Sci* 77: 3567-70); el npt que confiere resistencia a los aminoglicósidos neomicina y G-418 (Colbere-Garapin Fetal (1981) *J Mol Biol* 150: 1-14) y als o pat, que confieren resistencia a clorsulfurón y fosfofinotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, anteriormente). Se han descrito genes de selección adicionales, por ejemplo, trpB que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman S C y R C Mulligan (1988) *Proc Natl Acad Sci* 85: 8047-51). Recientemente, el uso de marcadores visibles ha obtenido popularidad con marcadores tales como antocianinas, beta glucuronidasa y su sustrato, GUS y luciferasa y su sustrato, luciferina, usándose ampliamente no sólo para identificar transformantes, sino también para cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable atribuible a un sistema vector específico (Rhodes C A *et al* (1995) *Methods Mol Biol* 55: 121-131).

Identificación de transformantes que contienen la secuencia polinucleotídica

Aunque la presencia/ausencia de expresión de gen marcador sugiere que el gen de interés también está presente, la presencia y expresión de una sHASEGP activa debería confirmarse. Por ejemplo, si la sHASEGP se inserta en el interior de una secuencia génica marcadora, pueden identificarse células recombinantes que contienen sHASEGP por ausencia de función génica de marcador. Como alternativa, un gen marcador puede situarse en tándem con una secuencia de sHASEGP bajo el control de un solo promotor. La expresión del gen marcador en respuesta a la inducción o selección indica habitualmente la expresión de la sHASEGP en tándem también. La detección de una sHASEGP activa a pH neutro apropiadamente glicosilada puede determinarse por medio del ensayo de los medios acondicionados para determinar la actividad enzimática de sHASEGP en condiciones apropiadas.

Purificación de sHASEGP

Pueden cultivarse células hospedadoras transformadas con una secuencia de nucleótidos de sHASEGP en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína purificada a partir del cultivo celular. La proteína producida mediante una célula recombinante se secreta preferiblemente, pero puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o del vector usado. Como se entenderá por los especialistas en la técnica, pueden diseñarse vectores de expresión que contienen sHASEGP con secuencias señal que faciliten la secreción directa de sHASEGP a través de una membrana celular procarionota o eucariota. Otras construcciones recombinantes pueden unir la sHASEGP a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio polipeptídico que facilitará la purificación de proteínas solubles (Kroll D J *et al* (1993) *DNA Cell Biol* 12: 441-53; consúltese la discusión de vectores a continuación que contienen proteínas de fusión).

ES 2 335 005 T3

La sHASEGP también puede expresarse como proteína recombinante con uno o más dominios polipeptídicos adicionales añadidos para facilitar la purificación de proteína. Dichos dominios de facilitación de la purificación incluyen, pero sin limitación, péptidos de quelación de metales tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de extensión/purificación por afinidad FLAGS (Immunex Corp, Seattle Wash). La inclusión de secuencias enlazadoras escindibles tales como Factor XA o enteroquinasa (Invitrogen, San Diego Calif.) entre el dominio de purificación y la sHASEGP es útil para facilitar la purificación. Un vector de expresión de este tipo proporciona la expresión de una proteína de fusión que comprende una sHASEGP y contiene un ácido nucleico que codifica 6 restos histidina seguido de tiorredoxina y un sitio de escisión de enteroquinasa. Los restos histidina facilitan la purificación sobre IMIAC (cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados, como se describe en Porath *et al* (1992) Protein Expression and Purification 3: 263-281), mientras que el sitio de escisión enteroquinasa proporciona un medio para purificar la quimiocina a partir de la proteína de fusión.

Además de la producción recombinante, pueden producirse fragmentos de sHASEGP mediante síntesis peptídica directa usando técnicas en fase sólida (consúltese Stewart *et al* (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, W H Freeman Co, San Francisco; Merrifield J (1963) J Am Chem Soc 85: 2149-2154). La síntesis de proteínas *in vitro* puede realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. Puede conseguirse una síntesis automática, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City Calif.) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Diversos fragmentos de sHASEGP pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando métodos químicos para producir la molécula de longitud completa.

Se generan vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes, o porciones de los mismos de un polipéptido sHASEGP, por ejemplo, subclonando las porciones codificantes en el sitio de restricción de EcoRI de cada uno de los tres vectores PGEX (vectores de expresión de glutatión S-transferasa (Smith y Johnson, Gene 7: 31-40 (1988)). Esto permite la expresión de productos en la fase de lectura correcta. Los vectores y sistemas ejemplares para la expresión de los dominios hialuronidasa de los polipéptidos sHASEGP incluyen los vectores de Pichia bien conocidos (disponibles, por ejemplo, en Invitrogen, San Diego, CA), particularmente los diseñados para la secreción de las proteínas codificadas. La proteína también puede expresarse citoplásmicamente, tal como en los cuerpos de inclusión. Se describe en los ejemplos un vector ejemplar.

Los plásmidos para la transformación de células de *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, la patente de Estados Unidos 4.952.496; disponibles en Novagen, Madison, WI; véase también la bibliografía publicada por Novagen que describe el sistema).

Dichos plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor lac de T7, el terminador de T7, el operador lac de *E. coli* inducible y el gen represor de lac; pET 12A-C, que contiene el promotor de T7, el terminador de T7 y la señal de secreción OMPT de *E. coli*; y pET 15B y PET19B (Novagen, Madison, WI), que contienen una secuencia líder marcada con His para uso en la purificación con una columna de His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión después de la purificación sobre la columna; la región promotora lac de T7 y el terminador de T7.

Los vectores se introducen en células hospedadoras, tales como células de Pichia y células bacterianas, tales como *E. coli*, y las proteínas se expresan en las mismas. Las cepas de Pichia ejemplares incluyen, por ejemplo, GS115. Los hospedadores bacterianos ejemplares contienen copias cromosómicas de ADN que codifica la ARN polimerasa de T7 unida operativamente a un promotor inducible, tal como el promotor LACUV (véase, la Patente de Estados Unidos N° 4.952.496). Dichos hospedadores incluyen, pero sin limitación, la cepa de *E. coli* lisogénica BL21 (DE3).

Los dominios, derivados y análogos de sHASEGP pueden producirse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una vez que se identifica una célula recombinante que expresa un polipéptido sHASEGP o un dominio, fragmento o derivado del mismo, el producto génico individual puede aislarse y analizarse. Esto se consigue mediante ensayos basados en las propiedades físicas y/o funcionales de la proteína, incluyendo, pero sin limitación, marcaje radioactivo del producto seguido de análisis mediante electroforesis en gel, inmunoensayo, entrecruzamiento con producto marcado con marcador y ensayos de actividad proteolítica.

Los polipéptidos sHASEGP pueden aislarse y purificarse mediante métodos convencionales conocidos en la técnica (a partir de fuentes naturales o células hospedadoras recombinantes que expresen los complejos o proteínas), incluyendo, pero sin limitación, cromatografía en columna (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, exclusión en gel, fase inversa a alta presión y líquida rápida de proteínas), centrifugación diferencial, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional usada para purificación de proteínas.

En una realización, puede purificarse una sHASEGP hasta la homogeneidad a partir de los medios acondicionados definidos químicamente de células de DG44 transfectadas con HZ24 y amplificadas con metotrexato mediante 1) diafiltración de flujo tangencial, 2) unión y elución a partir de cromatografía de intercambio aniónico, 3) cromatografía de flujo a través de fenilsefarosa, 4) unión y elución a partir de cromatografía de fenilboronato y 4) unión y elución con cromatografía de hidroxapatita.

Pueden evaluarse las propiedades funcionales usando cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica.

ES 2 335 005 T3

Como alternativa, una vez que se identifica un polipéptido sHASEGP o su dominio o derivado, la secuencia de aminoácidos de la proteína puede deducirse a partir de la secuencia de nucleótidos del gen que la codifica. Como resultado, la proteína o su dominio o derivado pueden sintetizarse mediante métodos químicos convencionales conocidos en la técnica (por ejemplo, véase Hunkapiller *et al*, Nature 310: 105-111 (1984)), seguido de glicosilación *in vitro*.

Pueden realizarse manipulaciones de secuencias de polipéptidos sHASEGP a nivel de proteína. También se contemplan en este documento proteínas polipeptídicas sHASEGP, dominios de las mismas, derivados o análogos o fragmentos de las mismas, que se modifican de forma diferencial durante o después de la traducción, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, pegilación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace con una molécula de anticuerpo u otro ligando celular.

Puede realizarse cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación, escisión química específica por bromuro de cianógeno, tripsina, quimiotripsina, papaína, V8, NABH₄, acetilación, formilación, oxidación, reducción, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina y otros agentes de este tipo.

Además, pueden sintetizarse químicamente dominios, análogos y derivados de un polipéptido sHASEGP. Por ejemplo, puede sintetizarse un péptido que se corresponde con una porción de un polipéptido sHASEGP que incluye el dominio deseado o que media la actividad deseada *in vitro* mediante el uso de un sintetizador de péptidos.

Además, si se desea, pueden introducirse aminoácidos no clásicos o análogos de aminoácidos químicos como sustitución o adición en la secuencia de polipéptido sHASEGP. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero sin limitación, los D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido α -aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, E-ABU, e-Ahx, ácido 6-aminohexanoico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos de diseño tales como β -metil-aminoácidos, α -metil-aminoácidos, na-metil-aminoácidos y análogos de aminoácidos en general. Además, el aminoácido puede ser d (dextrorrotatorio) o l (levorrotatorio).

En los casos en los que se sospecha que los productos naturales son mutantes o se aíslan de nuevas especies, la secuencia de aminoácidos del polipéptido sHASEGP aislado de la fuente natural, así como los expresados *in vitro* o a partir de vectores de expresión sintetizados *in vivo* o *in vitro* puede determinarse a partir del análisis de la secuencia de ADN o, como alternativa, mediante secuenciación directa de la proteína aislada. Dicho análisis puede realizarse mediante secuenciación manual o por uso de un secuenciador de aminoácidos automático.

Modificaciones- Se contemplan en este documento una diversidad de modificaciones de los polipéptidos y dominios de sHASEGP. Una molécula de ácido nucleico codificante de sHASEGP puede modificarse por cualquiera de numerosas estrategias conocidas en la técnica (Sambrook *et al*. (1990), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York). Las secuencias pueden escindirse en sitios apropiados con endonucleasas de restricción, seguido de modificación enzimática adicional si desea, aislarse y ligarse *in vitro*. En la producción del gen que codifica un dominio, derivado o análogo de sHASEGP, debe tenerse cuidado para asegurar que el gen modificado conserva la fase de lectura de traducción original, no interrumpida por señales de terminación de la traducción, en la región génica en la que esté codificada la actividad deseada.

Además, las moléculas de ácido nucleico que codifican sHASEGP pueden mutarse *in vitro* o *in vivo* para generar y/o destruir las secuencias de traducción, inicio y/o terminación o para generar variaciones en regiones codificantes y/o formar nuevos sitios de endonucleasas de restricción o destruir los preexistentes, para facilitar una modificación *in vitro* adicional. Además, como se describe en este documento se contemplan mutaciones con alteraciones de secuencia primaria tales como sustituciones de restos Cys y eliminación o adición de sitios de glicosilación; la sHASEGP de la SEC ID N^o: 1 tiene siete sitios de glicosilación potenciales. Dichas mutaciones pueden efectuarse mediante cualquier estrategia para mutagénesis conocida en la técnica incluyendo, pero sin limitación, mutagénesis química y mutagénesis dirigida *in vitro* (Hutchinson *et al.*, J. Biol. Chem. 253: 6551-6558 (1978)), uso de enlazadores TABE (Farmacia). En una realización, por ejemplo, un polipéptido sHASEGP o dominio del mismo se modifica para que incluya un marcador fluorescente. En otras realizaciones específicas, el polipéptido sHASEGP está modificado para tener un reactivo heterobifuncional, y dichos reactivos heterobifuncionales pueden usarse para entrecruzar los miembros del complejo.

Además, pueden sintetizarse químicamente dominios, análogos y derivados de una sHASEGP. Por ejemplo, puede sintetizarse *in vitro* un péptido correspondiente a una porción de una sHASEGP que incluye el dominio deseado o que media la actividad deseada mediante el uso de un sintetizador de péptidos. Además, si se desea, pueden introducirse aminoácidos no clásicos o análogos químicos de aminoácidos como una sustitución o adición en la secuencia de sHASEGP. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero sin limitación, los D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido α -aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, S-ABU, e-Ahx, ácido 6-aminohexanoico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos de diseño tales como ti-metil-aminoácidos, α -metil-aminoácidos, na-metil-aminoácidos y análogos de aminoácidos en general. Además, el aminoácido puede ser d (dextrorrotatorio) o l (levorrotatorio).

F. Generación de una sHASEGP glicosilada funcionalmente activa con restos de azúcares ligados a N

Es necesaria sHASEGP humana N-glicosilada apropiadamente para generar una proteína estable catalíticamente. Puede conseguirse la glicosilación ligada a N de sHASEGP mediante diversas técnicas. La glicosilación de sHASEGP puede conseguirse introduciendo ácidos nucleicos que codifican sHASEGP en células de origen eucariota capaces de una glicosilación ligada a N apropiada o, como alternativa, por contacto del polipéptido sHASEGP con extractos sin células o enzimas purificadas capaces de introducir los restos de azúcares ligados a N deseados.

Selección de un sistema de expresión

Los sistemas de expresión de células eucariotas varían en el grado y tipo de glicosilación que introducen en un polipéptido expresado de forma ectópica. Las células CHO son, por ejemplo, altamente eficaces para la introducción de glicosilación ligada a N en un polipéptido sHASEGP activo.

Los sistemas de expresión eucariotas adicionales que introducen glicosilación ligada a N para generar un producto de sHASEGP funcional por introducción de un plásmido de expresión de sHASEGP humana en dichas células y ensayo para determinar la actividad a pH neutro. Puede determinarse la glicosilación ligada a N apropiada por medio de un análisis FACE de oligosacáridos liberados por PNGASA. Se proporcionan adicionalmente en este documento perfiles de glicosilación de sHASEGP catalíticamente activas. La verificación de la glicosilación también puede realizarse mediante el tratamiento de sHASEGP de dichas células con PNGASA-F o por cultivo de dichas células en tunicamicina, seguido de introducción de ácidos nucleicos codificantes de sHASEGP.

N-glicosilación de polipéptido sHASEGP *in vitro*. El polipéptido sHASEGP puede N-glicosilarse por contacto de un polipéptido sHASEGP con extractos sin células que contienen una actividad capaz de transferir azúcares ligados a N a polipéptido sHASEGP, tales como membranas microsomales caninas o a través de transcripción y traducción acopladas, como está disponible en el mercado (Promega Madison WI).

Se considera que los oligosacáridos tienen un extremo reductor y un extremo no reductor, independientemente de que el sacárido en el extremo reductor sea de hecho un azúcar reductor. De acuerdo con la nomenclatura aceptada, los oligosacáridos se representan en este documento con el extremo no reductor a la izquierda y el extremo reductor a la derecha. Todos los oligosacáridos descritos en este documento se describen con el nombre o abreviatura para el sacárido no reductor (por ejemplo, Gal), seguido de la configuración del enlace glicosídico (alfa o beta), el enlace de anillo, la posición de anillo del sacárido reductor implicado en el enlace y, después, el nombre o abreviatura del sacárido reductor (por ejemplo, GlcNAc). El enlace entre dos azúcares puede expresarse, por ejemplo, como 2,3, 2→3 ó (2,3). Cada sacárido es una piranosa.

Como se usa en este documento, el resto azúcar ligado a N se refiere a un oligosacáridos unido a una sHASEGP mediante el nitrógeno amida de restos Asn. Los oligosacáridos ligados a N se incluyen en varios tipos principales (de oligomanosa, complejos, híbridos, sulfatados), teniendo todos núcleos de 3-GlcNAc-GlcNAc (Man) unidos por medio del nitrógeno amida de restos Asn que se incluyen en secuencias -Asn-Xaa-Thr/Ser- (en las que Xaa no es Pro). Los sitios ligados a N se asignan con frecuencia indirectamente por la aparición de un ciclo "en blanco" durante la secuenciación. Puede realizarse una identificación positiva después de la liberación del oligosacárido por PNGasa F, que convierte la Asn glicosilada en Asp. Después de la liberación por PNGasa F, los oligosacáridos ligados a N pueden purificarse usando cromatografía Bio-Gel P-6, sometiendo a la combinación de oligosacáridos a cromatografía preparativa de intercambio aniónico a pH elevado (HPAEC) (Townsend *et al.*, (1989) Anal. Biochem. 182, 1-8). Se pueden resolver ciertos isómeros de oligosacáridos usando HPAEC. Los restos fucosa desplazarán las posiciones de elución antes en el cromatograma de HPAEC, mientras que los restos ácido siálico adicionales aumentarán el tiempo de retención. El tratamiento simultáneo de glicoproteínas cuyas estructuras de oligosacáridos se conocen (por ejemplo, fetuína bovina, glicoproteína ácida α -1, ovoalbúmina, ARNasa B, transferrina) puede facilitar la asignación de los picos de oligosacáridos. Los oligosacáridos recogidos pueden caracterizarse por una combinación de análisis de composición y de enlaces por metilación (Waeghe *et al.*; (1983), Carbohydr Res. 123, 281-304), asignándose las configuraciones anoméricas mediante espectroscopía de RMN (Van Halbeek (1993) en Methods Enzymol 230).

Como alternativa, pueden identificarse oligosacáridos mediante electroforesis de carbohidratos asistida por fluorescencia (FACE) Callewaert *et al.* (2001) Glycobiology 11, 275-281.

G. Detección y caracterización de restos de azúcares ligados a N en sHASEGP

La determinación de si una proteína está de hecho glicosilada es la etapa inicial en el análisis de glicanos de glicoproteínas. La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) se ha convertido en el método de elección como la etapa final antes de la secuenciación de proteínas. Las proteínas glicosiladas migran con frecuencia como bandas difusas mediante SDS-PAGE. Una disminución marcada en el ancho de banda y un cambio en la posición de migración después del tratamiento con péptido-N4-(N-acetil-D-glucosaminil) asparagina amidasa (PNGasa F) se considera diagnóstico de glicosilación ligada a N. Si los otros tipos de glicosilación son predominantes deben usarse otras estrategias. Los métodos de transferencia de lectina proporcionan una estrategia que es independiente de la clase de glicosilación (N frente a O). Las lectinas, proteínas de unión a carbo-

hidratos de diversos tejidos vegetales, tienen tanto una alta afinidad como una estrecha especificidad por un amplio intervalo de epítomos de azúcares definidos que se encuentran en glicanos de glicoproteínas (Cummins, R. D. (1994) *Methods in Enzymol.* 230, 66-86). Cuando se conjugan con biotina o digoxigenina, pueden identificarse fácilmente sobre transferencias de membrana a través de una reacción colorimétrica que utiliza avidina o anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Haselbeck, *et al.* (1993) *Methods in Mol. Biol.* 141, 161-173), análoga a las reacciones de anticuerpo secundario-fosfatasa alcalina empleadas en transferencias de Western. La exploración con un panel de lectinas con una especificidad bien definida puede proporcionar una información considerable acerca del complemento de carbohidratos de una glicoproteína. De forma importante, la amplificación del desarrollo de color es lo bastante alta para que puedan observarse fácilmente 10-50 ng de una glicoproteína en una transferencia de membrana de un SDS-PAGE. Aunque las lectinas presentan una afinidad muy elevada por sus ligandos afines, algunas ponen de manifiesto una avidez significativa por epítomos estructuralmente relacionados. Por lo tanto, es importante señalar cuidadosamente la posibilidad de reactividad cruzada cuando se selecciona un panel de lectinas y aplicar las que tengan la mayor probabilidad de diferenciar individualmente glicanos ligados a N complejos, híbridos y ricos en manosa de estructuras ligadas a O.

También puede usarse el análisis de monosacáridos para determinar si la sHASEGP está glicosilada y, como en el caso del análisis de lectina, proporciona información adicional sobre características estructurales. El análisis cuantitativo de la composición de monosacáridos i) identifica proteínas glicosiladas, ii) proporciona la proporción molar de azúcares individuales respecto a proteína, iii) sugiere, en algunos casos, la presencia de clases de oligosacáridos, iv) es la primera etapa en el diseño de una estrategia de elucidación estructural y v) proporciona una medida de la consistencia de producción para compuestos terapéuticos de glicoproteína recombinante. En los últimos años se ha usado ampliamente la cromatografía de intercambio aniónico a alto pH con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) para determinar la composición de monosacáridos (Townsend, *et al.* (1995) en *Carbohydrate Analysis: High-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis* (Z. El Rassi ed.) págs. 181-209). Más recientemente, se han introducido métodos de marcaje basados en fluoróforos y muchos están disponibles en forma de kit. Una ventaja diferente de los métodos fluorescentes es un aumento en la sensibilidad (50 veces). Una desventaja potencial es que diferentes monosacáridos pueden demostrar diferente selectividad por el fluoróforo durante la reacción de acoplamiento, en el hidrolizado o en la mezcla patrón externa. Sin embargo, el aumento en la sensibilidad y la capacidad para identificar qué monosacáridos están presentes a partir de una pequeña porción de la cantidad total de glicoproteína disponible, así como el potencial de una mayor sensibilidad usando fluorescencia inducida por láser hace que esta estrategia sea atractiva.

El análisis de la composición de monosacáridos de pequeñas cantidades de sHASEGP se realiza mejor sobre membranas de PVDF (PSQ) después de electrotransferencia (Weitzhandler *et al.*, (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 5121-5130) o si se van a analizar alícuotas más pequeñas sobre transferencias puntuales. El PVDF es una matriz ideal para análisis de carbohidratos puesto que ni los mono- ni los oligosacáridos se unen a la membrana, una vez liberados por hidrólisis ácida o enzimática.

El análisis de FACE es un medio eficaz para detectar perfiles de glicosilación de sHASEGP. La generación de perfiles de oligosacáridos ligados a N FACE[®] (Prozyme) con geles de oligosacáridos al 30% es un mecanismo de este tipo. Los oligosacáridos escindidos a partir de 100 µg de glicoproteínas por digestión enzimática con N-Glicanasa (también conocida como PNGasa), marcados usando el fluoróforo ANTS y separados por electroforesis pueden usarse para la detección de perfiles de glicosilación de sHASEGP. Las posiciones relativas de las bandas oligosacáridas se determinan por procesamiento de la muestra y diluciones de la muestra al lado de una escalera patrón de oligosacáridos que designaba la distancia de migración en unidades de Grado de Polimerización (DP).

H. Métodos de exploración para identificar compuestos que modulan la actividad de sHASEGP

Se ejemplifican varios tipos de ensayos y se describen en este documento. Se entiende que los dominios hialuronidasa pueden usarse en otros ensayos. Se muestra en este documento, sin embargo, que los dominios hialuronidasa presentan actividad catalítica.

Como tales son ideales para ensayos de exploración *in vitro*.

También pueden usarse en ensayos de unión.

Los zimógenos de longitud completa de sHASEGP, enzimas activadas y dominios hialuronidasa se contemplan para uso en cualquier ensayo de exploración conocido por los especialistas en la técnica, incluyendo los proporcionados en este documento. Por lo tanto, la siguiente descripción, si se refiere a ensayos de hialuronidasa, pretende aplicarse al uso de un dominio hialuronidasa de cadena sencilla o una porción catalíticamente activa del mismo de cualquier hialuronidasa, incluyendo una sHASEGP. Se proporcionan en este documento otros ensayos tales como ensayos de unión, particularmente para el uso con una sHASEGP, incluyendo cualquier variante, tal como variantes de corte y empalme de la misma.

1. Ensayos catalíticos para identificación de agentes que modulan la actividad hialuronidasa de una proteína sHASEGP. Se proporcionan en este documento métodos para identificar un modulador de la actividad catalítica de una sHASEGP, particularmente un dominio hialuronidasa de cadena sencilla o porción catalíticamente activa del mismo.

ES 2 335 005 T3

Los métodos pueden ponerse en práctica por: contacto de la sHASEGP, un zimógeno de longitud completa o forma activada y, particularmente, un dominio de cadena sencilla de la misma con un sustrato de la sHASEGP en presencia de una sustancia de ensayo y detección de la proteólisis del sustrato, por la que se evalúa la actividad de la sHASEGP, y comparación de la actividad con un control. Por ejemplo, un control puede ser la actividad de la sHASEGP evaluada por contacto de una sHASEGP, incluyendo un zimógeno de longitud completa o forma activada y, particularmente, un dominio de cadena sencilla de la misma, particularmente un dominio de cadena sencilla de la misma, con un sustrato de la sHASEGP y detección de la proteólisis del sustrato, por lo que se evalúa la actividad de la sHASEGP. Los resultados en presencia y ausencia de los compuestos de ensayo se compararan. Una diferencia en la actividad indica que la sustancia de ensayo modula la actividad de la sHASEGP. También se contemplan activadores de la escisión de activación de sHASEGP; dichos ensayos se analizan a continuación.

En una realización, se exploran simultáneamente una pluralidad de sustancias de ensayo en el método de exploración anterior. En otra realización, la sHASEGP se aísla de una célula diana como medio para identificar después agentes que sean potencialmente específicos para la célula diana.

En otra realización, una sustancia de ensayo es un compuesto terapéutico, y por la que una diferencia de la actividad de sHASEGP medida en presencia y ausencia de la sustancia de ensayo indica que la célula diana responde al compuesto terapéutico.

Un método incluye las etapas de (a) poner en contacto el polipéptido sHASEGP o dominio hialuronidasa del mismo con uno o una pluralidad de compuestos de ensayo en condiciones que conducen a la interacción entre el ligando y los compuestos; y (b) identificar uno o más compuestos en la pluralidad que se unan específicamente al ligando.

Otro método proporcionado en este documento incluye las etapas de a) poner en contacto un polipéptido sHASEGP o dominio hialuronidasa del mismo con un sustrato del polipéptido sHASEGP y detectar la degradación de sustrato, por la que se evalúa la actividad del polipéptido sHASEGP; b) poner en contacto el polipéptido sHASEGP con un sustrato del polipéptido sHASEGP en presencia de una sustancia de ensayo y detectar la degradación del sustrato, por la que se evalúa la actividad del polipéptido sHASEGP; y c) comparar la actividad del polipéptido sHASEGP evaluado en las etapas a) y b), por lo que si la actividad medida en la etapa a) difiere de la actividad medida en la etapa b) indica que la sustancia de ensayo modula la actividad del polipéptido sHASEGP.

En otra realización, se explora simultáneamente una pluralidad de las sustancias de ensayo. Al comparar la actividad de un polipéptido sHASEGP en presencia y ausencia de una sustancia de ensayo para evaluar si la sustancia de ensayo es un modulador del polipéptido sHASEGP, no es necesario evaluar la actividad en paralelo, aunque dicha medición en paralelo es típica. Es posible medir la actividad del polipéptido sHASEGP en un punto temporal y comparar la actividad medida con un valor histórico de la actividad del polipéptido sHASEGP.

Por ejemplo, se puede medir la actividad del polipéptido sHASEGP en presencia de una sustancia de ensayo y compararla con un valor histórico de la actividad del polipéptido sHASEGP medida previamente en ausencia de la sustancia de ensayo y viceversa. Esto puede conseguirse, por ejemplo, proporcionando la actividad del polipéptido sHASEGP en un prospecto o folleto proporcionado con un kit para realizar el ensayo.

Se describen métodos para seleccionar sustratos para una sHASEGP particular en los Ejemplos y se ejemplifican ensayos de hialuronidasa particulares.

Se proporcionan combinaciones y kits que contienen las combinaciones que incluyen opcionalmente instrucciones para realizar los ensayos. Las combinaciones incluyen un polipéptido sHASEGP y un sustrato del polipéptido sHASEGP que se ensayará; y, opcionalmente, reactivos para detectar la proteólisis del sustrato. Los sustratos, que pueden ser moléculas cromogénicas o fluorogénicas incluyendo glicosaminoglicanos sujetos a proteólisis por un polipéptido sHASEGP particular, pueden identificarse empíricamente por ensayo de la capacidad del polipéptido sHASEGP para escindir el sustrato de ensayo. Se identifican los sustratos que se escinden más eficazmente, es decir, a las menores concentraciones y/o a mayor velocidad o en condiciones deseables.

En este documento se proporciona adicionalmente un kit que contiene la combinación descrita anteriormente. El kit incluye opcionalmente instrucciones para identificar un modulador de la actividad de un polipéptido sHASEGP. Cualquier polipéptido sHASEGP se contempla como diana para identificar moduladores de la actividad del mismo.

2. Ensayos de unión. También se proporcionan en este documento métodos para la identificación y aislamiento de agentes, particularmente compuestos que se unen a sHASEGP. Los ensayos están diseñados para identificar agentes que se unen al dominio hialuronidasa aislado (o una proteína, distinta de un polipéptido sHASEGP, que contiene el dominio hialuronidasa de un polipéptido sHASEGP) y a la forma activada, incluyendo la forma activada derivada del zimógeno de longitud completa o de un dominio hialuronidasa extendido. Los compuestos identificados son candidatos o compuestos candidato para la identificación de compuestos para tratamientos de trastornos y enfermedades que implican una actividad hialuronidasa aberrante. Los polipéptidos sHASEGP usados en los métodos incluyen cualquier polipéptido sHASEGP como se ha definido en este documento, incluyendo el dominio hialuronidasa de cadena sencilla de sHASEGP o una porción proteólicamente activa del mismo.

ES 2 335 005 T3

Se proporcionan en este documento una diversidad de métodos. Estos métodos pueden realizarse en reacciones en solución o en fase sólida en las que el polipéptido o polipéptidos sHASEGP o dominio o dominios hialuronidasa de los mismos se unen directamente o indirectamente mediante un enlazador a un soporte sólido. Se describen ensayos de exploración en los Ejemplos y estos ensayos se han usado para identificar compuestos candidatos.

Para los fines de este documento, se proporcionan todos los ensayos de unión descritos anteriormente para sHASEGP.

Se proporcionan en este documento métodos para identificar un agente, tal como un compuesto, que se une específicamente a un dominio hialuronidasa de cadena sencilla de sHASEGP, una sHASEGP activada de longitud completa o un dominio hialuronidasa de doble cadena de la misma. El método puede realizarse mediante (a) contacto de la sHASEGP con uno o una pluralidad de agentes de ensayo en condiciones que conducen a la unión entre la sHASEGP y un agente; y (b) identificación de uno o más agentes dentro de la pluralidad que se una específicamente a la sHASEGP.

Por ejemplo, en la realización de dichos métodos el polipéptido sHASEGP se mezcla con un compañero de unión potencial o un extracto o fracción de una célula en condiciones que permitan la asociación de compañeros de unión potenciales con el polipéptido. Después de mezclar, los péptidos, polipéptidos, proteínas u otras moléculas que se han asociado con una sHASEGP se separan de la mezcla. El compañero de unión que se une a la sHASEGP puede retirarse después y analizarse adicionalmente. Para identificar y aislar un compañero de unión, puede usarse la proteína completa, por ejemplo, la proteína completa descrita de la SEC ID N°: 1. Como alternativa, puede usarse un fragmento de la proteína.

Pueden usarse una diversidad de métodos para obtener extractos celulares o fluidos corporales tales como sangre, suero, orina, sudor, líquido sinovial, LCR y otros fluidos de este tipo.

Por ejemplo, pueden romperse células usando métodos de ruptura física o química. Los Ejemplos de métodos de ruptura física, incluyen, pero sin limitación, sonicación y ruptura mecánica. Los Ejemplos de métodos de lisis química incluyen, pero sin limitación, lisis con detergente y lisis enzimática. Un especialista puede adaptar fácilmente métodos para preparar extractos celulares para obtener extractos para el uso en los presentes métodos.

Una vez que se prepara un extracto de una célula, el extracto se mezcla con la sHASEGP en condiciones en las que pueda suceder la asociación de la proteína con el compañero de unión. Pueden usarse una diversidad de condiciones, incluyendo condiciones que se parezcan a las condiciones que se encuentran en el citoplasma de una célula humana o en un fluido corporal, tal como la sangre. Las características tales como osmolaridad, pH, temperatura y la concentración de extracto celular usado pueden variarse para optimizar la asociación de la proteína con el compañero de unión. De forma similar, se conocen métodos para el aislamiento de moléculas de interés a partir de fluidos corporales.

Después de la mezcla en condiciones apropiadas, el complejo unido se separa de la mezcla. Pueden usarse una diversidad de técnicas para separar la mezcla. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos específicos para una sHASEGP para inmunoprecipitar el complejo de compañero de unión. Como alternativa, pueden usarse técnicas de separación química convencionales tales como cromatografía y centrifugación de densidad/sedimentación.

Después de eliminar los constituyentes celulares no asociados en el extracto, el compañero de unión puede disociarse del complejo usando métodos convencionales. Por ejemplo, puede conseguirse la disociación alterando la concentración salina o el pH de la mezcla.

Para ayudar a separar las parejas de compañeros de unión asociados del extracto mixto, las sHASEGP pueden inmovilizarse en un soporte sólido. Por ejemplo, la proteína puede unirse a una matriz de nitrocelulosa o perlas acrílicas. La unión de la proteína o un fragmento de la misma a un soporte sólido ayuda a separar parejas de péptido/compañero de unión de otros constituyentes que se encuentran en el extracto. Los compañeros de unión identificados pueden ser una sola proteína o un complejo compuesto por dos o más proteínas.

Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico que codifican las hialuronidasas de cadena sencilla pueden usarse en un sistema de doble híbrido de levadura. El sistema de doble de híbrido de levadura se ha usado para identificar otros pares de proteína-compañero y pueden adaptarse fácilmente para emplear las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento.

Otro ensayo de unión *in vitro*, particularmente para una sHASEGP, usa una mezcla de un polipéptido que contiene al menos el dominio catalítico de una de estas proteínas y una o más dianas de unión candidatas o sustratos. Después de incubar la mezcla en condiciones apropiadas, se evalúa la capacidad de la sHASEGP o un fragmento polipeptídico de la misma que contiene el dominio catalítico para unirse a o interactuar con el sustrato candidato. Para ensayos de unión sin células, uno de los componentes incluye o se acopla a un marcador detectable. El marcador puede proporcionar una detección directa, tal como radiactividad, luminiscencia, densidad óptica o de electrones, etc. o una detección indirecta tal como un marcador epitópico, una enzima, etc. Pueden emplearse una diversidad de métodos para detectar el marcador dependiendo de la naturaleza del marcador y de otros componentes de ensayo. Por ejemplo, el marcador puede detectarse unido al sustrato sólido, o a una porción del complejo unido que contiene al marcador puede separarse del sustrato sólido y después de eso detectarse el marcador.

3. La detección de sHASEGP de transducción de señales, que es una proteína anclada a membrana, puede estar implicada directa o indirectamente en la transducción de señales directamente como receptor de superficie celular o indirectamente por proteínas de activación, tales como factores procrecimiento que pueden iniciar la transducción de señales.

Además, la sHASEGP secretada, tal como el dominio soluble de sHASEGP que se describe en la SEC ID N°: 4, puede estar implicada en la transducción de señales directamente por unión a o interacción con un receptor de superficie celular o indirectamente por activación de proteínas, tales como factores procrecimiento que pueden iniciar la transducción de señales. Los especialistas en la técnica conocen bien ensayos para evaluar la transducción de señales y pueden adaptarse para el uso con el polipéptido sHASEGP.

Se proporcionan ensayos para identificar agentes que afectan o alteran la transducción de señales mediada directa o indirectamente, tal como por activación de un factor procrecimiento mediante una sHASEGP, particularmente de longitud completa o una porción suficiente para anclarse al dominio extracelular o una porción funcional del mismo de una sHASEGP en la superficie de una célula. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos basados en transcripción en los que la modulación de una señal transducida se evalúa por detección de un efecto sobre la expresión de un gen indicador (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.436.128).

4. Métodos para Identificar Agentes que Modulen la Expresión de un Ácido Nucleico que codifica una sHASEGP. Otra realización proporciona métodos para identificar agentes que modulan la expresión de un ácido nucleico que codifica una sHASEGP. Dichos ensayos usan cualquier medio disponible de control para cambios en el nivel de expresión de los ácidos nucleicos que codifican una sHASEGP.

Pueden usarse formatos de ensayo para controlar la capacidad del agente para modular la expresión de un ácido nucleico que codifica una sHASEGP. Por ejemplo, puede controlarse la expresión de ARNm directamente por hibridación con los ácidos nucleicos. Además pueden usarse ensayos enzimáticos como los descritos para detectar agentes que modulen la expresión de sHASEGP.

Se exponen líneas celulares al agente a ensayar en condiciones y durante un tiempo apropiado y se aísla el ARN total o ARNm mediante procedimientos convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook *et al* (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Pueden prepararse sondas para detectar diferencias en los niveles de expresión de ARN entre células expuestas al agente y células de control a partir de los ácidos nucleicos. Es típico, pero no necesario, diseñar sondas que hibriden sólo con ácidos nucleicos diana en condiciones de alta rigurosidad. Sólo se forman híbridos de ácidos nucleicos altamente complementarios en condiciones de alta rigurosidad. Por lo consiguiente, la rigurosidad de las condiciones de ensayo determina la cantidad de complementariedad que debería existir entre dos cadenas de ácido nucleico para formar un híbrido. La rigurosidad debería seleccionarse para maximizar la diferencia en la estabilidad entre el híbrido de sonda:diana y los híbridos de sonda:no diana potenciales.

Por ejemplo, pueden expresarse fragmentos N- y C-terminales de la sHASEGP en bacterias y usarse para buscar proteínas que se unan a estos fragmentos. Pueden prepararse proteínas de fusión, tales como fusión de marcador His o GST con las regiones N- o C-terminales de la sHASEGP para su uso como sustrato. Estas proteínas de fusión pueden acoplarse a, por ejemplo, perlas de Glutación-Sefarosa y después sondarse con lisados celulares o fluidos corporales. Antes de la lisis, las células o fluidos corporales pueden tratarse con un agente candidato que puede modular una sHASEGP o proteínas que interaccionan con dominios sobre la misma. La unión de proteínas de lisado a las proteínas de fusión puede resolverse mediante SDS-PAGE, aislarse e identificarse mediante secuenciación de proteínas o espectroscopía de masas, como se conoce en la técnica.

Se preparan sondas de anticuerpos por inmunización de hospedadores mamíferos adecuados en protocolos de inmunización apropiados, usando los péptidos, polipéptidos o proteínas si son de una longitud suficiente (por ejemplo, de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más aminoácidos consecutivos) del polipéptido sHASEGP o si se requiere para aumentar la inmunogenicidad, conjugados con vehículos adecuados. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar conjugados inmunogénicos con vehículos, tales como albúmina sérica bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH) u otras proteínas de vehículo. En algunas circunstancias, puede ser eficaz una conjugación directa usando, por ejemplo, reactivos de carbodiimida; en otros casos pueden ser deseables reactivos de enlace tales como los suministrados por Pierce Chemical Co., Rockford, IL para proporcionar accesibilidad al hapteno. Los péptidos haptenos pueden prolongarse en el extremo amino- o carboxi terminal con un resto Cys o intercarse con restos cisteína, por ejemplo, para facilitar la unión a un vehículo.

La administración de los inmunógenos se realiza generalmente por inyección a lo largo de un periodo de tiempo adecuado y con el uso de adyuvantes adecuados, como se entiende generalmente en la técnica. Durante el programa de inmunización, se toman los títulos de anticuerpos para determinar la capacidad de formación de anticuerpos.

Pueden generarse anticuerpos anti-péptido usando péptidos sintéticos que se corresponden, por ejemplo, con los aminoácidos carboxi terminales de la sHASEGP.

Los péptidos sintéticos pueden ser tan pequeños como de 1-3 aminoácidos de longitud, generalmente de al menos 4 o más restos aminoacídicos de longitud. Los péptidos pueden acoplarse a KLH usando métodos convencionales y pueden usarse para inmunizar animales, tales como conejos o ungulados. Después pueden purificarse anticuerpos policlonales, por ejemplo, usando perlas de Actigel que contienen el péptido unido covalentemente.

Aunque los antisueros policlonales producidos de este modo pueden ser satisfactorios para algunas aplicaciones, para composiciones farmacéuticas se usa generalmente el uso de preparaciones monoclonales. Pueden prepararse líneas celulares inmortalizadas que secreten los anticuerpos monoclonales deseados usando el método convencional de Kohler *et al.*, (Nature 256: 495-7 (1975)) o modificaciones que logren la inmortalización de linfocitos o esplenocitos, como se conocen en general. Las líneas celulares inmortalizadas que secretan los anticuerpos deseados se exploran mediante un inmunoensayo en el que el antígeno es el hapteno peptídico, polipéptido o proteína.

Cuando se identifica el cultivo apropiado de células inmortalizadas que secretan el anticuerpo deseado, las células pueden cultivarse *in vitro* o por producción *in vivo* mediante líquido ascítico. Son de interés particular anticuerpos monoclonales que reconocen el dominio catalítico o el sitio (región) de escisión de activación de una sHASEGP.

También pueden producirse los anticuerpos o fragmentos. También pueden producirse regiones que se unen específicamente a las regiones deseadas del receptor en el contexto de quimeras con origen de múltiples especies.

Los agentes que se ensayan en el método anterior pueden seleccionarse aleatoriamente o seleccionarse o diseñarse de forma racional.

Los agentes pueden ser, como ejemplos, péptidos, moléculas pequeñas y carbohidratos. Un especialista puede reconocer fácilmente que no existen límites en lo que se refiere a la naturaleza estructural de los agentes.

Los agentes peptídicos pueden prepararse usando métodos de síntesis de péptidos en fase sólida (o en fase de solución) convencionales, como se conocen en la técnica. Además, el ADN que codifica estos péptidos puede sintetizarse usando instrumentación de síntesis de oligonucleótidos disponible en el mercado y producirse de forma recombinante usando sistemas de producción recombinante convencionales. La producción usando síntesis de péptidos en fase sólida es necesaria si se van a incluir aminoácidos no codificados por genes.

I. Métodos de tratamiento

Se usan sHASEGP identificadas por los métodos de este documento para tratar o prevenir acumulaciones anormales de sustratos de sHASEGP en un animal, particularmente un mamífero, incluyendo un ser humano. En una realización, el método incluye administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una glicoproteína sHASEGP, por lo que la enfermedad o trastorno se trata o se previene.

En otra realización, puede usarse un inhibidor de sHASEGP en el tratamiento de una cantidad excesiva de actividad hialuronidasa a pH neutro. El mamífero tratado puede ser un ser humano. Los inhibidores proporcionados en este documento son los identificados mediante los ensayos de exploración. Además, se contemplan anticuerpos y ácidos nucleicos antisentido o ARN bicatenario (ARNbc), tal como ARNi.

1. Tratamiento antisentido: En una realización específica, como se ha descrito anteriormente en este documento, la función de polipéptido sHASEGP se reduce o se inhibe mediante ácidos nucleicos antisentido de polipéptido sHASEGP para tratar o prevenir una actividad condroitinasa excesiva. Se proporciona el uso terapéutico o profiláctico de ácidos nucleicos de al menos seis nucleótidos, generalmente de hasta aproximadamente 150 nucleótidos, que son antisentido para un gen o ADNc que codifica un polipéptido sHASEGP o una porción del mismo. Un ácido nucleico "antisentido" de polipéptido sHASEGP como se usa en este documento se refiere a un ácido nucleico capaz de hibridar con una porción de un ARN de polipéptido sHASEGP (generalmente ARNm) en virtud de cierta complementariedad de secuencia y generalmente en condiciones de alta rigurosidad. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una región codificante y/o no codificante de un ARNm de polipéptido sHASEGP. Dichos ácidos nucleicos antisentido tienen utilidad como agentes terapéuticos que reducen o inhiben la función del polipéptido sHASEGP y pueden usarse en el tratamiento o la prevención de trastornos como los descritos anteriormente.

Los ácidos nucleicos antisentido de polipéptido sHASEGP son de al menos seis nucleótidos y generalmente son oligonucleótidos (que varían de 6 a aproximadamente 150 nucleótidos, incluyendo de 6 a 50 nucleótidos). La molécula antisentido puede ser complementaria de toda o una porción del dominio hialuronidasa. Por ejemplo, el oligonucleótido es de al menos 10 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 100 nucleótidos o al menos 125 nucleótidos. Los oligonucleótidos pueden ser ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarios o bicatenarios. El oligonucleótido puede modificarse en el resto de base, resto azúcar o cadena principal fosfato. El oligonucleótido puede incluir otros grupos añadidos tales como péptidos o agentes que faciliten el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553-6556 (1989); Lemaitre *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 648-652 (1987); Publicación PCT N° WO 88/09810, publicada el 15 de diciembre de 1988) o de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publicación PCT N° WO 89/10134, publicada el 25 de abril de 1988), agentes de escisión desencadenada por hibridación (véase, por ejemplo, Krol *et al.*, BioTechniques 6: 958-976 (1988)) o agentes intercalantes (véase, por ejemplo, Zon. Pharm. Res. 5: 539-549 (1988)).

ES 2 335 005 T3

5 El ácido nucleico antisentido de polipéptido sHASEGP generalmente es un oligonucleótido, típicamente ADN o ARN monocatenario o un análogo del mismo o mezclas de los mismos. Por ejemplo, el oligonucleótido incluye una secuencia antisentido a una porción de un ácido nucleico que codifica un polipéptido sHASEGP humano. El oligonucleótido puede modificarse en cualquier posición en su estructura con sustituyentes conocidos en general en la técnica.

10 El oligonucleótido antisentido de polipéptido sHASEGP puede incluir al menos un resto de base modificada que se selecciona del grupo que incluye, pero sin limitación, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metiluracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5-*ap*-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxisina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-n-2-carboxi)propiluracilo, (ACP3) w y 2,6-diaminopurina.

20 En otra realización, el oligonucleótido incluye al menos un resto de azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, pero sin limitación, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa. El oligonucleótido puede incluir al menos una cadena principal de fosfato modificada seleccionada de un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforoamidotioato, un fosforoamidato, un fosforodiamidato, un metilfosfonato, un alquilfosfotriéster y un formacetal o análogo del mismo.

25 El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido α -anomérico. Un oligonucleótido α -anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en los que las cadenas discurren paralelas entre sí (Gautier *et al.*, Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641 (1987)).

30 Puede conjugarse el oligonucleótido con otra molécula, tal como, pero sin limitación, un péptido; agente de entrecruzamiento desencadenado por hibridación, agente de transporte o un agente de escisión desencadenada por hibridación. Los oligonucleótidos pueden sintetizarse mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de ADN automático (tal como están disponibles en el mercado en Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, pueden sintetizarse oligonucleótidos fosforotioato mediante el método de Stein *et al.*, Nucl. Acids Res. 16: 3209 (1988)), pueden prepararse oligonucleótidos metilfosfonato mediante el uso de soportes de polímero de vidrio de tamaño de poro controlado (Sarin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7448-7451 (1988)), etc. En una realización específica, el oligonucleótido antisentido de polipéptido sHASEGP incluye ARN catalítico o una ribozima (véase, por ejemplo, la Solicitud Internacional PCT WO 90/11364, publicada el 4 de octubre de 1990; Saber *et al.*, Science 247: 1222-1225 (1990)). En otra realización, el oligonucleótido es un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue *et al.*, Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148 (1987)) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue *et al.*, FEBS Lett. 215: 327-330 (1987)).

40 Como alternativa, el oligonucleótido puede ser ARN bicatenario (ARNbc) tal como ARNi.

45 En una realización alternativa, el ácido nucleico antisentido del polipéptido sHASEGP se produce intracelularmente por transcripción a partir de una secuencia exógena.

50 Por ejemplo, puede introducirse un vector *in vivo* de modo que se capte por una célula, transcribiéndose dentro de dicha célula el vector o una porción del mismo, produciendo un ácido nucleico antisentido (ARN). Dicho vector contendría una secuencia que codifica el ácido nucleico antisentido de polipéptido sHASEGP. Dicho vector puede permanecer episomal o integrarse cromosómicamente siempre que pueda transcribirse para producir el ARN antisentido deseado. Dichos vectores pueden construirse mediante métodos de tecnología de ADN recombinante convencionales en la técnica. Los vectores pueden ser plasmídicos, virales u otros conocidos en la técnica usados para la replicación y expresión en células de mamífero. La expresión de la secuencia que codifica el ARN antisentido de polipéptido sHASEGP puede ser cualquier promotor conocido que se sepa en la técnica que actúa en células de mamíferos, incluyendo seres humanos. Dichos promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Dichos promotores incluyen, pero sin limitación: la región promotora temprana de SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290: 304-310 (1981), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, Cell 22: 787-797 (1980)), el promotor de timidina quinasa de herpes (Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster *et al.*, Nature 296: 39-42 (1982)), etc.

60 Los ácidos nucleicos antisentido incluyen complementariedad de secuencia con al menos una porción de un transcrito de ARN de un gen de polipéptido sHASEGP, incluyendo un gen de polipéptido sHASEGP humano. No es necesaria una complementariedad absoluta. La cantidad de ácido nucleico antisentido de polipéptido sHASEGP que es eficaz en el tratamiento o la prevención de una enfermedad neoplásica depende de la naturaleza de la enfermedad y puede determinarse empíricamente mediante técnicas clínicas convencionales.

65 Cuando es posible, es deseable determinar la citotoxicidad antisentido en células *in vitro*, y después en sistemas de modelos animales útiles antes de ensayarlo y usarlo en seres humanos.

2. ARN de interferencia. Puede emplearse ARN de interferencia (ARNi) (véase, por ejemplo, Chuang *et al.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 4985) para inhibir la expresión de un gen que codifica una sHASEGP. Pueden usarse fragmentos de ARN interferente (ARNi), particularmente ARNi bicatenario (bc) para generar pérdida de función de sHASEGP. Se conocen métodos en relación con el uso de ARNi para silenciar genes en organismos incluyendo mamíferos, *C. elegans*, *Drosophila* y plantas y seres humanos (véase, por ejemplo, Fire *et al.* (1998) Nature 391: 806-811; Fire (1999) Trends Genet. 15: 358-363; Sharp (2001) Genes Dev. 15: 485-490; Hammond *et al.* (2001) Nature Rev. Genet. 2: 110-119; Tuschl (2001) Chem. Biochem. 2: 239-245; Hamilton *et al.* (1999) Science 286: 950-952; Hammond *et al.* (2000) Nature 404: 293-296; Zamore *et al.* (2000) Cell 101: 25-33; Bernstein *et al.* (2001) Nature 409: 363-366; Elbashir *et al.* (2001) Genes Dev. 15: 188-200; Elbashir *et al.* (2001) Nature 411: 494-498; Solicitud Internacional PCT N° WO 01/29058; Solicitud Internacional PCT N° WO 99/32619).

Se introducen construcciones que expresan ARN bicatenario (ARNbc) en un hospedador, tal como un animal o planta usando un vector que puede replicarse que permanece episomal o se integra en el genoma. Por selección de las secuencias apropiadas, la expresión de ARNbc puede interferir con la acumulación de ARNm endógeno que codifica una sHASEGP. También puede usarse ARNi para inhibir la expresión *in vitro*.

Las regiones incluyen al menos aproximadamente 21 (ó 21) nucleótidos que son selectivos (es decir, únicos) para sHASEGP que se usan para preparar el ARNi. Fragmentos más pequeños de aproximadamente 21 nucleótidos pueden transformarse directamente (es decir, *in vitro* o *in vivo*) en células; generalmente se introducen moléculas de ARNbc ARNi de mayor tamaño usando vectores que las codifican. Las moléculas de ARNbc son de al menos 21 pb de longitud o más largas, tal como de 50, 100, 150, 200 y más largas. Los especialistas en la técnicas conocen métodos, reactivos y protocolos para introducir moléculas de ácido nucleico en células *in vitro* e *in vivo*.

3. Terapia Génica. En una realización ejemplar, los ácidos nucleicos que incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido sHASEGP o dominios funcionales o derivados del mismo, se administran para promover la función del polipéptido sHASEGP por medio de terapia génica. La terapia génica se refiere a una terapia realizada mediante la administración de un ácido nucleico a un sujeto. En esta realización, el ácido nucleico produce su proteína codificada que media un efecto terapéutico promoviendo la función del polipéptido sHASEGP. Puede usarse cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica (véase, Goldspiel *et al.*, Clinical Pharmacy 12: 488-505 (1993); Wu y Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, An. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596 (1993); Mulligan, Science 260: 926-932 (1993); y Morgan y Anderson, An. Rev. Biochem. 62: 191-217(1993); TIBTECH 115: 155-215 (1993). Por ejemplo, una composición terapéutica para terapia génica incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido sHASEGP que es parte de un vector de expresión que expresa un polipéptido sHASEGP o dominio, fragmento o proteína quimérica del mismo en un hospedador adecuado. En particular, dicho ácido nucleico tiene un promotor unido operativamente a la región codificante del polipéptido sHASEGP, siendo el promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejido. En otra realización particular, se usa una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias codificantes de polipéptido sHASEGP y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando de este modo la expresión intracromosómica del ácido nucleico de una proteína sHASEGP (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989); Zijlstra *et al.*, Nature 342: 435-438 (1989)).

El suministro del ácido nucleico a un paciente puede ser directo, en cuyo caso el paciente se expone directamente al ácido nucleico o al vector que lleva el ácido nucleico, o indirecto, en cuyo caso las células se transforman primero con el ácido nucleico *in vitro*, después se trasplantan en el paciente. Estas dos estrategias se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

En una realización específica, el ácido nucleico se administra directamente *in vivo*, donde se expresa para producir el producto codificado. Esto puede conseguirse por cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo, por infección, usando vector retroviral defectuoso o atenuado u otro vector viral (véase, la Patente de Estados Unidos N° 4.980.286) o mediante inyección directa de ADN desnudo o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, pistola génica; Biolística, DuPont) o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas o por administración del mismo unido con un péptido que se sabe que se introduce en el núcleo, por administración del mismo unido con un ligando sometido a endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem, 262: 4429-4432 (1987)) (que puede usarse para dirigirse a tipos celulares que expresan específicamente los receptores), etc. En otra realización, puede formarse un complejo de ácido nucleico-ligando en el que el ligando es un péptido viral fusogénico para romper endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. En otra realización más, el ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para captación específica de célula y expresión dirigiéndose a un receptor específico (véase, por ejemplo, Publicaciones PCT WO 92/06180 con fecha del 16 de abril de 1992 (Wu *et al.*); WO 92/22635 con fecha del 23 de diciembre de 1992 (Wilson *et al.*); WO 92/20316 con fecha del 26 de noviembre de 1992 (Findeis *et al.*); WO 93/14188 con fecha del 22 de julio de 1993 (Clarke *et al.*), WO 93/20221 con fecha del 14 de octubre de 1993 (Young)). Como alternativa, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse en el interior de un ADN de célula hospedadora para la expresión mediante recombinación homóloga (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989); Zijlstra *et al.*, Nature 342: 435-438 (1989)).

ES 2 335 005 T3

En una realización específica, se usa un vector viral que contiene el ácido nucleico de polipéptido sHASEGP. Por ejemplo, puede usarse un vector retroviral (véase Miller *et al.*, Meth. Enzymol. 217: 581-599 (1993)). Estos vectores retrovirales se han modificado para delecionar las secuencias retrovirales que no son necesarias para el empaquetamiento del genoma viral y la integración en el ADN de la célula hospedadora. El ácido nucleico de polipéptido sHASEGP que se usará en terapia génica se clona en el vector, que facilita el suministro del gen al paciente. Pueden encontrarse más detalles acerca de vectores retrovirales en Boesen *et al.*, Biotherapy 6: 291-302 (1994), que describe el uso de un vector retroviral para suministrar el gen *mdr1* a células madre hematopoyéticas para hacer a las células madre más resistentes a quimioterapia.

Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes *et al.*, J. Clin. Invest. 93: 644-651 (1994); Kiem *et al.*, Blood 83: 1467-1473 (1994); Salmons y Gunzberg, Human Gene Therapy 4: 129-141 (1993); y Grossman y Wilson, Curr. Opin. En Genetics And Devel. 3:110-114(1993).

Los adenovirus son otros vectores virales que pueden usarse en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para suministrar genes al epitelio respiratorio. Los adenovirus infectan de forma natural el epitelio respiratorio, donde causan una enfermedad leve. Otras dianas para sistemas de suministro basados en adenovirus son hígado, sistema nervioso central, células endoteliales y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no están en división. Kozarsky y Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3: 499-503 (1993) presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout *et al.*, Human Gene Therapy 5:3-10 (1994) demuestran el uso de vectores de adenovirus para transferir genes al epitelio respiratorio de monos rhesus. Otros casos del uso de adenovirus en terapia génica pueden encontrarse en Rosenfeld *et al.*, Science 252: 431-434 (1991); Rosenfeld *et al.*, Cell 68: 143-155 (1992); y Mastrangeli *et al.*, J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993).

También se han propuesto virus adenoasociados (AAV) para el uso en terapia génica (Walsh *et al.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300 (1993)).

Otra estrategia para terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo tisular por métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección viral. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador de selección a las células. Después, las células se colocan en selección para aislar las células que hayan captado y estén expresando el gen transferido. Después, esas células se suministran a un paciente.

En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen en la técnica numerosos procedimientos para la introducción de genes extraños en células (véase, por ejemplo, Loeffler y Behr, Meth. Enzymol. 217: 599-618 (1993); Cohen *et al.*, Meth. Enzymol. 217: 618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29: 69-92 (1985)) y pueden usarse con tal de que no se alteren las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras. La técnica debería proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico pueda expresarse por la célula y generalmente pueda heredarse y expresarse por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes pueden suministrarse a un paciente mediante diversos métodos conocidos en la técnica. En una realización, se inyectan células epiteliales, por ejemplo, por vía subcutánea. En otra realización, pueden aplicarse células cutáneas recombinantes como un injerto de piel sobre el paciente. Pueden administrarse por vía intravenosa células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre o progenitores hematopoyéticos). La cantidad de células prevista para el uso depende del efecto deseado, del estado del paciente, etc. y puede determinarse por un especialista en la técnica.

Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico para los fines de terapia génica incluyen cualquier tipo celular deseado disponible e incluyen, pero sin limitación, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitores hematopoyéticos, por ejemplo, tales como células madre obtenidas de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal y otras fuentes de las mismas.

Por ejemplo, una célula usada para terapia génica es autóloga para el paciente. En una realización en la que se usan células recombinantes en terapia génica, se introduce un ácido nucleico de polipéptido sHASEGP en las células de modo que pueda expresarse por las células o su progenie y, después, las células recombinantes se administran *in vivo* para un efecto terapéutico. En una realización específica, se usan células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse o mantenerse *in vitro* puede usarse potencialmente de acuerdo con esta realización.

Dichas células madre incluyen, pero sin limitación, células madre hematopoyéticas (HSC), células madre de tejidos epiteliales tales como la piel y el revestimiento del intestino, células musculares cardíacas embrionarias, células madre hepáticas (Publicación PCT WO 94/08598, con fecha del 28 de abril de 1994) y células madre neurales (Stemple y Anderson, Cell 71: 973-985 (1992)).

ES 2 335 005 T3

Pueden obtenerse células madre epiteliales (ESC) o queratinocitos a partir de tejidos tales como la piel y el revestimiento del intestino por procedimientos conocidos (Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21 A: 229 (1980)). En un tejido epitelial estratificado, tal como la piel, se produce renovación por mitosis de células madre dentro de la capa germinal, la capa más próxima a la lámina basal. Las células madre dentro del revestimiento del intestino proporcionan una tasa de renovación rápida de este tejido. Las ESC o queratinocitos obtenidos de la piel o del revestimiento del intestino de un paciente o donante pueden cultivarse en un cultivo tisular (Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21 A: 229 (1980); Pittelkow y Scott, Cano. Clinic Proc. 61: 771 (1986)). Si las ESC se proporcionan por un donante, también puede usarse un método de supresión de la reactividad del hospedador frente a un injerto (por ejemplo, irradiación, administración de fármacos o anticuerpos para promover una inmunosupresión moderada).

Con respecto a células madre hematopoyéticas (HSC), puede usarse en esta realización cualquier técnica que proporcione el aislamiento, propagación y mantenimiento *in vitro* de HSC. Las técnicas por las que puede conseguirse incluyen (a) el aislamiento y el establecimiento de cultivos de HSC a partir de células de médula ósea aisladas del futuro hospedador o de un donante o (b) el uso de cultivos de HSC a largo plazo previamente establecidos, que pueden ser alergénicos o xenogénicos.

Generalmente se usan HSC no autólogas con un método de supresión de reacciones inmunes frente al trasplante del futuro hospedador/paciente. En una realización particular, pueden obtenerse células de médula ósea humana a partir de la cresta ilíaca posterior por aspiración con aguja (véase, por ejemplo, Kodo *et al.*, J. Clin. Invest. 73: 1377-1384 (1984)). Por ejemplo, las HSC pueden prepararse en forma altamente enriquecida o sustancialmente pura. Este enriquecimiento puede conseguirse antes, durante o después del cultivo a largo plazo y puede realizarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los cultivos a largo plazo de células de médula ósea pueden establecerse y mantenerse usando, por ejemplo, técnicas de cultivo celular de Dexter modificadas (Dexter *et al.*, J. Cell Physiol. 91: 335 (1977)) o técnicas de cultivo de Witlock-Witte (Witlock y Witte, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3608-3612 (1982)).

En una realización específica, el ácido nucleico que se introducirá para los fines de la terapia génica incluye un promotor inducible unido operativamente a la región codificante, de modo que la expresión del ácido nucleico puede controlarse por control de la presencia o ausencia del inductor de la transcripción apropiado.

3. Profármacos- Se proporciona un método para tratar tumores. El método se realiza por administración de un profármaco que se escinde en un sitio específico mediante una HASEGP para liberar un fármaco activo o un precursor que puede convertirse en fármaco activo *in vivo*. Tras el contacto con una célula que expresa actividad de sHASEGP, el profármaco se convierte en un fármaco activo. El profármaco puede ser un conjugado que contiene un agente activo, tal como un fármaco antitumoral, tal como un agente citotóxico u otro agente terapéutico (TA), unido a un sustrato para la sHASEGP diana, de modo que el fármaco o agente sea inactivo o incapaz de entrar en una célula en el conjugado, pero se active tras la escisión. El profármaco, por ejemplo, puede contener una molécula de sulfato de condroitina, típicamente una relativamente corta de menos de aproximadamente 20 unidades de disacárido, que se escinda catalíticamente por la sHASEGP diana. Los agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes, agentes antiproliferativos y agentes de unión a tubulina. Otros incluyen fármacos de la vinca, mitomicinas, bleomicinas y taxanos.

Composiciones farmacéuticas y modos de administración

1. Componentes de las composiciones

Se proporciona en este documento composiciones farmacéuticas que contienen una sHASEGP activa. También se proporcionan combinaciones de compuestos que modulan la actividad de un polipéptido sHASEGP y otro tratamiento o compuesto para el tratamiento de un trastorno de hialuronidasa, tal como un compuesto de anticuerpo.

El polipéptido sHASEGP y un segundo agente pueden envasarse como composiciones separadas para su administración juntas o de forma secuencial o intermitente. Como alternativa pueden proporcionarse como una sola composición para su administración o como dos composiciones para su administración como una sola composición. Las combinaciones pueden envasarse como kits.

2. Formulaciones y Vía de Administración

Los polipéptidos sHASEGP y el dominio hialuronidasa humano soluble de los mismos proporcionados en este documento pueden formularse como composiciones farmacéuticas, típicamente para administración de una sola dosificación. Las concentraciones de los polipéptidos en las formulaciones son eficaces para el suministro de una cantidad, tras la administración, que es eficaz para el tratamiento deseado. Típicamente, las composiciones se formulan para la administración de una sola dosificación. Para formular una composición, la fracción en peso de un polipéptido sHASEGP, dominios hialuronidasa humanos solubles del mismo o una mezcla de los mismos se disuelve, suspende y expresa o mezcla de otro modo en un vehículo seleccionado a una concentración eficaz de modo que la afección tratada se alivia o mejora.

ES 2 335 005 T3

Los excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de la sHASEGP o dominios hialuronidasa humanos solubles de la misma proporcionados en este documento incluyen cualquier vehículo de este tipo conocido por los especialistas en la técnica que sea adecuado para el modo de administración particular.

Además, los polipéptidos pueden formularse como el único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o pueden combinarse con otros ingredientes activos. Las suspensiones liposomales, incluyendo liposomas dirigidos a tejidos, también pueden ser adecuadas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse formulaciones de liposomas como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.522.811.

La sHASEGP activa o dominio hialuronidasa humano soluble de la misma se incluye en el vehículo farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios indeseables en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente ensayando los polipéptidos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos tales como por uso de los ensayos proporcionados en este documento o véase, por ejemplo, Taliani *et al.* (1996) Anal. Biochem. 240: 60-67, Filocamo *et al.* (1997) J. Virology 71:1417-1427, Sudo *et al.* (1996) Antiviral Res. 32: 9-18, Buffard *et al.* (1995) Virology 209: 52-59, Bianchi *et al.* (1996) Anal. Biochem. 237: 239-244, Hamatake *et al.* (1996) Intervirology 39: 249-258, Steinkühler *et al.* (1998) Biochem. 37: 8899-8905, D'Souza *et al.* (1995) J. Gen. Virol. 76: 1729-1736, Takeshita *et al.* (1997) Anal. Biochem. 247: 242-246; véase también, por ejemplo Shimizu *et al.* (1994) J. Virol. 68: 8406-8408; Mizutani *et al.* (1996) J. Virol. 70: 7219-7223, Mizutani *et al.* (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 227: 822-826, Lu *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 93: 1412-1417, Hahm *et al.* (1996) Virology 226: 318-326, Ito *et al.* (1996) J. Gen. Virol. 77: 1043-1054, Mizutani *et al.* (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 212: 906-911, Cho *et al.* (1997) J. Viral. Meth. 65: 201-207, y después extrapolarse a partir de los mismos para dosificaciones para seres humanos.

Típicamente, se contempla una dosificación terapéuticamente eficaz. Las cantidades administradas pueden ser del orden de 0,001 a 1 mg/ml, incluyendo de aproximadamente 0,005-0,05 mg/ml y aproximadamente 0,01 mg/ml de volumen de sangre. Se preparan formas farmacéuticas unitarias de dosificación para proporcionar de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg, incluyendo de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 mg, e incluyendo de aproximadamente 25-75 mg del ingrediente activo esencial o una combinación de ingredientes esenciales por forma unitaria de dosificación. La dosificación exacta puede determinarse empíricamente.

En algunos casos, es preferible una alta dosis unitaria de sHASEGP humana. Por ejemplo, con la administración intravenosa de sHASEGP son preferibles concentraciones de sHASEGP de 500-100.000 unidades por ml. Las formulaciones liofilizadas de sHASEGP también son ideales para almacenamiento de dosis unitarias grandes de sHASEGP. Se contemplan viales liofilizados de 200.000 unidades de sHASEGP para suministro intravenoso.

También se contemplan dosis de concentración elevada para el suministro de pequeños volúmenes de sHASEGP. La administración de 10-100 μ l de sHASEGP 5000 unidades/ml se contempla para inyección en la cámara anterior para disolver sustancias viscoelásticas previamente administradas durante cirugías de cataratas y de implantación de lente intraocular fáquica. También se contemplan inyecciones de volúmenes pequeños de dosis de 50-200 U/ml para procedimientos intravítreos tales como el tratamiento de hemorragia vítrea o desprendimiento vitreorretinal en la retinopatía diabética.

El ingrediente activo puede administrarse de una vez o puede dividirse en varias dosis más pequeñas para administrarse a intervalos de tiempo. Se entiende que la dosificación exacta y la duración de tratamiento están en función de la enfermedad que se trate y pueden determinarse empíricamente usando protocolos de ensayo conocidos o por extrapolación de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Debe señalarse que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección que se alivia. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deberían ajustarse con el tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y el juicio profesional de la persona que administre o supervise la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración expuestos en este documento son ejemplares solamente y no pretenden limitar alcance o uso de las composiciones reivindicadas y combinaciones que las contienen.

Los derivados farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos, sales, ésteres, hidratos, solvatos y formas de fármaco. El derivado se selecciona típicamente de modo que sus propiedades farmacocinéticas sean superiores a la sHASEGP activa a pH neutro correspondiente o dominio hialuronidasa humano soluble de la misma.

Por lo tanto, las concentraciones o cantidades eficaces de uno o más de los polipéptidos de este documento o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se mezclan con un vehículo o excipiente farmacéutico adecuado para su administración sistémica, tópica o local para formar composiciones farmacéuticas. Los polipéptidos sHASEGP o dominios hialuronidasa humanos soluble de los mismos se incluyen en una cantidad eficaz para mejorar o tratar el trastorno para el que se contempla tratamiento. La concentración de polipéptido activo en la composición depende de las velocidades de absorción, inactivación, excreción del polipéptido activo, del programa de dosificación, de la cantidad administrada, de la formulación particular, así como de otros factores conocidos por los especialistas en la técnica.

ES 2 335 005 T3

Los agentes terapéuticos para el uso en los métodos pueden administrarse por cualquier vía conocida por los especialistas en la técnica, tal como, pero sin limitación, por vía tópica, intraarticular, intracisternal, intraocular, intraventricular, intratecal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, intratraqueal, así como por cualquier combinación de dos cualesquiera o más de las mismas. Pueden preverse también formulaciones pulmonares de polvo seco.

La vía de administración más adecuada variará dependiendo del uso propuesto, tal como, por ejemplo, uso como agente de suministro para facilitar el suministro subcutáneo de líquidos, usos para reducir la presión intraocular en los ojos de pacientes con glaucoma que reciben compuestos viscoelásticos o uso como un “agente de propagación” para aumentar la actividad de quimioterápicos y la localización de interés, tal como un órgano interno particular, un crecimiento tumoral, una cavidad intraocular y la epidermis. Los modos de administración incluyen, pero sin limitación, la vía tópica, local, intraarticular, intracisternal, intraocular, intraventricular, intratecal, intravenosa, intramuscular, intratraqueal, intraperitoneal, intradérmica y por una combinación de dos cualesquiera o más de las mismas. Por ejemplo, para el tratamiento de diversos cánceres, tales como carcinoma de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria y cáncer gastrointestinal, la administración local, incluyendo administración en el sitio del crecimiento tumoral (por ejemplo, por vía intratecal, intraventricular o intracisternal) proporciona la ventaja de que el agente terapéutico puede administrarse en una alta concentración sin riesgo de las complicaciones que pueden acompañar a la administración sistémica de un agente terapéutico.

Los vehículos o excipientes farmacéuticos y cosméticos adecuados para la administración de los polipéptidos sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de los mismos proporcionados en este documento incluyen cualquiera de dichos vehículos conocidos por los especialistas en la técnica que sea adecuado para el modo de administración particular. Además, los polipéptidos pueden formularse como el único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o pueden combinarse con otros ingredientes activos que no alteren la acción deseada, o con materiales que complementen la acción deseada conocidos por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos sHASEGP proporcionados en este documento pueden usarse como un agente de suministro o “propagación” en combinación con un segundo compuesto activo, tal como un agente terapéuticamente eficaz, incluyendo, pero sin limitación, un fármaco o un profármaco, para facilitar el suministro o para aumentar la actividad del segundo ingrediente activo. En una realización particular, un polipéptido sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble del mismo puede coformularse con un agente anestésico, tal como Lignocaína, Bupivacaína o una mezcla de los dos y, opcionalmente, un agente hormonal, tal como epinefrina para disminuir o interrumpir la captación de sangre durante la cirugía oftálmica. Un polipéptido sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble del mismo también puede coformularse con diversos quimioterápicos, tales como una toxina o un factor de necrosis tumoral, para aumentar la actividad del quimioterápico y/o la accesibilidad de los tumores diana al quimioterápico. El compuesto activo se incluye en el vehículo en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos tóxicos graves en el individuo tratado. La concentración eficaz puede determinarse empíricamente ensayando los compuestos usando sistemas *in vitro* e *in vivo* incluyendo los modelos animales descritos en este documento.

Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir cualquiera de los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceite no volátil, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol y otro disolvente sintético; agentes antimicrobianos, tales como alcohol bencílico y metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico y bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos y fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad, incluyendo, pero sin limitación, cloruro sódico, cloruro cálcico, cloruro de magnesio, dextrosa, glicerol o ácido bórico. Las preparaciones parenterales pueden incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales monodosis o multidosis hechos de vidrio, plástico u otro material adecuado.

Los polipéptidos sHASEGP o dominios hialuronidasa humanos solubles de los mismos pueden suspenderse en forma micronizada u otra forma adecuada o pueden derivatizarse para producir un producto activo más soluble o para producir un profármaco. La forma de la mezcla resultante depende de varios factores, incluyendo el modo deseado de administración y la solubilidad del polipéptido en el excipiente o vehículo seleccionado. La concentración eficaz es suficiente para mejorar la afección diana y puede determinarse empíricamente usando métodos conocidos por los especialistas en la técnica. Para formular una composición, la fracción en peso de polipéptido se disuelve, suspende, dispersa o mezcla de otro modo en un vehículo seleccionado a una concentración eficaz de modo que la afección diana se alivie o mejore.

En los casos en los que los polipéptidos sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de los mismos presenten una solubilidad insuficiente, pueden usarse métodos para solubilizar polipéptidos. Dichos métodos se conocen por los especialistas en esta técnica e incluyen, pero sin limitación, el uso de codisolventes, tales como dimetilsulfóxido (DMSO), el uso de tensioactivos, tales como TWEEN® y Pluronic® F68; o la disolución en bicarbonato sódico acuoso. Los derivados de los polipéptidos, tales como profármacos de los polipéptidos también pueden usarse en la formulación de composiciones farmacéuticas eficaces. Para indicaciones oftálmicas, las composiciones se formulan en un vehículo oftálmicamente aceptable. Para los usos oftálmicos de este documento, se contempla la administración local, por administración tópica o mediante inyección. También son deseables formulaciones de liberación temporalizada. Típicamente, las composiciones se formulan para la administración de una sola dosificación, de modo que una sola dosis administre una cantidad eficaz.

Tras la mezcla o adición del polipéptido con el excipiente, la mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsión u otra composición y puede formularse como una mezcla acuosa, cremas, geles, pomadas, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, vendas o cualquier otra formulación adecuada para administración sistémica, tópica o local.

La forma de la mezcla resultante depende de varios factores, incluyendo el modo deseado de administración y la solubilidad del compuesto en el vehículo o excipiente seleccionado. Si es necesario, se preparan sales farmacéuticamente aceptables u otros derivados de los compuestos. Para administración interna local, tal como administración intramuscular, parenteral, o intraarticular, los compuestos se formulan preferiblemente como una solución o suspensión en un medio de base acuosa tal como solución salina tamponada isotónicamente, o se combinan con un soporte biocompatible o bioadhesivo destinado para administración interna.

El polipéptido sHASEGP o dominio hialuronidasa humano soluble se incluye en el vehículo farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios no deseables en el paciente tratado. Se entiende que el número y grado de efectos secundarios depende de la afección para la que se administran los compuestos. Por ejemplo, se toleran ciertos efectos secundarios tóxicos e indeseables cuando se tratan enfermedades potencialmente mortales que no se tolerarían cuando se tratan trastornos de consecuencias menos graves. Las cantidades eficaces para uso terapéutico dependerán, por supuesto, de la gravedad de la enfermedad y del peso y estado general del sujeto así como de la vía de administración. La administración local del agente terapéutico requerirá típicamente una dosificación menor que cualquier modo de administración sistémica, aunque la concentración local del agente terapéutico puede ser en algunos casos superior después de la administración local de lo que puede conseguirse con seguridad tras una administración sistémica.

Puesto que sujetos individuales pueden presentar una amplia variación en la gravedad de los síntomas y cada agente terapéutico tiene sus características terapéuticas únicas, depende del médico determinar la respuesta de un sujeto al tratamiento y variar las dosificaciones por consiguiente. Las dosificaciones usadas *in vitro* pueden proporcionar una información útil sobre las cantidades útiles para la administración *in situ* de la composición farmacéutica y pueden usarse en algunos casos modelos animales para determinar dosificaciones eficaces para el tratamiento de trastornos particulares. En general, sin embargo, para la administración local, se contempla que una cantidad eficaz del agente terapéutico será una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,1 picogramos (pg) hasta aproximadamente 1 ng por kg de peso corporal. Los especialistas en la técnica conocen diversas consideraciones para llegar a una cantidad eficaz y están descritas (véase, por ejemplo, Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press, 1990; Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990; y Mantyh *et al.*, (Science, 278: 275-79, 1997) que implican la inyección intratecal de una toxina-ligando específica neuronal, incorporándose cada una de las mismas en este documento como referencia en su totalidad).

Las formulaciones de los polipéptidos sHASEGP o dominios hialuronidasa humanos solubles de los mismos para usar en este documento incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, tópica, por inhalación, bucal (por ejemplo, sublingual), parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intradérmica o intravenosa), transdérmica o cualquier vía. La vía más adecuada en cualquier caso dado depende de la naturaleza y gravedad de la afección que se trate y de la naturaleza del compuesto activo particular que se esté usando. Las formulaciones se proporcionan para administración en seres humanos y animales en formas de dosificación unitarias, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles y soluciones o suspensiones orales y emulsiones de aceite en agua que contienen cantidades adecuadas de los polipéptidos y/u otros agentes o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los polipéptidos farmacéuticos terapéuticamente activos y/u otros agentes y derivados de los mismos se formulan típicamente y se administran en formas de dosificación unitarias o formas de dosificación múltiple. Una forma unidosis, como se usa en este documento, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas para sujetos humanos y animales y envasadas individualmente como se conoce en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan para la administración en seres humanos y animales en formas de dosificación unitarias, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles y soluciones o suspensiones orales, y emulsiones de aceite en agua que contienen cantidades adecuadas del polipéptido sHASEGP o dominio hialuronidasa humano soluble del mismo y, opcionalmente, otro agente o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos farmacéuticos terapéuticamente activos y derivados de los mismos se formulan típicamente y se administran en formas de dosificación unitarias o formas de dosificación múltiple. Una forma de dosis unitaria, como se usa en este documento, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas para sujetos humanos y animales y envasadas individualmente como se conoce en la técnica. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada del compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico necesario. Los ejemplos de formas de dosis unitarias incluyen, pero sin limitación, ampollas, jeringas y comprimidos o cápsulas envasados individualmente. Por ejemplo, una formulación de volumen pequeño que contiene una solución estabilizada con de 1 a 5000 unidades de sHASEGP en un volumen pequeño, tal como de 5 a 50 μ l, puede preenvasarse en una jeringa para el uso, tal como después de la inyección de compuesto viscoelástico. Pueden administrarse formas unidosis en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma multidosis es una pluralidad de formas de dosificación unitarias idénticas envasadas en un solo recipiente que se administrará en forma unidosis separada. Los ejemplos de formas multidosis incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas o frascos de pintas o galones. Por lo tanto, la forma multidosis es un múltiplo de unidosis que no están separadas en el envasado.

La composición puede contener junto con el ingrediente activo, tal como un polipéptido sHASEGP: un diluyente, tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales, tales como goma arábiga, gelatina, glu-
 5 de este tipo conocidos por los especialistas en la técnica. Las composiciones líquidas farmacéuticamente administra-
 bles pueden prepararse, por ejemplo, por disolución, dispersión o mezcla de otro modo de un compuesto activo como
 se ha definido anteriormente y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un vehículo, tal como, por ejemplo, agua,
 solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol y similares para formar de este modo una solución o suspen-
 10 sión. Si se desea, la composición farmacéutica que se administrará también puede contener cantidades minoritarias
 de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes o agentes solubilizantes,
 agentes tamponantes del pH y similares, por ejemplo, acetato, citrato sódico, derivados de ciclodextrina, monolau-
 rato de sorbitán, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina y otros agentes de este tipo. Se conocen
 métodos para preparar dichas formas de dosificación o serán evidentes para los especialistas en esta técnica (véase,
 15 por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15ª Edición, 1975). La
 composición o formulación que se administrará contiene una cantidad del compuesto activo en una cantidad suficiente
 para aliviar los síntomas del sujeto tratado. Por ejemplo, una formulación estabilizada convencional de sHASEGP o un
 dominio hialuronidasa humano soluble del mismo como se proporciona en este documento incluye 150 unidades/ml
 de la glicoproteína soluble formulada en EDTA, NaCl y CaCl₂. Adicionalmente, puede estar presente en la formula-
 20 ción un agente antibacteriano o antifúngico incluyendo, pero sin limitación tiomersal. Otra formulación proporcionada
 en este documento es una solución estabilizada o forma liofilizada de sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano
 soluble del mismo en EDTA, NaCl y CaCl₂, que contiene una cantidad activa eficaz de la glicoproteína soluble, tal
 como 150 unidades/ml, con la adición de lactosa, tal como 13 mg/ml. También se proporciona en este documento
 una formulación que contiene una solución estabilizada o forma liofilizada de sHASEGP o un dominio hialuronidasa
 humano soluble del mismo en EDTA, NaCl y CaCl₂ que contiene una cantidad activa eficaz de la glicoproteína solu-
 25 ble, tal como 150 unidades/ml, con la adición de lactosa, tal como 13 mg/ml, y Albúmina, Pluronic® F68, TWEEN®
 y/u otro detergente. Otra formulación proporcionada en este documento, liofilizada o como una solución estabilizada
 contiene una cantidad eficaz de sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble del mismo, tal como de 1 a
 300 unidades/ml, en EDTA, NaCl y CaCl₂.

30 Pueden prepararse formas de dosificación o composiciones que contienen ingrediente activo en el intervalo del
 0,005% al 100%, componiéndose el resto de vehículo no tóxico. Para administración oral, las composiciones farma-
 céuticas pueden adoptar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales
 con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de unión, (por ejemplo, almidón de maíz pregela-
 35 tinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o
 hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejem-
 plo, almidón de patata o almidón glicolato sódico); o agentes humectantes (por ejemplo lauril sulfato sódico). Los
 comprimidos pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica.

Las sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de las mismas o derivados farmacéuticamente acepta-
 40 bles pueden prepararse con vehículos que protejan la glicoproteína soluble frente a la eliminación rápida del cuerpo,
 tal como formulaciones de liberación temporalizada o recubrimientos. Las composiciones pueden incluir otros agentes
 farmacéuticamente eficaces conocidos en la técnica general por ser valiosos en el tratamiento de una o más de las en-
 fermedades o afecciones médicas, incluyendo, pero sin limitación, un agente quimioterápico, un agente analgésico, un
 agente antiinflamatorio, un agente antimicrobiano, un agente amebicida, un agente tricomónica, un agente antipar-
 45 kinsoniano, un agente antimalárico, un agente anticonvulsivante, un agente antidepresor, un agente antiartrítico, un
 agente antifúngico, un agente antihipertensor, un agente antipirético, un agente antiparasitario, un agente antihistamí-
 nico, un agente agonista alfa-adrenérgico, un agente alfa-bloqueante, un agente anestésico, un agente broncodilatador,
 un agente biocida, un agente bactericida, un agente bacteriostático, un agente bloqueante beta-adrenérgico, un agente
 50 bloqueante de canales de calcio, un agente farmacológico cardiovascular, un agente anticonceptivo, un agente des-
 congestivante, un agente diurético, un agente depresor, un agente de diagnóstico, un agente electrolítico, un agente
 hipnótico, un agente hormonal, un agente hiperglucemiante, un agente relajante muscular, un agente de contracción
 muscular, un agente oftálmico, un agente parasimpaticomimético, un agente energizante psíquico, un agente oftálmico,
 un agente parasimpaticomimético, un agente energizante psíquico, un agente sedante, un agente simpaticomimético,
 un agente tranquilizante, un agente urinario, un agente vaginal, un agente viricida, un agente vitamínico, un agente
 55 antiinflamatorio no esteroideo, un agente inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un polipéptido, una
 proteína, un ácido nucleico, un fármaco, un profármaco, una molécula orgánica y un inductor del sueño para obtener
 combinaciones de propiedades deseadas. Debe entenderse que dicha terapia de combinación constituye un aspecto
 adicional de las composiciones y métodos de tratamiento proporcionados en este documento.

60

1. Composiciones para administración oral

Las formas de dosificación farmacéutica orales son sólidas, en gel o líquidas. Las formas de dosificación sólidas son
 comprimidos, cápsulas, gránulos y polvos a granel. Los tipos de comprimidos orales incluyen grageas y comprimidos
 65 masticables preparados por compresión que pueden presentar un recubrimiento entérico, recubrimiento con azúcar o
 recubrimiento con película. Las cápsulas pueden ser cápsulas de gelatina duras o blandas, mientras que los gránulos
 y polvos pueden proporcionarse en forma no efervescente o efervescente con la combinación de otros ingredientes
 conocidos por los especialistas en la técnica.

ES 2 335 005 T3

Las composiciones farmacéuticas que contienen una sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma pueden estar en forma líquida, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones o pueden presentarse como un producto farmacológico para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil- o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico).

En ciertas realizaciones, las formulaciones son formas de dosificación sólidas, preferiblemente cápsulas o comprimidos. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante; un diluyente; un agente disgregante; un lubricante; un emoliente; un agente edulcorante; y un agente saporífero.

Los ejemplos de aglutinantes incluyen celulosa microcristalina, goma de tragacanto, solución de glucosa, mucílago de goma arábica, solución de gelatina, sacarosa y pasta de almidón. Los lubricantes incluyen talco, almidón, estearato de magnesio o de calcio, lycopodio y ácido esteárico. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, sacarosa, almidón, caolín, sal, manitol y fosfato dicálcico. Los emolientes incluyen, pero sin limitación, dióxido de silicio coloidal. Los agentes disgregantes incluyen croscarmelosa sódica, almidón glicolato sódico, ácido algínico, almidón de maíz, almidón de patata, bentonita, metilcelulosa, agar y carboximetilcelulosa. Los agentes colorantes incluyen, por ejemplo, cualquiera de los colorantes FD y C solubles en agua certificados autorizados, mezclas de los mismos; y colorantes FD y C insolubles en agua suspendidos en hidrato de alúmina. Los agentes edulcorantes incluyen sacarosa, lactosa, manitol y agentes edulcorantes artificiales tales como sacarina, y cualquier número de saporíferos secados por pulverización. Los agentes saporíferos incluyen aromas naturales extraídos de plantas tales como frutas y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación agradable, tales como, pero sin limitación, menta y metilsalicilato. Los agentes humectantes incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y lauril éter de polioxietileno. Los recubrimientos eméticos incluyen ácidos grasos, grasas, ceras, goma laca, goma laca tratada con amoniaco y acetato ftalato de celulosa. Los recubrimientos de película incluyen hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polietilenglicol 4000 y acetato ftalato de celulosa.

Si se desea una administración oral, la sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma podrían proporcionarse en una composición que la proteja del entorno ácido del estómago. Por ejemplo, la composición puede formularse en un recubrimiento entérico que mantenga su integridad en el estómago y libere el compuesto activo en el intestino. La composición también puede formularse en combinación con un antiácido u otro ingrediente de este tipo.

Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además del material del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso. Además, las formas unitarias de dosificación pueden contener diversos otros materiales que modifiquen la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcares y otros agentes entéricos. Los compuestos también pueden administrarse como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, rociado, goma de mascar o similar. Un jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa como agente edulcorante y ciertos conservantes, tintes y colorantes y aromas.

La sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma también pueden mezclarse con otros materiales activos que no alteren la acción deseada o con materiales que complementen la acción deseada, tales como antiácidos, bloqueantes H₂ y diuréticos. El ingrediente activo es un compuesto o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo como se describe en este documento. Pueden incluirse concentraciones mayores de hasta el 98% en peso del ingrediente activo.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluidos en comprimidos son aglutinantes, lubricantes, diluyentes, agentes disgregantes, agentes colorantes, agentes saporíferos y agentes humectantes. Los comprimidos con recubrimiento entérico, debido al recubrimiento entérico, resisten a la acción del ácido estomacal y se disuelven o disgregan en el intestino neutro o alcalino. Los comprimidos recubiertos con azúcares son comprimidos preparados por compresión a los que se aplican diferentes capas de sustancias farmacéuticamente aceptables. Los comprimidos recubiertos con película son comprimidos preparados por compresión que se han recubierto con un polímero u otro recubrimiento adecuado. Los comprimidos preparados por compresión múltiple son comprimidos preparados por compresión generados mediante más de un ciclo de compresión utilizando las sustancias farmacéuticamente aceptables mencionadas anteriormente. Los agentes colorantes también pueden usarse en las formas de dosificación anteriores. Los agentes saporíferos y edulcorantes se usan en comprimidos preparados por compresión, comprimidos recubiertos con azúcares, preparados por compresión múltiple y masticables. Los agentes saporíferos y edulcorantes son especialmente útiles en la formación de comprimidos masticables y grageas.

Las formas de dosificación oral líquidas incluyen soluciones acuosas, emulsiones, suspensiones, soluciones y/o suspensiones reconstituídas a partir de gránulos no efervescentes y preparaciones efervescentes reconstituídas a partir de gránulos efervescentes. Las soluciones acuosas incluyen, por ejemplo, elixires y jarabes. Las emulsiones son de aceite en agua o de agua en aceite.

Los elixires son preparaciones hidroalcohólicas transparentes, edulcoradas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en elixires incluyen disolventes. Los jarabes son soluciones acuosas concentradas de un azúcar, por

ES 2 335 005 T3

ejemplo, sacarosa, y pueden contener un conservante. Una emulsión es un sistema de dos fases en el que un líquido se dispersa en forma de pequeños glóbulos por todo otro líquido. Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en emulsiones son líquidos no acuosos, agentes emulsionantes y conservantes. Las suspensiones usan agentes de suspensión farmacéuticamente aceptables y conservantes. Las sustancias farmacéuticamente aceptables usadas en gránulos no efervescentes que se reconstituirán en una forma de dosificación oral líquida incluyen diluyentes, edulcorantes y agentes humectantes. Las sustancias farmacéuticamente aceptables usadas en gránulos efervescentes que se reconstituirán en una forma de dosificación oral líquida incluyen ácidos orgánicos y una fuente de dióxido de carbono. Se usan agentes colorantes y saporíferos en todas las formas de dosificación anteriores.

Los disolventes incluyen glicerina, sorbitol, alcohol etílico y jarabe. Los ejemplos de conservantes incluyen glicerina, metilo y propilparabeno, ácido benzoico, benzoato sódico y alcohol. Los ejemplos de líquidos no acuosos utilizados en emulsiones incluyen aceite mineral y aceite de algodón. Los ejemplos de agentes emulsionantes incluyen gelatina, goma arábiga, tragacanto, bentonita y tensioactivos tales como monooleato de polioxietilensorbitán. Los agentes de suspensión incluyen carboximetilcelulosa sódica, pectina, tragacanto, Veegum y goma arábiga. Los diluyentes incluyen lactosa y sacarosa. Los agentes edulcorantes incluyen sacarosa, jarabes, glicerina y agentes edulcorantes artificiales tales como sacarina. Los agentes humectantes incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y lauril éter de polioxietileno. Los aditivos orgánicos incluyen ácido cítrico y tartárico. Las fuentes de dióxido de carbono incluyen bicarbonato sódico y carbonato sódico. Los agentes colorantes incluyen cualquiera de los colorantes FD y C solubles en agua certificados autorizados y mezclas de los mismos. Los agentes saporíferos incluyen aromas naturales extraídos de plantas tales como frutas y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación saporífera agradable.

Para una forma de dosificación sólida, la solución o suspensión en, por ejemplo, carbonato de propileno, aceites vegetales o triglicéridos se encapsula en una cápsula de gelatina. Dichas soluciones y la preparación y encapsulación de las mismas, se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 4.328.245; 4.409.239 y 4.410.545. Para una forma de dosificación líquida, la solución, por ejemplo, en un polietilenglicol puede diluirse con una cantidad suficiente de un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua, para medirse fácilmente para su administración.

Como alternativa, pueden prepararse formulaciones orales líquidas o semisólidas por disolución o dispersión de la sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma en aceites vegetales, glicoles, triglicéridos, ésteres de propilenglicol (por ejemplo, carbonato de propileno) y otros vehículos de este tipo y encapsularse estas soluciones o suspensiones en carcasas de cápsulas de gelatina duras o blandas. Otras formulaciones útiles incluyen las expuestas en las Patentes de Estados Unidos N° Re 28.819 y 4.358.603.

Las formulaciones adecuadas para administración bucal (sublingual) incluyen, por ejemplo, grageas que contienen la sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma en una base aromatizada, habitualmente sacarosa, goma arábiga o tragacanto; y pastillas que contienen el compuesto en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga.

En todas las realizaciones, las formulaciones de comprimidos y cápsulas pueden recubrirse como conocen los especialistas en la técnica para modificar o sostener la disolución del ingrediente activo. Por lo tanto, por ejemplo, pueden recubrirse con un recubrimiento entéricamente digestible convencional tal como fenilsalicitalo, ceras y acetato ftalato de celulosa.

2. Inyectables, Soluciones y Emulsiones

También se contempla en este documento la administración parenteral de la sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma, generalmente caracterizada por inyección, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en un líquido antes de la inyección o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas a administrar también pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, estabilizantes, potenciadores de la solubilidad y otros agentes de este tipo, tales como, por ejemplo, acetato sódico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. La implantación de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de modo que se mantenga un nivel constante de dosificación (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 3.710.795) también se contempla en este documento. El porcentaje de la sHASEGP o dominio hialuronidasa humano soluble de la misma contenido en dichas composiciones parenterales dependen de la naturaleza específica de las mismas, así como de la actividad del compuesto y de las necesidades del sujeto.

La administración parenteral de las composiciones incluye administraciones intravenosas, subcutánea e intramuscular. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos solubles secos estériles tales como polvos liofilizados, listos para combinarse con un disolvente o solución estéril justo antes del uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para inyección, productos insolubles secos estériles listos para combinarse con un vehículo justo antes del uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas.

ES 2 335 005 T3

Si se administran por vía intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS) y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol y propilenglicol y mezclas de los mismos.

5 Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables.

10 Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen Inyección de Cloruro Sódico, Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa Isotónica, Inyección de Agua Estéril, Inyección de Ringer Dextrosa y Lactato. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites no volátiles de origen vegetal, aceite de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Los agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas deben añadirse a preparaciones parenterales envasadas en recipientes multidosis que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres del ácido metil- y propil-p-hidroxibenzoico, tiomersal, cloruro de benzoalconio y cloruro de benzetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro sódico y dextrosa. Los tampones incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato sódico. Los anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaína. Los agentes de suspensión y dispersantes incluyen carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsiones incluyen Polisorbato 80 (TWEEN® 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los vehículos farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajuste del pH.

La concentración del compuesto farmacéuticamente activo se ajusta de modo que una inyección proporciona una cantidad eficaz para producir el efecto farmacológico deseado. La dosis exacta depende de la edad, peso y estado del paciente o animal como se conoce en la técnica.

Las preparaciones parenterales unidosis se envasan en una ampolla, vial o jeringa con una aguja. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles, como se conoce y se practica la técnica.

30 De forma ilustrativa, la infusión intravenosa o intraarterial de una solución acuosa estéril que contiene un compuesto activo es un modo eficaz de administración. Otra realización es una solución o suspensión acuosa u oleosa estéril que contiene un material activo inyectado según sea necesario para producir el efecto farmacológico deseado.

Los inyectables se diseñan para administración local y sistémica. Típicamente una dosificación terapéuticamente eficaz se formula para que contenga una concentración de al menos aproximadamente el 0,1% p/p hasta aproximadamente el 90% p/p o más, preferiblemente más del 1% p/p del compuesto activo del tejido o tejidos tratados. El ingrediente activo, tal como una sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma puede administrarse de una vez o puede dividirse en varias dosis más pequeñas que se administrarán a intervalos de tiempo. Se entiende que la dosificación exacta y la duración del tratamiento están en función del tejido que se trate y pueden determinarse empíricamente usando protocolos de ensayo conocidos o por extrapolación a partir de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Debe señalarse que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la edad del individuo tratado. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deberían ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administre o supervise la administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración expuestos en este documento son ejemplares solamente y no pretenden limitar al alcance o la práctica de las formulaciones reivindicadas.

Los compuestos proporcionados en este documento pueden formularse por administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril u otros disolventes antes del uso. Por ejemplo, se proporcionan en este documento formulaciones parenterales que contienen una cantidad eficaz de sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma, tal como de 500 a 500.000 Unidades, en una solución estabilizada o una forma liofilizada.

El compuesto puede suspenderse en forma micronizada u otra forma adecuada o puede derivatizarse para producir un producto activo más soluble o para producir un profármaco. La forma de la mezcla resultante depende de varios factores, incluyendo el modo deseado de administración y la solubilidad del compuesto en el vehículo o excipiente seleccionado. La concentración eficaz es suficiente para mejorar los síntomas de la afección y puede determinarse empíricamente.

3. Polvos Liofilizados

65 También se proporcionan en este documento polvos liofilizados que contienen sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma que pueden reconstituirse para la administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. Estas formulaciones también pueden reconstituirse y formularse como sólidos o geles.

El polvo estéril, liofilizado se prepara por disolución de una porción sólida de o mezcla de una alícuota de una solución que contiene una sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma en un disolvente adecuado. El disolvente puede contener un excipiente que mejore la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituida preparada a partir del polvo. Los excipientes que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa, lactosa u otro agente adecuado. El disolvente también puede contener un tampón, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro tampón de este tipo conocido por los especialistas en la técnica típicamente a un pH aproximadamente neutro. La esterilización por filtración posterior de la solución seguida de liofilización en condiciones convencionales conocidas por los especialistas en la técnica proporciona la formulación liofilizada. Generalmente, la solución resultante de la filtración estéril se reparte en viales para su liofilización. Cada vial puede contener una sola dosificación, tal como 10-1000 mg o 100-500 mg o múltiples dosificaciones del compuesto.

En resumen, el polvo liofilizado se prepara por disolución de dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa, lactosa u otro agente adecuado, aproximadamente el 1-20% en un tampón adecuado, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro tampón de este tipo conocido por los especialistas en la técnica a un pH aproximadamente neutro. Después, se añade una sal seleccionada, tal como, por ejemplo, la sal de sodio de la sHASEGP (aproximadamente 1 g de la sal por 10-100 g de la solución de tampón, típicamente aproximadamente 1 g/30 g) a la mezcla resultante por encima de la temperatura ambiente, tal como a aproximadamente 30-35°C y se agita hasta que se disuelve. La mezcla resultante se diluye por adición de más tampón, para disminuir la concentración resultante de la sal en aproximadamente el 10-50%, típicamente aproximadamente el 15-25%. La mezcla resultante se esteriliza por filtración o se trata para eliminar particulados y para asegurar la esterilidad y se reparte en viales para su liofilización. El polvo liofilizado puede almacenarse en condiciones apropiadas, tales como a de aproximadamente 4°C a temperatura ambiente.

La reconstitución de este polvo liofilizado con agua para inyección proporciona una formulación para el uso en la administración parenteral. Para reconstitución, se añade una cantidad terapéuticamente eficaz del polvo liofilizado que contiene una sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma por mililitro de agua estéril u otro vehículo adecuado. La cantidad exacta depende del compuesto seleccionado y puede determinarse empíricamente por métodos conocidos por los especialistas en la técnica.

4. Administración tópica

Se preparan mezclas tópicas como se describe para la administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsiones o similares y se formulan como cremas, geles, pomadas, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, vendas, parches dérmicos o cualquier otra formulación adecuada para la administración tópica.

Las composiciones de sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma o derivados farmacéuticamente aceptables de la misma pueden formularse como aerosoles para aplicación tópica, tal como por inhalación (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 4.404.126, 4.414.209 y 4.264.923, que describen aerosoles para el suministro de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma). Estas formulaciones para administración en el tracto respiratorio pueden ser en forma de un aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, en solitario o en combinación con un vehículo inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de la formulación tendrán típicamente diámetros de menos de 50 micrómetros, tal como de menos de 10 micrómetros.

Para la administración por inhalación, las composiciones para uso en este documento pueden suministrarse en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o de un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, incluyendo, pero sin limitación, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono y otros gases adecuados. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para el uso en un inhalador o insuflador pueden formularse de forma que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las composiciones pueden formularse para aplicación local o tópica, tal como para aplicación tópica en la piel y membranas mucosas, tal como en el ojo, en forma de geles, cremas y lociones y para aplicación en el ojo o para aplicación intracisternal o intraespinal. La administración tópica se contempla para el suministro transdérmico y también para la administración en los ojos o mucosa o para terapias de inhalación. También pueden administrarse soluciones nasales del compuesto activo en solitario o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

Por ejemplo, las formulaciones adecuadas para aplicación tópica en la piel o en el ojo se formulan generalmente como una pomada, crema, loción, pastas, gel, pulverización, aerosol y aceite. Los vehículos que pueden usarse incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes y combinaciones de dos o más de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden contener ventajosamente además del 0,05 al 15 por ciento en peso de espesantes, incluyendo, pero sin limitación, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poli(alquilenglicoles), poli(hidroxialquilo), (met)acrilatos o poli(met)acrilamidas. Una formulación tópica se aplica con frecuencia por instilación o como una pomada en el saco conjuntival. También puede usarse para irrigación o lubricación del ojo, senos

faciales y meato auditorio externo. Las formulaciones tópicas en el estado líquido también pueden estar presentes en una matriz polimérica tridimensional hidrófila en forma de una tira, lente de contacto y similar a partir de la que se liberan los componentes activos. También puede inyectarse en la cámara anterior del ojo y otros lugares. Por ejemplo, en este documento se proporciona una formulación para uso intraocular después de la inyección de un compuesto viscoelástico que contiene una solución estabilizada de una cantidad eficaz de una sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma, tal como de 1 a 5000 Unidades de la glicoproteína soluble con de 30 a 150.000 Unidades/mg de actividad específica en un volumen pequeño, tal como de 5 a 50 μ l.

Estas soluciones, particularmente las destinadas para uso oftálmico, pueden formularse como soluciones isotónicas al 0,01%-10%, a un pH de aproximadamente 5-7 con sales apropiadas.

5. Composiciones para Otras Vías de Administración

Otras vías de administración, tales como aplicación tópica, parches transdérmicos, y administración rectal también se contemplan en este documento.

Por ejemplo, son formas de dosificación farmacéutica para administración rectal supositorios rectales, cápsulas y comprimidos para efecto sistémico. Los supositorios rectales que se usan en este documento se refieren a cuerpos sólidos para inserción en el recto que se funden o ablandan a temperatura corporal liberando uno o más ingredientes farmacológicamente o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para aumentar el punto de fusión. Los ejemplos de bases incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, carbowax (polioxietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Pueden usarse combinaciones de diversas bases. Los agentes para aumentar el punto de fusión de supositorios incluyen esperma de ballena y cera. Pueden prepararse supositorios rectales mediante el método de compresión o por moldeo. El peso típico de un supositorio rectal es de aproximadamente 2 a 3 g.

Los comprimidos y cápsulas para administración rectal se fabrican usando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y por los mismos métodos como para formulaciones para administración oral.

Las formulaciones adecuadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches separados adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Dichos parches contienen convenientemente el compuesto activo como una solución acuosa opcionalmente tamponada de, por ejemplo, una concentración de 0,1 a 0,2 M con respecto al compuesto activo. Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica también pueden suministrarse por iontoforesis (véase, por ejemplo, Pharmaceutical Research 3 (6): 318 (1986)) y típicamente adoptan la forma de una solución acuosa opcionalmente tamponada del compuesto activo.

Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse por medios de liberación controlada y/o dispositivos de suministro (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N°: 3.536.809; 3.598.123; 3.630.200; 3.845.770; 3.847.770; 3.916.899; 4.008.719; 4.687.610; 4.769.027; 5.059.595; 5.073.543; 5.120.548; 5.354.566; 5.591.767; 5.639.476; 5.674.533 y 5.733.566). Los compuestos activos o derivados farmacéuticamente aceptables pueden prepararse con vehículos que protejan al compuesto frente a la eliminación rápida del cuerpo, tal como formulaciones de liberación temporalizada o recubrimientos.

En una realización de las composiciones y métodos proporcionados en este documento, el agente terapéutico se administra localmente en un vehículo de suministro de liberación lenta, por ejemplo, encapsulado en un sistema de dispersión coloidal o en cristales estabilizados por polímero. Los sistemas de dispersión coloidal útiles incluyen nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Por ejemplo, el sistema de dispersión coloidal puede ser un liposoma o una microesfera. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de suministro de liberación lenta cuando se inyectan o implantan. Algunos ejemplos de conjugados de lípido-polímero y liposomas se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.631.018, que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Otros ejemplos de vehículos de suministro de liberación lenta son matrices de hidrogel biodegradables (Patente de Estados Unidos N° 5.041.292) conjugados de polímeros dendríticos (Patente de Estados Unidos N° 5.14.166), y liposomas multivesiculares (Depofoam[®]. Depotech, San Diego, CA) (Patente de Estados Unidos N° 5.723.147 y 5.766.627). Un tipo de microesferas adecuado para encapsular agentes terapéuticos para inyección local (por ejemplo, en tejido subdérmico) son microesferas de poli(D,L)lactida como se describen en D. Fletcher, *Anesth. Analg.* 84: 90-94, (1997). Por ejemplo, puede emplearse una formulación de liberación lenta que contiene una cantidad eficaz de sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma, tal como de 1 a 5000 Unidades/ml para diversos usos o para tratar diversas afecciones, incluyendo, pero sin limitación, formulaciones cosméticas y tratamiento de lesiones de médula espinal.

Pueden mantenerse niveles sanguíneos deseables mediante una infusión continua del agente activo como se determina por niveles plasmáticos. Debería señalarse que el médico adjunto sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar una terapia a una menor dosificación debido a toxicidad o disfunciones de la médula ósea, hígado o riñón. Por el contrario, el médico adjunto también sabría cómo y cuándo ajustar el tratamiento a mayores niveles si la respuesta clínica no es adecuada (excluyendo efectos secundarios tóxicos).

La eficacia y/o toxicidad del polipéptido sHASEGP y/o su inhibidor o inhibidores en solitario o en combinación con otros agentes, tales como agentes terapéuticamente eficaces, también pueden evaluarse por los métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, O & Apos; Reilly, *Investigational New Drugs* 15: 5-13 (1997)).

5

6. Artículos de fabricación

Los polipéptidos sHASEGP o dominios hialuronidasa humanos solubles de los mismos o composiciones que contienen cualquiera de los agentes anteriores pueden envasarse como artículos de fabricación que contienen material envasado, un compuesto o un derivado adecuado del mismo proporcionado en este documento, que es eficaz para el tratamiento de una enfermedad o trastorno contemplado en este documento, dentro del material de envasado, y un marcador que indica que el compuesto o un derivado adecuado del mismo está para tratar las enfermedades o trastornos contemplados en este documento. El marcador puede incluir opcionalmente los trastornos para los que se garantiza la terapia.

15

Los artículos de fabricación proporcionados en este documento contienen materiales de envasado. Los materiales de envasado para uso en el envasado de productos farmacéuticos son bien conocidos por los especialistas en la técnica (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.323.907, 5.052.558 y 5.033.352). Los ejemplos de materiales de envasado farmacéuticos incluyen, pero sin limitación, envases tipo blíster, frascos, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, frascos y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y un modo deseado de administración y tratamiento. Se contempla una amplia serie de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionadas en este documento, así como una diversidad de tratamientos para cualquier trastorno en el que esté implicada una infección por HCV como mediador o elemento de contribución a los síntomas o causa.

25

También se proporcionan en este documento kits que contienen las composiciones y/o las combinaciones con instrucciones para la administración de las mismas. El kit puede incluir además una aguja o jeringa, típicamente envasada en forma estéril, para inyección del complejo y/o una almohadilla de alcohol envasada. Opcionalmente se incluyen instrucciones para la administración del agente activo por un clínico o por el paciente. Por ejemplo, en este documento se proporciona un kit que contienen una jeringa de volumen pequeño con una cantidad eficaz de sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma, tal como de 1 a 5000 Unidades de la glicoproteína soluble, en un volumen de 5 a 50 μ l, que contiene opcionalmente una segunda jeringa que contiene un compuesto viscoelástico. También se proporciona en este documento un kit que contiene una jeringa de volumen pequeño que contiene una cantidad eficaz de sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma, tal como de 1 a 500 Unidades de la glicoproteína soluble y una cantidad terapéutica de un segundo ingrediente activo, tal como un fármaco, una molécula pequeña, una proteína o un ácido nucleico.

K. Modelos animales

40

Se proporcionan en este documento modelos animales transgénicos y animales, tales como roedores, incluyendo ratones y ratas, vacas, pollos, cerdos, cabras, ovejas, monos, incluyendo gorilas y otros primates. En particular, se proporcionan animales transgénicos no humanos que contienen un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido sHASEGP o un animal transgénico en el que se ha alterado la expresión del polipéptido, tal como por sustitución o modificación de la región promotora u otra región reguladora del gen endógeno. Dicho animal puede producirse promoviendo la recombinación entre ácidos nucleicos endógenos y un gen de sHASEGP exógeno que podría sobreexpresarse o expresarse de forma errónea, tal como por expresión bajo un promotor fuerte, mediante un acontecimiento de recombinación homóloga o de otro tipo.

50

Pueden producirse animales transgénicos introduciendo el ácido nucleico usando cualquier método conocido de suministro, incluyendo, pero sin limitación, microinyección, lipofección y otros modos de suministro de genes en una célula de línea germinal o célula somática, tal como una célula madre embrionaria. Típicamente el ácido nucleico se introduce en una célula, tal como una célula madre embrionaria (ES), seguida de inyección de las células ES en un blastocisto e implantación del blastocisto en una madre de acogida, que se sigue del nacimiento de un animal transgénico. Generalmente, la introducción de una molécula de ácido nucleico heteróloga en un cromosoma del animal se produce mediante una recombinación entre el ácido nucleico codificante de sHASEGP heterólogo y un ácido nucleico endógeno. El ácido nucleico heterólogo puede dirigirse a un cromosoma específico. En algunos casos, pueden producirse animales *knock out*. Dicho animal puede producirse inicialmente promoviendo la recombinación homóloga entre un gen de polipéptido sHASEGP en su cromosoma y un gen de polipéptido sHASEGP exógeno que se ha inactivado biológicamente (típicamente por inserción de una secuencia heteróloga, por ejemplo, un gen de resistencia a antibiótico). En una realización, esta recombinación homóloga se realiza por transformación de células madre obtenidas de embriones (ES) con un vector que contiene el gen de polipéptido sHASEGP inactivado por inserción, de modo que se produce una recombinación homóloga, seguido de inyección de las células ES en un blastocisto e implantación del blastocisto en una madre de acogida, seguido del nacimiento del animal quimérico ("animal *knock out*") en el que se ha inactivado un gen de polipéptido sHASEGP (véase Capecchi, *Science* 244: 1288-1292 (1989)). El animal quimérico puede reproducirse para producir animales *knock out* homocigotos que después pueden usarse para producir animales *knock out* adicionales. Los animales *knock out* incluyen, pero sin limitación, ratones, hámsteres, ovejas, cerdos, ganado y otros mamíferos no humanos. Por ejemplo, se produce un ratón *knock out*. Los animales resultantes pueden

65

servir como modelos de enfermedades específicas, tales como cánceres, que presentan subexpresión de un polipéptido sHASEGP. Dichos animales *knock out* pueden usarse como modelos animales de dichas enfermedades, por ejemplo, para explorar o ensayar moléculas para determinar la capacidad para tratar o prevenir dichas enfermedades o trastornos.

5 También pueden producirse otros tipos de animales transgénicos incluyendo los que sobreexpresan el polipéptido sHASEGP. Dichos animales incluyen animales “*knock in*” que son animales en los que el gen normal se sustituye por una variante, tal como un mutante, una forma sobreexpresada u otra forma. Por ejemplo, el de una especie, tal como un gen endógeno de roedor, puede sustituirse por el gen de otra especie, tal como de un ser humano. También pueden producirse animales por recombinación no homóloga en otros sitios en un cromosoma; incluyendo animales que tienen una pluralidad de acontecimientos de integración.

Después de la producción de la primera generación de animales transgénicos, puede reproducirse un animal quimérico para producir animales adicionales que sobreexpresen o expresen erróneamente polipéptidos sHASEGP. Dichos animales incluyen, pero sin limitación, ratones, hámsteres, ovejas, cerdos, ganado y otros mamíferos no humanos. Los animales resultantes pueden servir como modelos de enfermedades específicas tales como cánceres, que presentan sobreexpresión o expresión errónea de un polipéptido sHASEGP. Dichos animales pueden usarse como modelos animales de dichas enfermedades, por ejemplo, para explorar o ensayar moléculas para determinar la capacidad para tratar o prevenir dichas enfermedades o trastornos. En una realización específica, se produce un ratón que sobreexpresa o expresa erróneamente un polipéptido sHASEGP.

Los siguientes ejemplos se incluyen para fines ilustrativos solamente y no pretenden limitar el alcance de la invención.

25 L. Usos terapéuticos de sHASEGP

Las enzimas hialuronidasas de origen natural de mataderos han sido la fuente principal de preparaciones enzimáticas clínicas durante más de cuarenta años. Los testículos bovinos y ovinos son la principal fuente de este material. Sin embargo, estas preparaciones enzimáticas clínicas son muy brutas, se comercializan en preparaciones que varían del 0,5-5% de pureza basándose en actividades específicas conocidas entre 30-100.000 Unidades/mg. Por lo tanto, su carencia de pureza combinada con su origen de matadero, las deja tanto como inmunogénicas para seres humanos como una fuente potencial de enfermedad de Creutzfeld Jacob y otros patógenos bovinos y ovinos. Se sabe que se dan reacciones anafilácticas contra preparaciones de hialuronidasa bovina y ovina.

35 Se ha usado hialuronidasa obtenida de ganado o de bacterias en el tratamiento de enfermedades asociadas con ácido hialurónico en exceso y para aumentar la circulación de fluidos fisiológicos y/o agentes terapéuticos. Por ejemplo, puede coinyectarse hialuronidasa bovina con anestesia en los bloques peribulbar, retrobulbar y subtenoniano para procedimientos quirúrgicos oftálmicos. Además, aparecen complicaciones quirúrgicas aumentadas en su ausencia (Brown SM *et al.* J Cataract Refract Surg. Sep 1999; 25(9): 1245-9). La hialuronidasa bovina también se usa como un antídoto para la necrosis local a partir de la inyección paravenosa de sustancias necróticas tales como alcaloides de la vinca (Few, B.J. (1987) Amer. J. Matern. Child Nurs. 12,23-26). La hialuronidasa de testículos bovinos también es útil para el tratamiento de gangliones quísticos (Pauletal. J Hand Surg Abril 1997; 22 (2): 219-21). También puede usarse hialuronidasa para facilitar el suministro subcutáneo de líquidos en la hipodermocclisis (Berger EY, Am Geriatr Soc Marzo 1984; 32 (3): 199-203). También se ha utilizado la hialuronidasa para reducir la presión intraocular en los ojos de pacientes con glaucoma y pacientes con cataratas que reciben compuestos viscoelásticos (Patente de Estados Unidos N° 4.820.516 expedida el 11 de abril de 1989).

También se han usado hialuronidasas obtenidas de ganado o de bacterias como un “agente de propagación” para aumentar la actividad de compuestos quimioterápicos y/o la accesibilidad de tumores a quimioterápicos (Schuller *et al.*, 1991, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 32: 173, resumen n° 1034; Czejka *et al.*, 1990, Pharmazie 45: H.9). La quimioterapia de combinación con hialuronidasa es eficaz en el tratamiento de una diversidad de cánceres incluyendo cáncer de vejiga urinaria (Horn *et al.*, 1985, J. Surg. Oncol. 28: 304-307), carcinoma de células escamosas (Kohn *et al.*, 94, J. Cancer Res. Oncol. 120: 293-297), cáncer de mama (Beckenlehner *et al.*, 1992, J. Cancer Res. Oncol. 118: 591-596) y cáncer gastrointestinal (Scheithauer *et al.*, 1988, Anticancer Res. 8: 391-396). La hialuronidasa es eficaz como el único agente terapéutico en el tratamiento de cáncer cerebral (gliomas) (Solicitud PCT publicada N° WO88/02261, publicada el 7 de abril de 1988). La administración de hialuronidasa también induce sensibilidad de tumores anteriormente resistentes a quimioterapia del páncreas, estómago, colon, ovarios y mama (Baumgartneretal., 1988, Reg. Cancer Treat. 1: 55-58; Zankeretal., 1986, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 27: 390). Desafortunadamente, los contaminantes y la naturaleza no humana de dichas hialuronidasas dan como resultado reacciones anafilácticas. Además de sus efectos anticancerosos indirectos, la hialuronidasa obtenida de ganado tiene efectos anticarcinógenos directos. La hialuronidasa impide el desarrollo de tumores trasplantados en ratones (De Maeyer *et al.*, 1992, Int. J. Cancer 51: 657-660) e inhibe la formación de tumores tras la exposición carcinógenos (Pawlowski *et al.*, 1979, Int. J. Cancer 23: 105-109; Haberman *et al.*, 1981, Proceedings of the 17th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Washington, D.C., 22: 105, resumen n° 415).

65 Dado el valor de hialuronidasas obtenidas de ganado como compuesto terapéutico, particularmente en quimioterapia junto con quimioterápicos convencionales o como quimioterápico por sí mismo, existe la necesidad en el campo de preparaciones sustancialmente puras de hialuronidasa de origen humano. También existe la necesidad de métodos efi-

caces y rentables de preparar hialuronidasa para proporcionar cantidades comercialmente significativas de la enzima. La presente invención aborda estos problemas.

5 El ácido hialurónico es un componente esencial de la matriz extracelular. El ácido hialurónico se encuentra en el tejido conjuntivo de mamíferos y es el constituyente principal del humor vítreo del ojo. En el tejido conjuntivo, el agua de hidratación asociada con el ácido hialurónico genera espacios entre tejidos, generando de este modo un entorno que lleva al movimiento y a la proliferación celular. El ácido hialurónico desempeña un papel clave en los fenómenos biológicos asociados con la motilidad celular incluyendo desarrollo rápido, regeneración, reparación, embriogénesis, desarrollo embrionario, cicatrización de heridas, angiogénesis y oncogénesis (Toole, 1991, Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (ed), Plenum Press, Nueva York, 1384-1386; Bertrand *et al.*, 1992, Int. J. Cancer 52: 1-6; Knudson *et al.*, 1993, FASEB J. 7: 1233-1241). Además, los niveles de ácido hialurónico se correlacionan con la agresividad tumoral (Ozello *et al.*, 1960, Cancer Res. 20: 600-604; Takeuchi *et al.*, 1976, Cancer Res. 36:2133-2139; Kimata *et al.*, 1983, Cancer Res. 43: 1347-1354).

15 Después de una lesión de la médula espinal, se producen cicatrices gliales por astrocitos y contienen proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG). Los CSPG desempeñan un papel crucial en la inhibición del crecimiento de axones (Levine, 1994; Powell *et al.*), por ejemplo, durante el desarrollo fetal, los CSPG repelen axones e inhiben la adhesión de células neuronales. Los CSPG también desempeñan un papel importante en la formación de límites (Snow *et al.*, 1990, 1992; Powell y Geller, 1999). Además, la expresión de CSPG aumenta después de una lesión del CNS (Mckee *et al.*, 1991; Davies *et al.*, 1997).

20 Los estudios indican que los efectos inhibidores de CSPG se deben principalmente a la cadena de azúcar de glicosaminoglicano (GAG) de sulfato de condroitina (CS) (Snow *et al.*, 1990; Cole y McCable, 1991; Geisert y Bidanset, 1993). Esto se confirma por el descubrimiento de que la administración de condroitinasa bacteriana promueve de hecho la regeneración de axones cuando se administra por vía intratecal. Además, los experimentos electrofisiológicos determinaron que los axones CST regenerados establecían conexiones funcionales (Bradbury, *et al* 2002). Además de sus efectos inhibidores directos, los CSGP también podían interaccionar con moléculas de adhesión celular o factores neurotróficos para influir en la extensión de neuritas (Roberts *et al.*, 1988; Ruoslahti y Yamaguchi, 1991; Milev *et al.*, 1994). Por lo tanto, las hialuronidasas de mamífero recombinantes son útiles para invertir la inhibición de CSPG en la cicatriz glial y para promover la regeneración de axones después de una lesión.

30 La cantidad de sHASEGP necesaria para degradar lo suficiente CSPG en la cicatriz glial variará. En algunos casos la administración repetida de 10-5000 Unidades de sHASEGP por suministro intratecal será necesaria para eliminar los CSPG en la cicatriz. En otros casos, puede preferirse la liberación sostenida de sHASEGP a través del uso de una formulación de liberación lenta. Como alternativa, la administración de vectores de terapia génica que codifican sHASEGP puede ser eficaz para aumentar la eliminación de CSPG.

40 También pueden utilizarse sHASEGP para el tratamiento de discos herniados en un proceso conocido como quimionucleolisis. La condroitinasa ABC y la enzima que escinde sustratos similares a sHASEGP pueden inducir la reducción de la presión intradiscal en la médula lumbar. (Sasaki *et al.*, 2001, Ishikawa *et al.*, 1999). Existen tres tipos de lesiones de disco. Un disco protruido es uno que está intacto pero que sobresale. En un disco extruido, la envuelta fibrosa se ha roto y el NP rezuma, pero todavía está conectado al disco. En un disco secuestrado, se ha desprendido un fragmento del NP del disco y está libre en el canal espinal. La quimionucleolisis es eficaz en discos protruidos y extruidos, pero no en lesiones de disco secuestrado. En los Estados Unidos, la quimionucleolisis está autorizada solamente para el uso en la médula lumbar (inferior). En otros países, también ha tenido éxito para tratar hernias cervicales (de médula superior). La quimionucleolisis es por lo tanto una alternativa conservativa a la cirugía de disco cuando es preferible para reducir la presión de disco.

50 La composición exacta y estructura de la cadena o cadenas de carbohidrato en una glicoproteína puede influir directamente en su vida en suero, puesto que las células en el hígado y el sistema reticuloendotelial pueden unirse e internalizar glicoproteínas circulantes con carbohidratos específicos. Los hepatocitos tienen receptores en sus superficies que reconocen cadenas de oligosacáridos con restos Gal terminales (es decir, el extremo o extremos más externos de glicanos respecto al polipéptido), los macrófagos contienen receptores para restos Man o GlcNAc terminales y los hepatocitos y linfocitos tienen receptores para restos fucosa expuestos. Sin embargo, no se han encontrado receptores específicos de ácido siálico. Aunque algo dependiente de la disposición espacial de los oligosacáridos, como norma general, cuanto mayor el número de restos de azúcares expuestos reconocidos por receptores de superficie celular en el hígado y el sistema reticuloendotelial, más rápidamente se aclarará una glicoproteína del suero. Debido a la ausencia de receptores específicos de ácido siálico, sin embargo, los oligosacáridos con todas sus ramificaciones terminadas o "protegidas terminalmente" con ácido siálico no promoverán el aclaramiento de la proteína a la que estén unidos.

60 La presencia y naturaleza de la cadena o cadenas de oligosacáridos en una glicoproteína también puede afectar a propiedades bioquímicas importantes además de su reconocimiento por receptores específicos de azúcares en células hepáticas y reticuloendoteliales. La eliminación del carbohidrato de una glicoproteína disminuirá habitualmente su solubilidad y también puede aumentar su susceptibilidad a degradación proteolítica por desestabilización del patrón de plegamiento del polipéptido correcto y/o desenmascaramiento de sitios sensibles a proteasas. Por razones similares, el estado de glicosilación de una proteína puede afectar a su reconocimiento por el sistema inmune.

Las sHASEGP pueden usarse para eliminar las células del cumulus que rodean a un ovocito antes de la crioconservación y otras técnicas de fertilización *in vitro* tales como inyección de esperma intracitoplasmática (ICSI). Puede añadirse hialuronidasa a los ovocitos recogidos entre 10-200 U/ml en soluciones salinas tamponadas. Los ovocitos se separan de las células del cumulus liberadas por aspiración y se lavan a través de varios lavados con medios que carecen de hialuronidasa. Los huevos pueden procesarse después para crioconservación o técnicas de IVF.

Las sHASEGP también son útiles para la penetración más eficaz de agentes quimioterápicos en tumores sólidos. Pueden inyectarse sHASEGP intratumoralmente con agentes anticancerosos o por vía intravenosa para cánceres diseminados o tumores difíciles de alcanzar. El agente anticanceroso puede ser un quimioterápico, un anticuerpo, un péptido, o un vector de terapia génica, virus o ADN. Además, pueden usarse sHASEGP para reclutar células tumorales en la combinación de ciclado para sensibilización en tumores previamente quimiorresistentes que han adquirido multirresistencia farmacológica (St Croix *et al* Cancer Lett 1998 Sep 11; 131 (1): 35-44). Las sHASEGP también son útiles para aumentar el suministro de compuestos biológicos tales como anticuerpos monoclonales, citocinas y otros fármacos a tumores que acumulan glicosaminoglicanos. Muchos tumores delecionan genes implicados en el catabolismo de glicosaminoglicanos de modo que la acumulación localizada puede impedir que agentes antineoplásicos y el sistema inmune alcancen la masa tumoral.

Las sHASEGP también pueden usarse para aumentar la sensibilidad de tumores que sean resistentes a quimioterapia convencional. En una realización, se administra sHASEGP a un paciente que tiene un tumor asociado con un déficit de LuCa-1 en una cantidad eficaz para aumentar la difusión alrededor del sitio tumoral (por ejemplo, aumentar la circulación de factores quimioterápicos (por ejemplo, para facilitar la circulación y/o concentraciones de agentes quimioterápicos en y alrededor del sitio tumoral), inhibir la motilidad de células tumorales (por ejemplo, por degradación de HA) y/o disminuir el umbral de apoptosis de una célula o células tumorales (es decir, llevar la célula o células tumorales a un estado de anoikis), un estado que hace a la célula o células tumorales más susceptibles a la acción de agentes quimioterápicos u otros agentes que pueden facilitar la muerte celular, preferiblemente facilitar de forma preferente la muerte celular programada de células en anoikis. Los agentes quimioterápicos como se usan en este documento pretenden incluir todas las moléculas sintéticas (por ejemplo, cisplatino) así como de origen natural (por ejemplo, factor de necrosis tumoral IF) que facilitan la inhibición del desarrollo de células tumorales y preferiblemente facilitan, más preferiblemente facilitan preferentemente la muerte de células tumorales.

Es de interés particular el uso de sHASEGP para el tratamiento de cánceres metastásicos y no metastásicos, particularmente cánceres metastásicos que tienen una actividad hialuronidasa de disminuida a indetectable respecto a células no cancerosas (normales). La sHASEGP puede usarse como agente quimioterápico (en solitario o en combinación con otros quimioterápicos) en el tratamiento de cualquiera de una diversidad de cánceres, particularmente tumores invasivos. Por ejemplo, la sHASEGP puede usarse en el tratamiento del carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma pulmonar de células escamosas, así como cánceres de la mama, ovarios, cabeza y cuello y cualquier otro cáncer asociado con niveles disminuidos de hialuronidasa o con un gen LuCa-1 defectuoso (hpHase) (por ejemplo, un gen LuCa-1 que no proporcione la expresión de niveles de hpHase adecuados o que codifique una hpHase defectuosa que no proporcione un nivel adecuado de actividad hialuronidasa) u otros defectos asociados con un catabolismo de hialuronano disminuido. La sHASEGP es preferible para el tratamiento de tumores malignos asociados con un catabolismo de HA deficiente ya que no requiere participación celular para que se produzca la degradación.

La dosificación específica apropiada para la administración puede determinarse fácilmente por un especialista en la técnica de acuerdo con los factores analizados anteriormente (véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine, 11ª Edición, 1987). Además, las estimaciones para dosificaciones apropiadas en seres humanos pueden extrapolarse a partir de determinaciones del nivel de actividad enzimática de sHASEGP *in vitro* y/o dosificaciones eficaces en estudios animales. Por ejemplo, la hialuronidasa 70-300 TRU es eficaz para reducir la carga tumoral en un ratón scid. Dada esta información, las dosificaciones correspondientes en el ser humano promedio de 70 kg variarán de aproximadamente 250.000-1.200.000 TRU de hialuronidasa. La cantidad de sHASEGP administrada a un paciente humano está generalmente en el intervalo de 1 TRU a 5.000.000 TRU de actividad enzimática, preferiblemente entre aproximadamente 1.000 TRU y 2.500.000 TRU, más preferiblemente entre aproximadamente 100.000 TRU y 1.500.000 TRU, normalmente entre aproximadamente 250.000 TRU y 1.200.000 TRU, representando aproximadamente 725.000 TRU las dosis promedias prescritas.

En una realización, se formula una sHASEGP en una solución salina 0,15 M que contiene sHASEGP a una concentración de aproximadamente 150.000 TRU/ml. Después la formulación se inyecta por vía intravenosa a 15.000 TRU/kg peso corporal del paciente. Como alternativa la formulación enzimática también puede inyectarse por vía subcutánea para permitir que la hialuronidasa se perfunda alrededor del sitio tumoral. En una realización preferida, la sHASEGP se inyecta peritumoralmente o en la masa tumoral. En otra realización preferida, la sHASEGP se formula como un liposoma y se suministra por inyección por vía intravenosa o próximo al sitio de células cancerosas asociado con una deficiencia en el gen LuCa-1 (hpHase). La inyección de sHASEGP por vía intravenosa da como resultado sHASEGP en el sitio tumoral. Además, la sHASEGP supersialada es preferible para administración parenteral en el sentido de que los ácidos siálicos terminales en la sHASEGP impiden el aclaramiento de la enzima de la circulación por el sistema reticuloendotelial. Las comparaciones de sHASEGP supersialada con hialuronidasas bovina y ovina no sialadas pone de manifiesto que se consigue una farmacocinética sustancialmente más favorable.

Facilitación de terapia génica

La eficacia de la mayoría de vehículos de suministro génico *in vivo* no se corresponde con la eficacia que se encuentra *in vitro*. Los glicosaminoglicanos pueden obstaculizar la transferencia y difusión de ADN y vectores virales a muchos tipos celulares. Los niveles de dicho material de matriz extracelular pueden obstaculizar el proceso considerablemente. Dubensky *et al.*, (Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Dec; 81 (23):7529-33) demostraron que cuando la hialuronidasa se combina con colagenasa podría facilitar la transducción de ADN *in vivo*. Se ha demostrado que el virus adenoasociado también es susceptible a terapia génica mediada por hialuronidasa Favre *et al.*, (Gene Ther 2000 Aug; 7 (16): 1417-20).

Se ha determinado en este documento que se abren canales de tamaño definido en la matriz extracelular con sHASEGP. Estos poros no aumentan la difusión de sustancias mayores de aproximadamente 200-500 nm de diámetro. Sin embargo, moléculas más pequeñas tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y complejos de ADN son susceptibles a difusión mediada por sHASEGP.

Como alternativa, los virus pueden equiparse con el gen de sHASEGP para facilitar su replicación y propagación dentro de un tejido diana, por ejemplo. El tejido diana puede ser un tejido canceroso por el que el virus es capaz de una replicación selectiva dentro del tumor. El virus también puede ser un virus no lítico en el que el virus se replica selectivamente bajo un promotor específico de tejido. A medida que el virus se replica, la coexpresión de sHASEGP con genes virales facilitará la propagación del virus *in vivo*.

Como alternativa, el ácido nucleico de interés y una sHASEGP pueden usarse simultáneamente o de forma consecutiva o de un modo que sea escalonado con el tiempo. Simultáneamente se refiere a una coadministración. En este caso, estos dos componentes esenciales pueden mezclarse para formar una composición antes de administrarse o pueden administrarse al mismo tiempo a la célula o al organismo hospedador. También es posible administrarlos consecutivamente, es decir uno después del otro, independientemente de qué componente del producto de combinación de acuerdo con la invención se administre primero. Por último, es posible usar un modo de administración que sea escalonado con el tiempo o intermitente y que se interrumpa y reinicie a intervalos que pueden ser o no regulares. Se señala que las vías y sitios de administración de los dos componentes pueden ser diferentes. De acuerdo con una realización particularmente preferida, la sHASEGP se administra antes del ácido nucleico, siendo la vía de administración de los dos componentes preferiblemente similar. El intervalo de tiempo entre las inyecciones no es crítico y puede definirse por el especialista. Es posible recomendar un intervalo de 10 min a 72 h, ventajosamente de 30 min a 48 h, preferiblemente de 1 a 24 h y muy preferiblemente, de 1 a 6 h.

Además, el producto de combinación de acuerdo con la invención también puede combinarse con una o más moléculas destinadas a mejorar la administración del ácido nucleico. Las moléculas pueden ser moléculas que tengan un efecto protector sobre el ácido nucleico (protección respecto a la degradación en la célula), que mejore su penetración o su expresión en la célula hospedadora (péptido fusogénico, señal de localización nuclear, etc) que permita que se dirija a un tipo celular particular (ligando o anticuerpo que reconozca una proteína de superficie celular, etc) o que prolongue el efecto terapéutico (agente inmunosupresor, etc.). El producto de combinación también puede combinarse con agentes que faciliten la transfección (proteínas, etc.).

El producto de combinación de acuerdo con la invención puede prepararse con vistas a una administración local o parenteral o a una administración por la vía digestiva. Las vías que pueden mencionarse en particular son la vía intragástrica, subcutánea, intracardiaca, intravenosa, intraperitoneal, intrasinovial, intratumoral, intrapulmonar, intranasal e intratraqueal y, muy particularmente, la vía intramuscular. La administración puede efectuarse por medio de cualquier procedimiento de la técnica (inyección, vía oral, aerosol, instilación, etc.), como una dosis única o como una dosis que se repite una vez o varias veces después de un intervalo de tiempo particular. La vía de administración puede ajustarse para adaptarse al gen de interés que se va a transferir y la enfermedad a tratar. La formulación puede incluir vehículos farmacéuticamente aceptables (excipientes, adyuvantes, etc.). La sustancia que conduce a la desorganización de la matriz extracelular y el ácido nucleico de interés se disuelven preferiblemente en un tampón que es adecuado para uso farmacéutico y que puede ser hipertónico, hipotónico o isotónico. Pueden preverse diversos tampones. Los que pueden mencionarse a modo de ilustración son una solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%), una solución salina no fisiológica (NaCl al 1,8%), una solución de Hepes-Ringer, una solución de Ringer-Lactato, un tampón que se basa en Tris-HCl (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 a 8, EDTA 1 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 a 8, MgCl₂ 1 mM), un tampón fosfato (tampón fosfato de Krebs H₂O), una solución de azúcares (glucosa, sacarosa, trehalosa, etc) o simplemente agua.

Hipodermocclisis

La hipodermocclisis, la infusión subcutánea de fluidos es una técnica de hidratación útil y fácil adecuada para pacientes adultos de ligeramente a moderadamente deshidratados, especialmente los ancianos. El método se considera seguro y no representa ninguna complicación grave. El efecto adverso más frecuente es un edema subcutáneo ligero que puede tratarse por masaje local o diuréticos sistémicos. Pueden administrarse aproximadamente 3 l en un período de 24 horas en dos sitios separados. Los sitios de infusión comunes son el tórax, abdomen, los muslos y los brazos superiores. La solución preferida es solución salina normal pero también pueden usarse otras soluciones tales como solución salina semi normal, glucosa con solución salina o glucosa al 5 por ciento. Puede añadirse cloruro de potasio

a la bolsa de solución si es necesario. Además, pueden suministrarse otros fármacos a través de vías similares. Puede añadirse sHASEGP humana para aumentar la absorción de líquido y aumentar la velocidad total de administración. La sHASEGP humana es preferible para una hipodermoclisión repetida sobre enzimas obtenidas de matadero en el sentido de que no es probable que sea inmunogénica como se sabe que es la enzima bovina. Puede administrarse en casa por miembros de la familia o una enfermera; la técnica debería ser familiar para todos los médicos de familia.

En pacientes ambulatorios, los sitios de hipodermoclisión incluyen el abdomen, tórax superior, por encima de la mama, sobre un espacio intercostal y el área escapular. En pacientes postrados en cama; los sitios preferidos son los muslos, el abdomen y la cara externa del brazo superior. Después de uno a cuatro días, la aguja y el tubo deberían cambiarse, aunque se han dejado conjuntos de infusión en su lugar durante períodos mucho más largos sin complicaciones. La administración de bolos de 500 ml en una o dos horas tres veces al día también puede administrarse con 150 U de sHASEGP administradas en el sitio subcutáneo antes de la primera infusión de la mañana.

15 *Facilitación de inyecciones terapéuticas*

Muchas moléculas inyectadas por vía percutánea alcanzan la circulación lentamente o con una eficacia muy reducida. Varios factores regulan la farmacocinética y farmacodinámica de moléculas inyectadas por vía subcutánea (SC) o intramuscular (IM). Generalmente, moléculas de mayor tamaño alcanzan la circulación más lentamente y de forma menos eficaz sin un transporte activo hacia la circulación. La biodisponibilidad subcutánea se determina por cálculo de la proporción de área bajo la curva para SC frente a administración intravenosa ($AUC_{SC}/AUC_{intravenosa}$). Un segundo factor es la carga y afinidad por moléculas de la matriz que pueden desempeñar un papel en el secuestro de moléculas por vía subcutánea. Si estos materiales se degradan localmente pueden no alcanzar nunca sus dianas deseadas y por lo tanto demostrar una biodisponibilidad sistémica total disminuida en los órganos diana.

Las proteínas de gran tamaño se administran normalmente por vía intravenosa de modo que el medicamento esté directamente disponible en el torrente sanguíneo. Sin embargo sería ventajoso si un medicamento pudiera administrarse por vía subcutánea, intramuscular o intradérmica, ya que estas formas de administración son mucho más sencillas de manipular por el paciente. Especialmente si el medicamento debe tomarse de forma regular durante toda la vida y el tratamiento debe empezar pronto, cuando el paciente es todavía un niño. Sin embargo, un medicamento con una molécula muy grande y lábil tal como factor de coagulación VIII de 170 a 300 kDa tiene normalmente una disponibilidad muy reducida si se administra por vía subcutánea, intramuscular o intradérmica, puesto que la captación no es suficiente y la degradación es pronunciada.

Además de la necesidad de aumentar la biodisponibilidad de muchos compuestos biológicos administrados por vía subcutánea, también es críticamente importante una farmacocinética más rápida en casos de medicina de emergencia. El tiempo necesario para alcanzar el acceso intravenoso en muchos pacientes puede impedir que se utilice un fármaco que de otro modo sería de acción rápida cuando se administra por vía sistémica. En algunos casos el fracaso al alcanzar el acceso intravenoso se sigue después de inyección subcutánea que conduce a un retraso adicional para alcanzar los órganos diana. Por lo tanto, la disponibilidad más rápida de fármacos subcutáneos sería beneficiosa como primera línea de tratamiento más que arriesgar el tiempo necesario para conseguir un acceso intravenoso. Los ejemplos de moléculas que pueden suministrarse por vía subcutánea así como por vía intravenosa incluyen epinefrina, atropina, narcano, linocaína y dextrosa.

Muchas moléculas inyectadas por vía percutánea alcanzan la circulación lentamente o con una eficacia muy reducida. Varios factores regulan la farmacocinética y farmacodinámica de moléculas inyectadas por vía subcutánea (SC) o por vía intramuscular (IM). Generalmente, moléculas de mayor tamaño alcanzan la circulación más lentamente y menos eficazmente sin un transporte activo hacia la circulación. La biodisponibilidad subcutánea se determina calculando la proporción de área bajo las curvas para SC frente a administración intravenosa ($AUC_{SC}/AUC_{intravenosa}$). Un segundo factor es la carga y afinidad por moléculas de la matriz que pueden desempeñar un papel en el secuestro de moléculas por vía subcutánea. Si estos materiales se degradan localmente pueden no alcanzar nunca sus dianas deseadas y por lo tanto demostrar una biodisponibilidad sistémica total disminuida en los órganos diana.

Las proteínas de gran tamaño se administran normalmente por vía intravenosa de cómo que el medicamento esté disponible directamente en el torrente sanguíneo. Sin embargo sería ventajoso si un medicamento pudiera administrarse por vía subcutánea, intramuscular o intradérmica ya que estas formas de administración son mucho más sencillas de manipular por el paciente. Especialmente si el medicamento debe tomarse de forma regular durante toda la vida y el tratamiento debe comenzar pronto, cuando el paciente es todavía un niño. Sin embargo un medicamento con una molécula muy grande y lábil tal como factor de coagulación VIII de 170 a 300 kDa tiene normalmente una biodisponibilidad muy baja si se administra por vía subcutánea, intramuscular o intradérmica puesto que la captación no es suficiente y la degradación es pronunciada.

Además de la necesidad de aumentar la biodisponibilidad de muchos compuestos biológicos administrados por vía subcutánea, también es críticamente importante una farmacocinética más rápida en casos de medicina de emergencia. El tiempo necesario para alcanzar el acceso intravenoso en muchos pacientes puede impedir que se utilice un fármaco de otro modo de acción rápida cuando se administra por vía sistémica. En algunos casos el fracaso al alcanzar el acceso intravenoso se sigue después de inyección subcutánea que conduce a un retraso adicional para alcanzar los órganos diana. Por lo tanto, la disponibilidad más rápida de fármacos subcutáneos sería beneficiosa como una primera línea de

tratamiento más que arriesgar el tiempo necesario para conseguir un acceso intravenoso. Los ejemplos de moléculas que pueden suministrarse por vía subcutánea así como intravenosa incluyen epinefrina, atropina, narcano, lignocaína y dextrosa.

- 5 Un beneficio adicional de la invención se basa en la capacidad para suministrar volúmenes equivalentes o mayores de soluciones SC o IM sin el dolor y la morbilidad asociadas con la presión y volumen de la solución en el sitio de inyección.

10 *Hemorragia vítrea*

En un esfuerzo por minimizar el potencial para causar un desprendimiento o rotura adicional de la retina durante la realización de una vitrectomía, se ha propuesto anteriormente en la Patente de Estados Unidos N° 5.292.509 (Hageman) inyectar ciertas enzimas glicosaminoglicanas sin proteasas en el cuerpo vítreo, para provocar que el
15 cuerpo vítreo se desacople o “desinserte” de la retina antes de la retirada del cuerpo vítreo. Dicha desinserción o desacoplamiento del cuerpo vítreo tiene la intención de minimizar la probabilidad de que se produzca una rotura o desprendimiento adicional de la retina a medida que se retira el cuerpo vítreo. Los ejemplos de enzimas glicosaminoglicanas sin proteasas específicas que pueden usarse para provocar esta desinserción vítrea incluyen supuestamente; condroitinasa ABC, condroitinase AC, condroitinase B, condroitín 4-sulfatasa, condroitín 6-sulfatasa, hialuronidasa y
20 beta-glucuronidasa.

Aunque se sabe que la enzima hialuronidasa puede usarse para diversas aplicaciones oftálmicas incluyendo la aplicación adjunta de vitrectomía descrita en la Patente de Estados Unidos N° 5.292.509 (Hageman), estudios publicados han indicado que la propia enzima hialuronidasa puede ser tóxica para la retina y/o otras estructuras anatómicas del
25 ojo. Véase, The Safety of Intravitreal Hyaluronidase, Gottlieb, J. L.; Antoszyk, A. N., Hatchell, D. L. y Soloupis, P., Invest Ophthalmol Vis Sci. 31: 11, 2345-52 (1990). Además, el uso de preparaciones de matadero impuras de hialuronidasa puede causar uveítis o inflamación del ojo. El uso de sHASEGP humana es por lo tanto preferible tanto por su potencia aumentada, pureza y ausencia de origen animal que puede dar origen a reacciones inmunogénicas y neutralización mediada por anticuerpos después de una administración repetida. En otra realización, puede inyectarse
30 una forma pegilada de una sHASEGP en el ojo. Dicha sHASEGP pegilada no se elimina del humor vítreo de forma tan rápida y mantiene su actividad en el humor vítreo durante un período de tiempo más prolongado.

La toxicidad oftálmica de algunas preparaciones de hialuronidasa se ha confirmado por otros investigadores que han propuesto que se usen dichas preparaciones de hialuronidasa como un irritante tóxico para causar una neovascularización del ojo inducida experimentalmente, en modelos de toxicidad animal (véase An Experimental Model of
35 Preretinal Neovascularization in the Rabbit; Antoszyk, A. N., Gottlieb, J. L., Casey, R.C., Hatchell, D. L. y Machermer, R., Invest Ophthalmol Vis Sci. 32: 1, 46-51 (1991). El uso de una sHASEGP altamente purificada desprovista de contaminantes basados en mercurio y de origen de ganado o de bacterias es preferible para procedimientos intraoculares. Además, una sHASEGP humana recombinante es preferible sobre preparaciones obtenidas de matadero tanto por pureza, ausencia de patógenos bovinos y riesgo reducido de inmunogenicidad. Más preferiblemente se prevé una sHASEGP pegilada.

Por lo tanto se proporciona un método enzimático que usa una sHASEGP humana para tratar trastornos oftálmicos del ojo de mamífero. En una realización de la invención, dicha sHASEGP está PEGilada para prolongar su permanencia dentro del humor vítreo e impedir una captación localizada. La prevención de neovascularización y la velocidad
45 aumentada del aclaramiento del humor vítreo de materiales tóxicos para la retina se consiguen por administración de una cantidad de hialuronidasa eficaz para licuar el humor vítreo del ojo tratado sin causar daños tóxicos en el ojo. La licuefacción del humor vítreo aumenta la velocidad de intercambio líquido de la cámara vítrea. Este aumento en intercambio elimina esos materiales y afecciones cuya presencia causa daños oftálmicos y retinianos.

50

Usos cosméticos de sHASEGP

Se sabe que la hialuronidasa tiene el efecto de despolimerizar las cadenas mucopolisacáridas largas de la sustancia fundamental responsable de la retención de agua unida y de la ralentización, por compresión capilar, de la difusión de
55 líquidos orgánicos que eliminan desechos metabólicos. Dicha retención de agua y desechos asociada con sobrecarga de grasa de los lipocitos constituye un edema de “piel de cerdo” o edema de “piel de naranja” clásico. Esta despolimerización cortará por lo tanto las cadenas largas de mucopolisacáridos en cadenas más cortas, y por consiguiente la eliminación del agua unida, de desechos, la restauración de la circulación venosa y linfática y desaparición de edema local.

El uso de sHASEGP a modo de administración subcutánea se prefiere por lo tanto para la eliminación de glicosaminoglicanos implicados en la acumulación de la denominada celulosis y para promover el flujo linfático. Se prefiere la sHASEGP humana para el tratamiento de la celulosis en el sentido de que es capaz de la eliminación de dichos
65 glicosaminoglicanos sin los componentes inflamatorios de las proteínas obtenidas de matadero y es de alta pureza y es poco probable que sea inmunogénica. La sHASEGP puede administrarse a través de inyecciones subcutáneas repetidas, a través del suministro transdérmico en forma de pomadas o cremas o a través del uso de formulaciones de liberación lenta inyectables para promover la degradación continua de glicosaminoglicanos y prevenir su reaparición.

Trasplante de órganos

El hialuronano tiene varios efectos biológicos, que están en parte relacionados con su tamaño molecular (West, D. C., Kumar, S. *Exp. Cell. Res.* 183, 179-196, 1989). El contenido de hialuronano en un órgano aumenta en diferentes condiciones de inflamación de ese órgano. Por lo tanto, se ha demostrado una concentración aumentada de hialuronano en tejido de diferentes órganos caracterizado por lesión inmunológica inflamatoria tal como alveolitis (Nettelbladt *et al.*, *Am Rev Resp Dis* 1989; 139: 759-762) e infarto de miocardio (Waldenstrom *et al.*, *J Clin Invest* 1991; 88 (5): 1622-1628). Otros ejemplos son rechazo de aloinjerto después de un trasplante renal (Hallgren *et al.*, *J Exp Med* 1990a; 171: 2063-2076; Wells *et al.*, *Transplantation* 1990; 50: 240-243), de intestino delgado (Wallander *et al.*, *Transplant Int* 1993; 6: 133-137) o cardiaco (Hallgren *et al.*, *J Clin Invest* 1990b; 85:668-673); o una inflamación miocárdica de origen vírico (Waldenstrdm *et al.*, *Eur J Clin Invest* 1993;23:277-282).

La aparición de edemas intersticiales en relación con el injerto de un órgano constituye un grave problema en el campo de la cirugía de trasplantes. Tantos como el 25% de los injertos se hincharán en tal grado que la función se perderá temporalmente. Además, en el 2-3% de los casos, la hinchazón causa ruptura del riñón, dando como resultado una hemorragia masiva.

La sHASEGP puede usarse para degradar los glicosaminoglicanos acumulados en un trasplante de órganos. La eliminación de dichos glicosaminoglicanos promueve la eliminación de agua del injerto y por lo tanto la función del órgano. Puede administrarse una dosis que oscila de 500-10.000 Unidades/kg para reducir la presión intersticial como tal.

Acumulaciones Patológicas de Glicosaminoglicanos en el Cerebro

Los niveles de hialuronano están elevados en varias afecciones patológicas cerebroespinales. Los niveles de hialuronano cerebroespinal son normalmente inferiores a 200 $\mu\text{g/l}$ en adultos (Laurent *et al.*, *Acta Neurol Scand* 1996 Sep; 94 (3): 194-206). Estos niveles pueden elevarse por encima de 8.000 $\mu\text{g/l}$ en enfermedades tales como meningitis, estenosis espinal, lesión craneal e infarto cerebral. Por lo tanto, la administración de sHASEGP por suministro intratecal o inyección sistémica de sHASEGP supersialada puede utilizarse para degradar niveles críticamente elevados de sustrato.

La ausencia de un sistema linfático eficaz en el cerebro también puede conducir a edema potencialmente mortal seguido de traumatismo craneal. La acumulación de hialuronano es un resultado de una síntesis aumentada por HA sintasas y una degradación disminuida. La acumulación de hialuronano sirve al propósito de aumentar el contenido de agua en el tejido dañado para facilitar la extravasación de leucocitos pero puede ser letal. La administración de sHASEGP humana a un paciente que padece un traumatismo craneal puede eliminar por lo tanto la acumulación de hialuronano tisular y el agua asociada con el mismo. La sHASEGP humana puede administrarse por vía intratecal a través de una derivación o, como alternativa, puede administrarse sHASEGP supersialada por vía intravenosa para alcanzar el tejido cerebral.

Después de una isquemia del cerebro como se produce en la apoplejía, el contenido de hialuronano aumenta drásticamente debido a la expresión aumentada de HA sintasas y a un catabolismo disminuido. El fallo de bombas de iones y la filtración de plasma hacia el intersticio da como resultado retención de líquido que no se elimina apropiadamente por los vasos linfáticos dando como resultado necrosis tisular. Algunos grupos han intentado prevenir la acumulación de líquido intersticial después de la isquemia-reperusión por bloqueo de la permeabilidad vascular. Sin embargo, una vez que se ha extravasado el líquido, impedir la permeabilidad vascular puede impedir la resolución del edema y empeorar las afecciones.

La sHASEGP humana también puede usarse en el tratamiento de edema asociado con tumores cerebrales, particularmente los asociados con glioblastoma multiforme. El edema asociado con tumores cerebrales da como resultado la acumulación de hialuronano en las porciones del cerebro adyacente al tumor. La administración de hialuronidasa en los sitios de acumulación de hialuronano (por ejemplo, por inyección intravenosa o a través de una derivación) puede aliviar el edema asociado con dichos tumores malignos por degradación del exceso de hialuronano en estos sitios. Por lo tanto, la hialuronidasa tiene éxito en el tratamiento de tumores cerebrales no sólo en la reducción de la masa tumoral e inhibición del crecimiento tumoral y/o metástasis sino también es útil para aliviar el edema asociado con el tumor maligno. El sHASEGP humana puede administrarse para el tratamiento del edema de una forma similar a la de la administración de hialuronidasa testicular bovina para tratar el edema (véase, por ejemplo, Sa Earp *Arq. Braz. Med.* 44: 217-20).

Tratamiento de la acumulación de glicosaminoglicanos en enfermedades cardiovasculares

Se ha demostrado que la administración de hialuronidasa en modelos animales después de un infarto de miocardio experimental puede reducir el tamaño del infarto (Maclean, *et al Science* 8 Oct 1976; 194 (4261):199-200). El mecanismo propuesto por el que la hialuronidasa bovina reduce el tamaño del infarto en animales es reduciendo la acumulación de hialuronano que se produce después de una isquemia-reperusión. La reducción del tamaño del infarto se piensa que se produce a partir del drenaje linfático aumentado y oxigenación tisular aumentada y reducción del contenido miocár-

dico de agua. Aunque podía obtenerse un tamaño de infarto reducido en modelos animales, no se observaron los beneficios en estudios clínicos más amplios en seres humanos. La hialuronidasa de testículos bovinos posee una semivida en suero notablemente corta de aproximadamente 3 minutos en animales y seres humanos Wolf, *et al.*, J Pharmacol Exp Ther Agosto 1982; 222 (2):331-7. Esta corta semivida se debe a los restos manosa terminales que se reconocen fácilmente por los receptores de fagocitos del sistema reticuloendotelial. Aunque los animales pequeños pueden beneficiarse de hialuronidasa debido a un lecho vascular más pequeño, es necesaria una enzima con una semivida aumentada. La sHASEGP supersialada posee una farmacocinética más favorable debido a la sialación para la que no existe un receptor de fagocito. La sHASEGP supersialada en dosis que oscilan de 100-200.000 Unidades/kg puede utilizarse para facilitar la resolución de un exceso de hialuronano después de la isquemia-reperusión y para reducir el tamaño del infarto.

La sHASEGP supersialada también puede usarse para limitar las placas coronarias de la arterioesclerosis. Dichas placas acumulan glicosaminoglicanos y median la adhesión de macrófagos y células espumosas Kolodgie *et al*, Arterioscler Thromb Vase Biol. 1 Oct 2002; 22 (10): 1642-8. La administración de sHASEGP supersialada puede usarse para reducir la formación de placas Como la administración repetida de hialuronidasa se contempla a dosis de 100-100.000 U/kg, la necesidad de utilizar una proteína recombinante humana con bajo riesgo de inmunogenicidad y una semivida aumentada dará como resultado una reducción superior de las placas.

Tratamiento de necrosis de tejidos periféricos

La necrosis tisular se produce en muchas enfermedades debido a insuficiencia venosa. La ausencia de una oxigenación suficiente es uno de los obstáculos principales para el recrecimiento del tejido. Se ha demostrado que el tratamiento con hialuronidasa intraarterial mejora significativamente el cuadro clínico en pacientes con enfermedad oclusiva arterial periférica (Elder *et al*, Lancet (1980) 648-649). La sHASEGP puede inyectarse por vía intraarterial 3-5 veces a la semana a dosis de 10-200.000 Unidades.

Potenciación de la anestesia

La hialuronidasa obtenida de matadero se usa comúnmente para bloqueo peribulbar en la anestesia local antes de una cirugía oftálmica. La presencia de la enzima evita la necesidad de bloqueos adicionales y acelera el tiempo hasta la aparición de aquinesia (pérdida de movimiento ocular). El bloqueo peribulbar y subtenoniano son las aplicaciones más comunes de la hialuronidasa para procedimiento oftálmicos. Desde la suspensión de Wydase®, se han descrito informes de diplopía y ptosis aumentadas con el bloqueo peribulbar (Brown *et al* J Cataract Refract Surg 1999; 25:1245-9).

Con la suspensión de Wyeth de Wydase®, actualmente se suministra material de hialuronidasa obtenida de testículos bovinos por farmacias de preparación de compuestos. Sin embargo, existen varias preocupaciones acerca del uso de un producto estéril preparado de forma extemporánea <http://www.ashp.org/shortage/hyaluronidase.cfm?cfid=11944667&CFToken=9426953-ref#ref>. Las preparaciones de compuestos preparados no son productos autorizados por la FDA. Como tal, la FDA no tiene control sobre la calidad o uniformidad del proceso de fabricación.

La sHASEGP de 10-500 Unidades puede mezclarse directamente con 5 ml de lidocaína al 2% (Xilocaína), 5 ml de bupivacaína al 0,5% (Marcaína) y opcionalmente con epinefrina 1:200.000. La sHASEGP puede usarse para aumentar la aparición de aquinesia y para eliminar la necesidad de bloqueos adicionales. La sHASEGP también es ideal para la aquinesia para cirugía cosmética en blefaroplastias y estiramientos faciales. También puede utilizarse sHASEGP después de dichos procedimiento quirúrgicos para difundir antiinflamatorios y para reducir la hinchazón tisular.

La sHASEGP también puede mezclarse con una solución tamponante tal como bicarbonato para prevenir molestias durante el procedimiento de inyección. La sHASEGP también puede mezclarse con anestesia para laceraciones para tanto reducir el volumen total de material necesario para inyección como para reducir el dolor de la hinchazón del tejido.

Reducción de la presión intraocular

Un efecto secundario común que se produce en el postoperatorio de pacientes con cataratas es un aumento significativamente temprano y ocasionalmente prolongado en la presión intraocular. Dicha afección a veces es grave, especialmente en pacientes con cambios glaucomatosos en el disco óptico. Aunque el aumento de presión tiende a ser más grave cuando se inyectan agentes viscoelásticos tales como ácido hialurónico en el ojo durante la cirugía, la presión intraocular puede elevarse en el postoperatorio incluso cuando no se utilizan dichos agentes. Además, dicho aumento de presión puede producirse incluso cuando no se usan medicaciones adicionales durante el procedimiento quirúrgico. En algunos casos, es ventajoso dejar un agente viscoelástico en el ojo, que con frecuencia requiere administrar a los pacientes grandes dosis de inhibidores de la anhidrasa carbónica. Estos inhibidores disminuyen la presión intraocular disminuyendo la formación de humor acuoso, un líquido que se secreta normalmente en el ojo, por el cuerpo ciliar. Los métodos actuales para aliviar los aumentos de presión postoperatorios en el ojo incluyen diversos tipos de colirios tales como agentes bloqueantes beta-adrenérgicos, agentes simpaticomiméticos, mióticos, agentes selectivos alfa II, inhibidores de la anhidrasa carbónica y agentes de prostaglandinas.

Un método preferido para eliminar el viscoelástico tal como ácido hialurónico es por inyección de sHASEGP durante o inmediatamente después de procedimientos quirúrgicos del segmento anterior o segmento posterior, aunque también son posibles otros métodos de administración conocidos en la técnica. Se prefiere si el ácido hialurónico y la sHASEGP se administran por inyección en la cámara anterior durante procedimientos quirúrgicos oculares del segmento anterior para permitir que el ácido hialurónico actúe como separador durante el comienzo del procedimiento quirúrgico. En algunos casos de trasplante de córnea, la combinación de ácido hialurónico y sHASEGP puede situarse en la superficie de las estructuras intraoculares antes de suturar el trasplante de córnea en su lugar. Esta combinación también puede usarse en la cirugía del segmento posterior, tal como cirugía de retina o vítreo.

En algunos casos, puede ser aconsejable dejar un agente viscoelástico tal como Healon.TM., Viscoat.TM., u otras sustancias que ocupen espacio en la cámara anterior del ojo a la finalización de la cirugía. Esto es especialmente cierto en un aumento de presión positiva cuando el contenido intraocular tiende a venirse hacia delante y presionar contra la superficie posterior de la córnea. Si esto se produce en un ojo con una lente intraocular sintética en su lugar, la presión sobre el endotelio corneal puede causar un daño significativo en las células y puede producirse un hinchamiento y opacificación corneal posterior que se asocia con una visión disminuida. Típicamente, si la presión intraocular de un paciente se eleva significativamente a la finalización del procedimiento operatorio, es necesario administrar a dicho paciente dosis mayores de inhibidores de la anhidrasa carbónica, así como un colirio tópico tal como beta bloqueantes y agonistas alfa II para disminuir la formación de humor acuoso y/o para aumentar la salida de humor acuoso. Estos agentes tienen todos efectos secundarios significativos y en algunos casos están contraindicados en pacientes con diversos tipos de afecciones médicas, tales como problemas respiratorios, cardiopatías o hipertensión arterial. Sin embargo, el uso de sHASEGP en estas situaciones eliminará la necesidad de administrar a estos pacientes grandes dosis de dichos fármacos.

Además, existe una cantidad significativa de ácido hialurónico en la malla trabecular. La sHASEGP la descompondrá y por lo tanto mejorará la salida de humor acuoso a través de la malla trabecular. La presión intraocular del paciente disminuirá por lo tanto. La combinación de sHASEGP con otros agentes de la cámara anterior, tales como una metilcelulosa (Ocucoat.RTM, por ejemplo, disponible en el mercado en Storz Instrument Co.) usados como separadores y/o agentes protectores en la cirugía de cataratas, también será eficaz para prevenir aumentos significativos de la presión debido a que en efecto abrirán la malla trabecular y permitirán un mayor drenaje de humor acuoso por degradación de una cantidad significativa del ácido hialurónico presente en la malla trabecular.

La eliminación de glicosaminoglicanos a partir de la malla trabecular también es útil para la reducción de la presión intraocular en individuos que padecen un glaucoma de ángulo abierto. La sHASEGP humana puede administrarse por inyección subconjuntival o inyección directamente en la cámara anterior.

Gangliones quísticos

El ganglión quístico (también conocido como ganglión quístico de la muñeca, ganglión quístico de la Biblia o ganglión quístico de tendón dorsal) es la masa de tejido blando más común de la mano. Es un saco relleno de líquido que puede sentirse por debajo de la piel. Habitualmente está unido a una vaina tendinosa (revestimiento que lubrica el tendón) en la mano o muñeca o conectado con una articulación subyacente; sin embargo, algunos no tienen ninguna relación obvia con ninguna estructura. Estos también pueden aparecer en los pies. Con frecuencia aparecen cuando se produce una rotura en los ligamentos subyacentes al revestimiento de tendones o articulaciones y el revestimiento se hernia hacia fuera del defecto ligamentoso causando un bulto bajo la piel. Debido a que con frecuencia está asociado con inflamación, el tejido inflamado produce un líquido tipo gelatina que rellena el saco que sobresale. Pueden ser muy duros debido a una alta presión del líquido tipo mucoso contenido en el interior del quiste y con frecuencia se confunden con una prominencia ósea.

La sHASEGP puede usarse para mejorar los gangliones quísticos. La inyección intralesional de sHASEGP de 5-1000 Unidades, seguida de aspiración con aguja fina eliminará al quiste sin necesidad de cirugía. También pueden inyectarse opcionalmente corticosteroides con la sHASEGP. Puede ser necesaria una inyección adicional para algunos pacientes.

Mixedema

La infiltración de glicosaminoglicanos (GAG) de la piel es una característica del hipertiroidismo, hipotiroidismo, mixedema pretibial, escleromixedema y esclerodema. El ácido hialurónico es el GAG principal en todas las afecciones y en piel normal. Existe una variabilidad histológica mínima de la distribución dérmica de GAG. Las mucinosis cutáneas adquiridas presentan una distribución y composición bioquímica de GAG cutáneos similares. Las diferencias morfológicas en la actividad fibroblástica sugieren que las mucinosis de esclerodema y escleromixedema representan un proceso local mientras que la infiltración de GAG de enfermedades tiroideas puede tener un origen sistémico. Estos trastornos pueden mejorarse con sHASEGP a partir de una vía de administración tanto local como sistémica. Para terapia crónica, puede preverse una sHASEGP PEGilada.

Usos pulmonares de sHASEGP

Los niveles de hialuronano en lavados broncoalveolares (BAL) de individuos normales están generalmente por debajo de 15 ng/ml. Sin embargo, los niveles de BAL aumentan drásticamente en condiciones de dificultad respiratoria (Bjermer Br Med J (Clin Res Ed) 3 Oct 1987; 295 (6602):803-6). En el ARDS, por ejemplo, los niveles de hialuronano pueden aumentar hasta 500 ng/ml mientras que en el pulmón del granjero, los niveles de BAL pueden sobrepasar los 1000 ng/ml (Hallgren *et al* Am Rev Respir Dis. Mar 1989; 139 (3): 682-7), (Larrson *et al* Chest. En 1992; 101 (1): 109-14). El hialuronano aumentado en el pulmón puede impedir la difusión de oxígeno y el intercambio gaseoso, así como la activación de respuestas de neutrófilos y macrófagos.

No son preferibles preparaciones bovinas de hialuronidasa para el tratamiento de dichas afecciones por varias razones. En primer lugar, las preparaciones obtenidas de testículos de matadero de hialuronidasa se sabe que están contaminadas con serina proteasas tales como acrosina. En segundo lugar, la naturaleza extraña de las enzimas bovinas aumenta la probabilidad de una reacción anafiláctica, que podría dar como resultado la muerte del paciente. Por lo tanto, una preparación altamente purificada de sHASEGP humana recombinante puede suministrarse mediante suministro pulmonar o intravenoso. También puede administrarse sHASEGP humana a pacientes que padezcan otras complicaciones pulmonares que estén asociadas con glicosaminoglicanos elevados o para aumentar el suministro de otras moléculas cosuministradas al pulmón.

La invención se describirá ahora en mayor detalle en relación con los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Ensayos de hialuronidasa basados en placa de microtitulación

El siguiente ejemplo proporciona un ensayo rápido para la medición de la actividad hialuronidasa de sHASEGP. Este ensayo puede relacionarse con la TRU, la IU o NFU a través del uso de una preparación patrón de W.H.O. de hialuronidasa.

Ensayo de microtitulación de hialuronano biotinilado

Los grupos carboxilo libres en los restos ácido glucurónico de hialuronano se biotinilan en una reacción de una etapa usando biotina-hidrazida (Pierce), Sulfo NHS (Pierce) y 1-Etildimetilaminopropil-carbodiiimida (Sigma). Este sustrato de HA biotinilado se acopla covalentemente a una placa de microtitulación de 96 pocillos en una segunda reacción. A la finalización de la reacción enzimática, se detecta el sustrato residual con una reacción de avidina-peroxidasa que puede leerse en un lector de placas de ELISA convencional. A medida que el sustrato se une covalentemente a la placa de microtitulación, no se producen artefactos tales como desplazamiento dependiente del pH del sustrato biotinilado. La sensibilidad permite una medición rápida de la actividad hialuronidasa de células cultivadas y muestras biológicas con una variación entre ensayos de menos del 10%.

a. *Protocolo**Preparación de sustrato de HA biotinilado*

Se disolvieron cien mg de HA (Sigma Chemicals) en MES 0,1 M, pH 5,0, a una concentración final de 1 mg/ml y se dejó que se disolvieran durante al menos 24 h a 4°C antes del acoplamiento de biotina. Se añadió sulfo-NHS (Pierce; Rockford IL) a la solución de MES CS04 a una concentración final de 0,184 mg/ml. Se disolvió biotina-hidrazida (Pierce) en DMSO como solución madre de 100 mM y se añadió a la solución de CS04 a una concentración final de 1 mM. Se preparó una solución madre de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) como una solución madre 100 mM en agua destilada y se añadió a la solución de HA-biotina a una concentración final de 30 mM. Se dejó agitar esta solución durante una noche a 4°C. Se eliminó la biotina y la EDAC no unidas por diálisis contra agua con 3 cambios de volumen 1000x de agua. El HA dializado, biotinilado (bHA) se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C durante hasta varios meses.

Se diluyó el sulfo-NHS hasta 0,184 mg/ml en agua con el bHA a una concentración de 0,2 mg/ml y se pipeteó en placas COVALINK-NH de 96 pocillos (NUNC; Placerville NJ) a 50 µl por pocillos. Se diluyó la EDAC hasta 0,123 mg/ml en agua y se pipeteó en las placas COVALINK-NH con la solución de bHA, dando como resultado una concentración final de bHA 10 µg/pocillo y EDAC 6,15 µg/pocillo. Las placas se incubaron durante una noche a 4°C o durante 2 h a 23°C, que dieron resultados comparables. Después de la inmovilización covalente de bCS04 en las placas de microtitulación, la solución de acoplamiento se eliminó por agitación y las placas se lavaron 3 veces en PBS que contenía NaCl 2 M y MgSO₄ 50 mM (Tampón A). Las placas podían almacenarse a 4°C durante hasta una semana.

Las placas COVALINK-NH con bHA inmovilizado se equilibraron con tampón de ensayo 100 µl/pocillo -formato 0,1 M, pH 3,7, NaCl 0,1 M, detergente TRITON X-100 al 1%, sacarolactona 5 mM para hialuronidasa lisosomal; o Hepes 10 mM pH 7,4 con CaCl₂ 1 mM y albúmina sérica humana 1 mg/ml (ICN) para enzimas activas a pH neutro.

ES 2 335 005 T3

Se generó un conjunto de patrones para la calibración de la actividad enzimática frente a “Unidades Reductororas de Turbidez relativa” (rTRU) por dilución de hialuronidasa testicular bovina (Sigma Tipo VI-S) en tampón enzimático neutro de 1,0 a 1×10^{-6} rTRU/pocillo y ensayo de 100 μ l/pocillo por triplicado. Se diluyeron muestras de hialuronidasa activa a pH ácido en tampón de ensayo lisosomal de 1:10 a 1:130.000 se pipetearon por triplicado a 100 μ l/pocillo.
5 Para la mayoría de los ensayos de extractos tisulares y plasma humano, era suficiente una incubación de 30 min a 37°C. Se incluyeron pocillos de control positivo y negativo (sin enzima ni ABC (véase a continuación), respectivamente) por triplicado.

La reacción se interrumpió por adición de 200 μ l/pocillo de Guanidina HCl 6 M seguido de tres lavados de 300
10 μ l/pocillo con PBS, NaCl 2 M, MgSO₄ 50 mM, detergente TWEEN 20 al 0,05% (Tampón B). Se preparó un kit de complejo de avidina-biotina (ABC) (Vector Labs; Burlingame CA) en 10 ml de PBS que contenía detergente TWEEN 20 al 0,1%, que se preincubó durante 30 min a temperatura ambiente durante la incubación. Se añadió la solución ABC (100 μ l/pocillo) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La placa se lavó cinco veces con Tampón B, después se añadió un sustrato de o-fenilendiamina (OPC) a 100 μ l/pocillo por disolución de un comprimido de 10
15 mg de OPD en 10 ml de tampón citrato-PO₄ 0,1 M, pH 5,3 y adición de 7,5 μ l de H₂O₂ al 30%. La placa se incubó en la oscuridad durante 10-15 min, después se leyó usando un filtro de 492 nm en un lector de placas de ELISA (TitertekMultiskan PLUS; ICN) controlado por ordenador usando el programa informático lector de placas Delta Soft II de Biometallics (Princeton NJ). Se generó una curva patrón usando la hialuronidasa testicular bovina mediante un ajuste de curva de cuatro parámetros de la preparación de hialuronidasa comercial y se interpolaron muestras desconocidas por su absorbancia a 492 nm.

Para analizar la dependencia de pH de hialuronidasas, se usa sHASEGP recombinante purificada y hialuronidasa testicular bovina. La dependencia de pH de la actividad enzimática se mide diluyendo sHASEGP purificada o hialuronidasa testicular bovina parcialmente purificada a 0,1 rTRU en los siguientes tampones: formato 50 mM, pH 3-4,5; acetato 50 mM, pH 5-6; MES 50 mM, pH 6-7; o HEPES 50 mM, pH 7-8. Las muestras se ensayaron durante 30 min a 37°C y se expresó la actividad como porcentaje de la actividad máxima. No se usó NaCl en los tampones, ya que puede alterar el pH óptimo de preparaciones de hialuronidasa testicular (Gold, Biochem. J. 205: 69-74, 1982; Gacesa
25 *et al.* Biochem. Soc. Trans. 7: 1287-1289, 1979); las concentraciones salinas fisiológicas (0,15 M) disminuían el pH óptimo aparente, un efecto que era más pronunciado en preparaciones purificadas de la enzima testicular que en la muestra bruta original.
30

b. Resultados

El hialuronano se biotiniló en una reacción de una etapa usando biotina-hidrazida y EDAC. Limitando la EDAC, que acopla los grupos carboxilo libres en el HA con biotina-hidrazida, sólo se marcó una pequeña fracción de los restos de ácido glucurónico totales en HA. Esta cantidad de EDAC (3×10^{-5} M) añadida a HA ($2,8 \times 10^{-3}$ M) da como resultado un máximo de una molécula de biotina-hidrazida acoplada por 93 unidades de disacárido de HA.

Se preparó un ajuste de curva de cuatro parámetros de reacciones patrón de hialuronidasa testicular bovina medidas a pH 3,7 y diluidas de 1,0 a 1×10^{-6} TRU/pocillo. Se establecieron ajustes de curva de cuatro parámetros a partir de la ecuación $y = ((A - D)/(1 + (\text{conc}/C)^B)) + D$, en la que $\log_{10} y = \ln(y'/1-y')$, $y' = (y - D)/(A - D)$, $B = -b/\ln 10$ y $C = \text{EXP}(a/B)$. Los cuatro parámetros (A, B, C, D) se calcularon con un programa informático que utilizaba el algoritmo 2 + 2 con regresión lineal (Rodbard *et al.*, Clin. Chem. 22: 350, 1976). Este ajuste de curva incorpora los aspectos sigmoidales de la curva patrón. La precisión óptima para la medición de una muestra se produce típicamente de 0,001 a 0,01 TRU/pocillo durante una incubación de 30 min. Durante una incubación de 60 min, es detectable 1/1000 de una TRU. También puede utilizarse una curva logarítmica patrón sobre un intervalo más corto de valores para establecer un ajuste de curva patrón. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debería entenderse que la invención como se reivindica no debería limitarse excesivamente a dichas realizaciones específicas.
50

Ejemplo 2

55 Clonación de ADNc de sHASEGP

Puede obtenerse ácido nucleico que codifica sHASEGP humana por un especialista en la técnica a través de varios procedimientos incluyendo, pero sin limitación, síntesis de genes artificiales, RT-PCR e hibridación de genotecas de ADNc (por ejemplo, véase Gmachl *et al* FEBS 336 (3) 1993, Kimmel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 1993 10071-10075). Como alternativa, pueden obtenerse clones que codifican sHASEGP humana de IMAGE u otros proveedores de secuencias génicas humanas (Invitrogen Clon ID IOH10647).
60

Se calculó que el ADNc de PH20 humana de longitud completa tenía una longitud de 2009 nucleótidos y contenía una fase de lectura abierta de 1530 nucleótidos. La UTR 5' es extraordinariamente grande, pudiendo indicar un intrón retenido y puede inhibir la traducción impidiendo que el ribosoma se una al codón metionina de inicio correcto debido a 9 codones de inicio no codificantes en la UTR 5'. Se predice que la proteína (número de Acceso de Genbank NP_003108) comprende la SEC ID N°: 1 de 509 aminoácidos con una masa molecular calculada de 58 kDa.

ES 2 335 005 T3

Para la secuenciación de clones, se escindieron bandas amplificadas por PCR y se eluyeron con el Kit de Extracción en Gel (Qiagen) y se clonaron en los vectores apropiados con extremos compatibles después de digestión de restricción. Se realizaron todas las reacciones de secuenciación en ADN bicatenario con el kit de secuenciación cíclica con terminadores desoxi marcados con colorante con *Taq* (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y procesamiento en un secuenciador automático ABI Prism™ (Applied Biosystems).

La fase de lectura abierta de PH-20 humana se obtuvo por amplificación de una genoteca de ADNc de testículo humano (Clontech, Palo Alto CA) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa usando los cebadores de la SEC ID N°: 14 y SEC ID N°: 47. Se digirieron productos de PCR con *NheI* y *BamHI* y se clonaron en los sitios *NheI* y *BamHI* del vector IRESpuro2 (Clontech).

Ejemplo 4

Aislamiento de sHASEGP a partir de ADNc de pH20 humana

Se generó como se describe a continuación un vector de expresión de sHASEGP humana recombinante secretada catalíticamente activa capaz de una glicosilación eficaz en células de mamífero. Se contemplan otras construcciones de expresión con promotores y genes de selección para diferentes especies tales como células de levaduras e insectos que también son capaces de generar sHASEGP. También pueden usarse genes de selección positiva tales como Glutamina Sintasa o Dihidrofolato Reductasa (DHFR). Los ejemplos proporcionados a continuación no pretenden limitar sino más bien proporcionar un ejemplo de varios sistemas de expresión plasmídica que pueden usarse.

Para construir formas secretadas de sHASEGP, se construyeron mutantes de truncamiento que carecen del extremo C-terminal hidrófobo. Usando un programa de predicción de escisión de GPI se localizó el sitio de escisión del anclaje a GPI alrededor de la posición aminoacídica N 483 en la proteína anclada a GPI de longitud completa. Se usó un conjunto de siete cebadores 3' anidados para construir un conjunto de siete mutantes de delección truncados que carecían del anclaje a GPI predicho, comenzando en la posición Y 482 y deleccionando progresivamente un aminoácido. Estos cebadores se diseñaron para tener sitios *NheI* (5') y *BamHI* (3') compatibles para clonar los mutantes de truncamiento en el vector Irespuro2 sin marcar con un codón de terminación en el cebador 3' o como una proteína marcada con His C-terminal para facilitar la purificación y la detección. Por ejemplo, se usaron cebadores inversos de la SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10 para generar mutantes de delección que terminaban en la posición Y 482, F 481 e I 480 sin un marcador 6 His. Se generaron otros cebadores mutantes con el mismo diseño de bases con las modificaciones apropiadas para incluir y excluir los aminoácidos particulares. Para generar variantes marcadas con His se usó el mismo conjunto de cebadores que para variantes no marcadas excepto por que los cebadores carecen del codón de terminación en los cebadores inversos respectivos, continuando siendo el cebador directo el mismo (para una construcción marcada con His consúltense los cebadores con las SEC ID N°: 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 que son los cebadores inversos sin codón de terminación correspondientes a cebadores inversos no marcados para sus construcciones respectivas). Se usaron cebadores solapantes para construir un espaciador de seis aminoácidos seguido de hexahistidina dentro de sitios *BamHI* y *NotI* en un vector Irespuro2, de modo que se generaron mutantes marcados con His por ligación de los productos amplificados por PCR y digeridos con enzimas de restricción en los sitios *NheI* y *BamHI* en el vector Irespuro2 que contenía el marcador His.

Para identificar si la sHASEGP humana podía modificarse en su extremo carboxi terminal para generar una enzima secretada y activa a pH neutro, se realizaron una serie de truncamientos del sitio de unión a anclaje GPI en el "domino catalítico" predicho basándose en la homología con la enzima de veneno de abeja.

Se usó ADN que codifica el clon anclado a GPI de sHASEGP humana de longitud completa en IRESPuro2 como molde para generar los diversos mutantes de delección truncados. Programas de modelado informático proporcionaron varios sitios de escisión predichos para el polipéptido de longitud completa. Uno de dichos sitios predichos era en la posición aminoacídica N483 (SEC ID N°: 1). Se diseñaron cebadores de PCR para truncar sucesivamente la proteína desde N483 para generar seis mutantes de delección comenzando en Y 482 (que carece de N) y terminando en E 477 (que carece de P).

a. *Protocolo*

Generación de mutante de truncamiento que carece de N483

Se usó el clon de sHASEGP anclado a GPI de longitud completa entre los sitios *NheI* y *BamHI* en pIRESPuro2 como molde. Este molde se amplificó con cebador 5' que contenía un sitio *NheI* que comienza en la Metionina de partida del péptido señal nativo en M 1 (SEC ID N°: 14) y un cebador 3' que contiene un sitio *BamHI* que termina en Y 482 (SEC ID N°: 8). El producto de PCR se procesó en un gel de agarosa al 1% para resolverlo y confirmar la banda amplificada de tamaño correcto, se purificó en gel y se digirió con las enzimas de restricción *NheI* y *BamHI* y se clonó el vector pIRESPuro2 (Clontech) entre los sitios *NheI* y *BamHI* generando un vector de expresión para expresar este mutante de truncamiento de sHASEGP que termina en la posición aminoacídica N482 y que carece del anclaje a GPI con la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 5 para la secuencia del polipéptido resultante de sHASEGP hasta Y 482) y la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 48 - nucleótidos codificantes para polipéptido en la SEC ID N°: 5) según se indica.

ES 2 335 005 T3

Generación de los otros mutantes de truncamiento que carecen de Y 482, F 481, I480, Q 479 y P 478, respectivamente.

5 Se usó la misma estrategia siendo la única diferencia el uso del cebador 3' apropiado para cada mutante. Los cebadores 3' respectivos son los siguientes:

cebador 3' para mutante de sHASEGP que carece de Y 482 - SEC ID N°: 9

10 cebador 3' para mutante que carece de la F 481 - SEC ID N°: 10

cebador 3' para mutante que carece de I 480 - SEC ID N°: 11

cebador 3' para mutante que carece de Q 479 - SEC ID N°: 12

15 cebador 3' para mutante que carece de P 478 - SEC ID N°: 13

Generación de mutantes de delección adicionales para determinar el dominio mínimamente activo de sHASEGP

20 Se generaron delecciones adicionales en bloques de diez a veinte aminoácidos desde el extremo 3' del mutante de truncamiento activo a pH neutro más interno de sHASEGP, que es sHASEGP hasta E 477. El cebador directo con NheI de la SEC ID N°: 14 se usó con un cebador 3' apropiadamente situado para amplificar por PCR un mutante de delección de sHASEGP de la longitud deseada a partir de un extremo carboxi terminal. Por ejemplo, se usó PCR con los cebadores descritos en la SEC ID N°: 14 y SEC ID N°: 26 como los cebadores 5' y 3' respectivamente para generar el polipéptido de la SEC ID N°: 49 cuando se expresaba a partir de una construcción de expresión en vector lresPuro2. De forma similar, se usó PCR con los cebadores 3' inversos descritos en las SEC ID N°: 27, 28, 29, 30, 31 y 32 para generar mutantes de delección que terminan en las posiciones aminoacídicas A 447, S 430, G 413, S 394, A 372 y S 347, respectivamente, de la sHASEGP madura. Los productos de PCR en cada caso se digirieron con las enzimas NheI y BamHI y el producto digerido se clonó en vector plresPuro2 entre los sitios NheI y BamHI. Se ensayaron unos pocos clones independientes en la construcción de expresión final a partir de cada grupo para determinar la actividad de sHASEGP secretada activa a pH neutro por transfección transitoria en células CHO en medios sin suero CD-CHO (Invitrogen, CA) y se retiraron muestras a los puntos temporales indicados para ensayo. Minipreparaciones de ADN preparadas a partir de cultivos de una noche se usaron para transfección con reactivo de transfección Genejuice (Novagen, CA), siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. Se midió la actividad de Hialuronidasa por ensayo de microtitulación como se ha descrito anteriormente.

b. Resultados

40 Se midió la actividad hialuronidasa en mutantes de truncamiento de sHASEGP para identificar el dominio mínimamente activo para la actividad hialuronidasa secretada activa a pH neutro.

AMINOÁCIDO 1 A:	U/ML/24 H PH 7,4
347	0,000
372	0,000
394	0,000
413	0,000
430	0,000
447	0,000
467	0,089
477	0,567
478	0,692
479	0,750
480	0,575
481	0,740
482	0,329

ES 2 335 005 T3

483	0,800
509	0,044

5

Los resultados mostraban que los seis mutantes de delección de un aminoácido que terminaban en los aminoácidos indicados de Y 482 a E 477 proporcionaban una actividad secretada superior que la sHASEGP anclada a GPI.

10

Los resultados también mostraban que las delecciones más allá de A 467 eliminaban cualquier actividad secretada. La actividad secretada a pH neutro de los clones A 467 disminuía en aproximadamente el 10% de la encontrada en los clones P478 o N 483. Por lo tanto, se concluyó que era necesario más del dominio carboxi terminal de la sHASEGP humana para generar el dominio hialuronidasa activo a pH neutro que el previamente asumido a partir de la enzima de veneno de abeja. Las cisteínas en el dominio carboxi terminal por lo tanto son necesarias para la actividad a pH neutro. Por lo tanto, un intervalo muy estrecho que abarcaba aproximadamente 10 aminoácidos antes del sitio de escisión de GPI en N 483 definía el dominio mínimamente activo.

15

Ejemplo 5

20

Efectos de modificación del péptido señal sobre la actividad secretora de sHASEGP

25

La sHASEGP humana posee un péptido líder nativo predicho extraordinariamente largo. Además, la existencia de dos restos cisteína adyacentes en el péptido líder puede conducir a la agregación de multímeros polipeptídicos dentro del retículo endoplásmico durante una expresión de alto nivel y por lo tanto impedir una expresión de alto nivel de una sHASEGP. Por lo tanto, se ensayaron una serie de péptidos líder secretores más eficaces para examinar su capacidad para aumentar el direccionamiento de sHASEGP para secreción.

30

a. Protocolo

35

40

45

50

55

60

65

Se construyó el péptido líder Kappa solapando hibridación de cebadores y PCR de extensión con cebadores que corresponden a las secuencias de las SEC ID N°: 37, 38, 39 y 40. La secuencia kappa amplificada por PCR resultante se amplificó con cebadores flanqueantes que contenían un sitio NheI en el extremo 5' (como se describe en la SEC ID N°: 41) y un sitio EcoRI en el extremo 3' (como se describe en la SEC ID N°: 42). Esto permitía la clonación del péptido líder Kappa (la secuencia polipeptídica es como se describe en la SEC ID N°: 43) en el vector Litmus 39 (NEB) entre los sitios NheI y EcoRI. La sHASEGP tiene un sitio EcoRI interno; por lo tanto, esta construcción kappa entre el sitio NheI y sitio EcoRI se amplificó adicionalmente con un cebador SpeI 5' (como se describe en la SEC ID N°: 44) y un cebador MluI 3' (como se describe en la SEC ID N°: 45). La sHASEGP sin anclaje a GPI que termina en P 478 se eliminó por corte de pResPuro2 con NheI y BamHI y se clonó en un vector Litmus 39 (NEB) en los sitios NheI y BamHI del vector Litmus39. Este vector Litmus que contenía sHASEGP resultante se digirió con las enzimas de restricción SpeI y MluI y se clonó en el mismo la construcción líder kappa amplificada con SpeI y MluI. Se realizó mutagénesis dirigida en este vector Litmus 39 que contenía tanto secuencias Kappa como sHASEGP para generar la fusión en fase de lectura de la secuencia líder Kappa con el polipéptido maduro de sHASEGP. Se usaron pares de cebadores que se corresponden con las SEC ID N°: 34 y 35 para generar el líder kappa con la Asp nativa en el aminoácido terminal fusionada con la F 38 de sHASEGP (hasta P 478) (como se describe en la SEC ID N°: 46 para la secuencia polipeptídica de la proteína de fusión). Otras combinaciones de pares de cebadores tales como los incluidos en la SEC ID N°: 33 con la SEC ID N°: 35 se usaron para generar un líder Kappa que terminaba en la Asp (D) terminal fusionada con L 36 de sHASEGP, los de la SEC ID N°: 33 con SEC ID N°: 36 se usaron para generar líder Kappa que terminaba en la Gly (G) (antes de la Asp (D) terminal) fusionada con L 36 de sHASEGP y los de la SEC ID N°: 34 con SEC ID N°: 36 se usaron para generar un Kappa que terminaba en la Gly (G) (antes de la Asp (D) terminal) fusionada con F 38 de sHASEGP. Las fusiones de Kappa-sHASEGP obtenidas mediante mutagénesis dirigidas se purificaron en gel, se digirieron con enzima DpnI para digerir cualquier ADN parental sobrante y después se digirieron con NheI y BamHI y se clonaron en la cadena principal de HisResPuro2 digerido con NheI/BamHI, que tiene el marcador His (espaciador de seis aminoácidos seguido de seis histidinas) clonado entre los sitios BamHI y NotI en el vector pRES-Puro2. Por lo tanto, tras la ligación se obtiene una construcción que es NheI-kappa-sHASEGP-BamHI-His en pResPuro2. Se obtuvieron cuatro conjuntos de dicha construcción que se corresponderían con las combinaciones de G o D en el extremo del líder Kappa y L36 o F38 en el comienzo de la sHASEGP madura. Unos pocos clones independientes de cada tipo de construcción se usaron para transfectar células CHO en medio CD-CHO (Invitrogen, CA) para ensayar si la secuencia del líder de secreción kappa promovería niveles aumentados de proteína secretada en comparación con el líder de secreción nativo. Minipreparaciones de ADN preparadas a partir de cultivos de una noche se usaron para la transfección con reactivo de transfección Genejuice (Novagen, CA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante y se retiraron muestras para ensayo mediante ensayo de microtitulación en los puntos temporales indicados. Se midió la actividad hialuronidasa mediante ensayo de microtitulación como se ha descrito anteriormente.

Se ensayaron construcciones de fusión de péptido líder de cadena Kappa de IgG de ratón-sHASEGP para ensayar mayores niveles de actividad sHASEGP secretada activa a pH neutro.

b. Resultados

CONSTRUCCIÓN GÉNICA DE sHASEGP HUMANA	U/ML/24 HORAS PH 7,4
Líder Kappa de IgG-sHASEGP AA 38-478HIS6	3,0257
Líder Nativo-sHASEGP AA 1-478 HIS6	0,4857

Los resultados de ensayo enzimático indicaban que el líder Kappa de IgG era capaz de aumentar la secreción de sHASEGP aproximadamente 7 a 8 veces más que el líder de secreción nativo cuando se comparaba con los clones P478, Y 482 o N 483 que carecían de dicho líder. Otras construcciones de líder de kappa con variaciones del sitio de fusión del líder de la Asp o la Gly del líder Kappa a L36 o F38 de sHASEGP también producían niveles aumentados de actividad hialuronidasa secretada activa a pH neutro. Estos ejemplos pretenden ampliar más que limitar el alcance de la invención, ya que pueden utilizarse otras secuencias líder secretoras eficaces con la misma tecnología.

Ejemplo 6

Generación de un vector de expresión de sHASEGP humana

Se generó una sHASEGP sin un marcador epitópico por clonación en un casete de expresión bicistrónico, HZ24 (SEC ID N°: 47). El vector plasmídico HZ24 para la expresión de sHASEGP comprende una cadena principal de vector pCI (Promega), una secuencia de ADN que codifica los aminoácidos 1-482 de hialuronidasa PH20 humana, un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus ECMW (Clontech), y el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón. La cadena principal del vector pCI también incluye un ADN que codifica el gen de resistencia a Beta-lactamasa (AmpR), un origen f1 de replicación, una región potenciadora/promotora temprana inmediata de citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El ADN que codifica la construcción de sHASEGP contenía una secuencia de consenso Kozak en la Metionina del líder señal nativo y un codón de terminación en la Tirosina 482. La construcción resultante pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ-24) da como resultado una sola especie de ARNm dirigida por el promotor de CMV que codifica los aminoácidos 1-482 de PH20 y los aminoácidos 1-187 de la dihidrofolato reductasa separado por el sitio interno de entrada al ribosoma.

La fase de lectura abierta de PH20 humana se amplificó a partir de un clon de ORF de Invitrogen (IOH10647, Invitrogen, Carlsbad CA) con un cebador 5' que introducía un sitio *NheI* y una secuencia de consenso Kozack antes de la Metionina de PH20 y un cebador inverso que introducía un codón de terminación después de la Tirosina 482 e introducía un sitio de restricción *BamHI*. El producto de PCR resultante se ligó en el plásmido pIRESpuro2 (Clontech, Palo Alto, CA) después de la digestión del fragmento de PCR de PH20 con *NheI* y *BamHI*.

Ejemplo 7

Generación de una línea celular que expresa sHASEGP

Se sembraron células CHO DG44 no transfectadas que crecían en medio CD-CHO modificado de GIBCO para células DHFR(-) complementado con Glutamina 4 mM y 18 ml de Plurionic F68/L (Gibco), a $0,5 \times 10^6$ células/ml en un matraz agitador en la preparación para la transfección. Las células se cultivaron a 37°C en un incubador humidificado de CO₂ al 5% con 120 rpm para agitación. Se ensayaron células CHO DG44 no transfectadas en crecimiento exponencial para determinar su viabilidad antes de la transfección.

Se sedimentaron 60.000.000 de células viables del cultivo de células CHO DG44 no transfectadas y se resuspendieron a una densidad de 20.000.000 células en 0,7 ml de tampón de transfección 2x (HeBS 2X = Hepes 40 mM, pH 7,0, NaCl 274 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 1,4 mM, dextrosa 12 mM). A cada alícuota de células resuspendidas, se añadieron 0,09 ml del plásmido HZ24 lineal (250 µg) y las soluciones de células/ADN se transfirieron a cubetas de electroporación BTX (Gentronics) de hueco de 0,4 cm a temperatura ambiente. Se realizó una electroporación de control negativo sin ADN plasmídico mezclado con las células. Las mezclas de células/plásmido se usaron para electroporación con una descarga de capacitor de 330 V y 960 µF o a 350 V y 960 µF.

Las células se retiraron de las cubetas después de la electroporación y se transfirieron a 5 ml de medios CD-CHO modificados para células DHFR(-) complementados con Glutamina 4 mM y 18 ml de Plurionic F68/L (Gibco) y se dejó que crecieran en un pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos sin selección durante 2 días a 37°C en un incubador humidificado de CO₂ al 5%.

Dos días después de la electroporación, se retiraron 0,5 ml de medio de cultivo de tejidos de cada pocillo y se ensayaron para determinar la presencia de actividad hialuronidasa.

ES 2 335 005 T3

Actividad Hialuronidasa Inicial de Células CHO DG44 Transfectadas con HZ24 a las 40 Horas Post-Transfección

5		Dilución	Actividad Unidades/ml
	Transfección 1 a 330V	1 a 10	0,25
	Transfección 2 a 350V	1 a 10	0,52
10	Control Negativo	1 a 10	0,015

Se recogieron células de la transfección 2 (350V) del pocillo de cultivo de tejidos, se realizó un recuento y se diluyeron hasta 10.000 a 20.000 células viables por ml. Se transfirió una alícuota de 0,1 ml de la suspensión celular a cada pocillo de cinco placas de cultivo de tejidos de fondo redondeado de 96 pocillos. Se añadieron 0,1 ml de medios CD-CHO (GIBCO) que contenían Glutamax-1 4 mM y sin complementos de hipoxantina y timidina a los pocillos que contenían células (volumen final de 0,2 ml).

Se identificaron diez clones a partir de las 5 placas cultivadas sin metotrexato.

ID Placa/Pocillo	Actividad Hialuronidasa Relativa
1C3	261
2C2	261
3D3	261
3E5	243
3C6	174
2G8	103
1B9	304
2D9	273
4D10	302
1 E1 1	242
control (+) A1	333
control (-) H12	0

Se expandieron seis clones de HZ24 en cultivo y se transfirieron a matraces agitadores como suspensiones de una sola célula. Los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11 y 4D10 se sembraron en placas de cultivo de tejidos de fondo redondeado de 96 pocillos usando una estrategia de dilución infinita bidimensional. Se cultivaron los clones diluidos en un fondo de 500 células CHO DG44 no transfectadas por pocillo para proporcionar factores de crecimiento necesarios para los días iniciales en cultivo. Se prepararon diez placas por subclón.

El clon 3D3 producía 24 subclones visuales. Se midió la actividad hialuronidasa significativa en los sobrenadantes de 8 de los 24 subclones (> 50 Unidades/ml) y estos 8 subclones se expandieron en matraces de cultivo de tejidos T-25 en presencia de metotrexato 50 nM. El clon 3D3 50 nM se expandió adicionalmente en metotrexato 500 nM dando origen a clones que producían un exceso de 1.000 Unidades/ml en matraces agitadores (clon 3D3 5M).

Ejemplo 8

Producción de sHASEGP

Se descongeló un vial de 3D3 5 M y se expandió desde matraces T a matraces rotativos de 1 l en CHO CDM (Invitrogen, Carlsbad CA) complementado con Metotrexato 100 nM y Glutamax (Invitrogen). Las células se transfirieron de matraces rotativos a un biorreactor de 5 l (Braun) a una densidad de inoculación de $4,0 \times 10^5$ células viables por ml. Los parámetros eran punto de referencia de temperatura, 37°C, pH 7,2 (punto de referencia de partida), con punto de referencia de oxígeno disuelto al 25% y una cubierta de aire de 0-100 cc/min. A las 168 h, se añadieron 250 ml de Medio de Cultivo N° 1 (CD CHO + Glucosa 50 g/l). A las 216 horas, se añadieron 250 ml de Medio de Cultivo N° 2

ES 2 335 005 T3

(CD CHO + Glucosa 50 g/l + Butirato Sódico 10 mM) y a 264 horas se añadieron 250 ml de Medio de Cultivo N° 2. Este proceso daba como resultado una productividad final de 1600 Unidades por ml con una densidad celular máxima de 6 millones de células/ml. Se descubrió que la adición de butirato sódico aumentaba drásticamente la producción de sHASEGP en las fases finales de producción.

5

Cultivo de 3D3-5 M y Producción de sHASEGP, Biorreactor de 5 l

Horas de Procesamiento	Células Viables x 10E5	% Viables	Unidades/ml	Vol (ml)	[Glucosa]	Cultivo
0	4,4	100	0	4500	547	
24	5,7	100	0	4500	536	
48	10,1	100	37	4500	501	
72	17,1	99	62	4500	421	
96	28,6	99	118	4500	325	
120	28,8	99	240	4500	274	
144	60,2	100	423	4500	161	
168	55	100	478	4500	92	250 ml Cultivo N° 1
192	66,6	98	512	4750	370	
216	55,2	92	610	4750	573	250 ml Cultivo N° 2
240	53	88	710	5000	573	
264	49,8	84	852	5000	474	250 ml Cultivo N° 2
288	40	70	985	5250	770	
312	31	61	1467	5250	773	
336	25,4	52	1676	5250	690	

50

Ejemplo 9

Purificación de sHASEGP

55

Se aclararon medios acondicionados del clon 3D3 por filtración en profundidad y diafiltración de flujo tangencial en Hepes 10 mM a pH 7,0. Después se purificó HASEGP soluble por cromatografía secuencial en intercambio iónico en Q Sefarosa (Pharmacia), cromatografía de interacción hidrófoba en Fenil Sefarosa (Pharmacia), cromatografía de fenil boronato (Prometics) e Hidroxiapatita (Biorad, Richmond, CA).

60

La sHASEGP se unía a la Q Sefarosa y se eluía a NaCl 400 mM en el mismo tampón. El eluido se diluyó con sulfato de amonio 2 M a una concentración final de ASO4 500 mM y se pasó a través de una columna de Fenil Sefarosa (low sub), seguido de unión en las mismas condiciones a una resina de fenil boronato. La sHASEGP se eluyó de la resina de fenil sefarosa en Hepes pH 6,9 después de lavar a pH 9,0 en bicina 50 mM sin ASO4. El eluido se cargó en una resina de hidroxiapatita cerámica a pH 6,9 en PO4 5 mM, CaCl2 1 mM y se eluyó con PO4 80 mM pH 7,4 con CaCl2 0,1 mM.

65

La sHASEGP purificada resultante poseía una actividad específica en exceso de 65.000 Unidades USP/mg de proteína por medio del ensayo de microturbidez usando el patrón de referencia USP. La sHASEGP purificada se eluía

ES 2 335 005 T3

como un solo pico de 24 a 26 minutos a partir de una columna de divinilbenceno de estireno 5RPC de Pharmacia con un gradiente entre TFA al 0,1%/H₂O y TFA al 0,1%/acetonitrilo al 90%/H₂O al 10% y se resolvió como una sola banda ancha de 61 kDa mediante electroforesis en SDS que se reducía a una banda estrecha de 51 kDa tras el tratamiento con PNGASA-F. La secuenciación de aminoácidos N-terminal puso de manifiesto que el péptido líder se había eliminado eficazmente.

Secuencia de Aminoácidos N-terminal de sHASEGP purificada bioquímicamente

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Teórica	Leu	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn
Observada	-	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn

Ejemplo 10

Análisis de glicosilación de sHASEGP obtenida de CHO DG44

Existen datos contradictorios en lo que se refiere a si sHASEGP de diferentes especies requieren glicosilación para su actividad catalítica. Por ejemplo, se describe que la hialuronidasa de veneno de abeja enzimáticamente activa puede sintetizarse en células que carecen de la maquinaria de glicosilación, es decir, tales como *E. coli*. Además, el tratamiento de hialuronidasa de testículos bovinos purificada con PNGasa no inactivaba la actividad enzimática (Yamagata *et al* 1997). Otros estudios describen pérdida de actividad después de la desglicosilación y que son necesarios adicionalmente enlaces disulfuro.

Puesto que todos estos ensayos previos se realizaron usando preparaciones brutas o parcialmente purificadas, no era evidente no obstante si la pérdida de actividad era el resultado de la exposición de enzima desglicosilada a proteasas contaminantes en las preparaciones brutas o una relación funcional directa entre glicosilación y actividad catalítica.

a. Protocolo

Para determinar si podía introducirse glicosilación ligada a N funcional en sHASEGP humana usando un sistema de expresión basado en CHO en condiciones sin proteína, se expresó un ADNc que codifica sHASEGP humana-HIS6 en células CHO usando un casete bicistrónico IRESpuro en medios definidos químicamente. Se cultivaron las células durante 72 horas en CHO CDM (Invitrogen/Gibco) seguido de concentración y diafiltración de flujo tangencial en una unidad Pellicon TFF (Millipore) con membranas de punto de corte de 30 kDa. El concentrado se intercambió con Hepes 10 mM pH 7,4 NaCl 50 mM. Después, el diafiltrado se cargó en una resina de sefarsa de corriente sin turbulencia de DEAE y se eluyó con un gradiente de NaCl de NaCl 0-1 M en una resina FPLC de Pharmacia. Se eluyó la sHASEGP humana entre NaCl 10-30%. Los niveles de sHASEGP en fracciones de columna determinaron que la mayoría de la enzima se recuperaba en el gradiente de NaCl al 10-30%. La enzima del gradiente de NaCl al 10-30% se purificó después adicionalmente mediante cromatografía de afinidad en una resina IMAC cargada con Ni. Se eluyó la sHASEGP humana a partir de la resina IMAC después de lavar con Imidizol 10 mM con Acetato 50 mM a pH 5,0. La proteína se concentró y se dializó contra Hepes 10 mM a pH 7,4. Se determinó que la enzima altamente purificada poseía una actividad específica de 97.000 Unidades/mg de proteína en presencia de Calcio 1 mM y HSA 1 mg/ml en el ensayo de microtitulación de sustrato biotinilado basado en ELISA.

Para detectar cambios en la masa molecular relativa de proteína, se trató sHASEGP humana purificada con PNGASA o Neuraminidasa durante una noche seguido de electroforesis en gel, electrotransferencia y análisis de transferencia de western con un anticuerpo monoclonal anti-His6 unido a HRP (Qiagen) y detección con ECL.

b. Resultados

El análisis de transferencia de Western determinó que la sHASEGP humana producida en células CHO era sensible a tratamiento con PNGASA. La masa molecular relativa de sHASEGP humana ponía de manifiesto que la proteína estaba altamente glicosilada. Tras una digestión completa durante una noche con PNGASA, la sHASEGP humana se reducía a una sola especie, confirmando que una ligera heterogeneidad de la banda sin digerir podría atribuirse a restos de azúcares ligados a N. La digestión parcial con PNGasaF mostraba una serie de intermedios que se desplazaban desde sin tratamiento y se desplazaban progresivamente con un tratamiento más prolongado. Aunque las bandas eran algo difusas en un gel al 7%, podían visualizarse al menos 6 isoformas intermedias diferentes.

El tratamiento de sHASEGP con Neuraminidasa puso de manifiesto que las células CHO eran de hecho capaces de sintetizar sHASEGP humana sialada. Tras el tratamiento con neuraminidasa y el análisis de transferencia de Western

ES 2 335 005 T3

de sHASEGP en Geles al 7%, la sHASEGP recombinante humana obtenida de CHO puso de manifiesto un desplazamiento de aproximadamente 1-3 kDa en la motilidad en comparación con sHASEGP sin tratar. Este es por lo tanto el primer informe de la generación de una sHASEGP humana sustancialmente sialada. Esto es muy valioso tanto para la estabilidad como para aumentar la semivida en suero de una sHASEGP humana, ya que la sHASEGP de esperma nativa de muchas especies carece de sialación y no reacciona con lectinas específicas de ácido siálico.

Análisis FACE de sHASEGP

El análisis de oligosacáridos de sHASEGP activa mediante análisis FACE permite una determinación rápida de perfiles de sHASEGP catalíticamente activas.

Protocolo

Se evaluó hialuronidasa purificada a partir del clon 3D3 5M usando Generación de perfiles de oligosacáridos ligados a N FACE® (Prozyme). Los oligosacáridos se escindieron a partir de 128,7 µg de glicoproteínas mediante digestión enzimática con N-Glicanasa (también conocida como PNGasa), se marcaron usando el fluoróforo ANTS y se separaron mediante electroforesis. Las posiciones relativas de las bandas de oligosacáridos se determinaron procesando la muestra y diluciones de la muestra al lado de una escalera de patrón de oligosacáridos que designaba la distancia de migración en unidades de Grado de Polimerización (DP).

Resultados

El Perfil N para la muestra de hialuronidasa consiste en diez bandas de las que seis (que se procesan al mismo tiempo que las bandas de patrón de oligosacáridos G5-G12) tienen intensidades superiores al 9%. Además, la banda que corre al lado del patrón G9 era la más intensa con intensidades del 35%-46%.

sHAS

Análisis de oligosacáridos de EGP

Oligosacárido de sHASEGP	Grado de Polimerización	Porcentaje Total
1	15,64	1,2
2	13,68	3,4
3	11,61	10,0
4	10,04	10,4
5	8,37	35,4
6	7,32	9,7
7	6,14	9,0
8	5,57	12,4
9	3,84	2,3
10	3,26	0,5

Ejemplo 11

Dependencia de glicosilación ligada a N de sHASEGP para la actividad enzimática

a. Protocolo

Se mezclaron muestras de HIS6-sHASEGP purificada con tampón que contenía Neuraminidasa y PNGASA con y sin Octilglucósido 50 mM durante una noche a 37°C. Se verificó que se habían eliminado los oligosacáridos mediante desplazamiento en gel a partir de análisis de transferencia de Western.

b. Resultados

MUESTRA	U/ML
Sin reacción	22,01
Neuraminidasa durante una noche (O/N) OG 50 mM	23,57
PNGasaF con OG 50 mM	0,0
PNGasaF sin OG 50 mM durante una noche (o/n)	10,74

Ejemplo 12

Actividad de sHASEGP hacia glicosaminoglicanos sulfatados y no sulfatados

Además del ensayo basado en microtitulación usando HA, la especificidad de sustrato de sHASEGP hacia otros glicosaminoglicanos o proteoglicanos puede ensayarse usando un ensayo de desplazamiento en gel con sustratos purificados para determinar la actividad de sHASEGP hacia otros glicosaminoglicanos. Muchos ensayos de hialuronidasa se han basado en la medición de la generación de nuevos grupos N-acetilamino reductores (Bonner y Cantey, Clin. Chim. Acta 13: 746-752, 1966) o pérdida de viscosidad (De Saegui *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 121:548-554, 1967) o turbidez (Dorfman y Ott, J. Biol. Chem. 172: 367,1948). Con sustratos purificados todos estos métodos son suficientes para la determinación de la presencia o ausencia de actividad endoglucosamídica.

a. Protocolo

Ensayo de desplazamiento en gel - Se mezclan sustratos purificados con sHASEGP recombinante para ensayar para actividad endoglucosidasa que da origen a una motilidad aumentada en el sustrato dentro del gel. El Sulfato de Condrotina A, Agrecano y D eran de Calbiochem. El Hialuronano (Cordón Umbilical Humano), Sulfato de Condrotina C, Sulfato de Dermatan y Sulfato de Heparán se obtuvieron de Calbiochem. El hialuronano de cordón umbilical humano se obtuvo en ICN. Cada sustrato de ensayo se diluye a 0,1 mg/ml. Muestras de 10 μ l de sHASEGP purificada o medios acondicionados de células que expresan sHASEGP se mezclan también con 90 μ l de sustrato de ensayo en tampón deseado y se incuban durante 3 horas a 37°C. Después de la incubación las muestras se neutralizan con tampón de muestras (Tris EDTA pH 8,0, Azul de Bromofenol y glicerol) seguido de electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%. Se detectaron glicosaminoglicanos por tinción de los geles en Azul Alcian al 0,5% en Ácido Acético Glacial al 3% durante una noche seguido de desteñido en Ácido Acético Glacial al 7%. La degradación se determina por comparación de la motilidad de sustrato en presencia o ausencia de enzima.

b. Resultados

Se incubaron 10 Unidades de sHASEGP_{HIS6} en 10 μ l con 90 μ l de Tampón Hepes 10 mM con Albúmina Sérica Humana 50 μ g/ml durante 2 horas a 37°C que contenía 10 μ g de diversos glicosaminoglicanos y proteoglicanos. El análisis electroforético seguido de tinción con azul Alcian puso de manifiesto desplazamientos de la motilidad aumentados para una sola especie en Sulfato de Condrotina A, C y D, Agrecano y Hialuronano pero no Sulfato de Heparán ni Sulfato de Condrotina B. Mientras que los glicosaminoglicanos no digeridos corrían como una mancha en la mitad del gel, los productos digeridos mostraban que la mayoría de la tinción con azul alcian corría en el frente del colorante, corriendo una pequeña cantidad de material como una esclarea gradual.

Ejemplo 13

Efectos de iones metálicos sobre la activación de sHASEGP

Además de la necesidad de glicosilación para una actividad enzimática óptima, se descubrió que la sHASEGP humana se activaba con cationes para una actividad enzimática óptima. En el proceso de purificación, se descubrió que la sHASEGP tenía una baja actividad específica después de etapas de cromatografía sucesivas. Se descubrió que la sHASEGP marcada con HIS6 tenía una actividad específica muy baja cuando se purificaba hasta la homogeneidad a partir de DEAE seguido de purificaciones en Ni-IMAC sucesivas. Puestos que las resinas IMAC pueden quelar iones metálicos, se añadieron diversos metales de nuevo a la sHASEGP para determinar la actividad enzimática relativa.

ES 2 335 005 T3

a. Protocolo

Se ensayó sHASEGP purificada después de la incubación con níquel (Ni), Cobalto (Co), Zinc (Zn) Calcio (Ca) y Magnesio (Mg) 0,1 mM durante 2 horas a temperatura ambiente seguido de determinación de actividad hialuronidasa en un ensayo basado en microtitulación.

b. Resultados

Aditivo de Sal Metálica	Actividad Neutra U/ml
SIN ADITIVOS	11, 909
Ni 100 μ M	6,0306
Co 100 μ M	8,972
Zn 100 μ M	3,7476
Ca 100 μ M	101,9892

Se descubrió un aumento significativo en la actividad hialuronidasa después de la incubación de sHASEGP con Calcio 0,1 mM o Magnesio 0,1 mM. No se descubrió dicha activación después de la incubación con otros metales. La adición de Calcio a sHASEGP aumentaba la actividad específica de la enzima hasta aproximadamente 97.000 unidades por miligramo de proteína basándose en la medición a A280. Después se ensayó una curva de respuesta a la dosis de metales de Calcio y Magnesio para determinar la concentración óptima de iones metálicos respecto a enzima.

mM Metal Divalente	[Ca ⁺⁺]	[Mg ⁺⁺]
100	1	1, 3
10	108	104
1	169	164
0,1	123	78
0,01	59	18
0,001	47	13
0,0001	39	13
0,00001	55	15

Se descubrió que la activación de sHASEGP se producía en el intervalo micromolar. Las concentraciones por encima de 10 mM eran inhibitoras tanto para el Calcio como para el Magnesio. Para descartar la activación inespecífica de sustrato más que de enzima, se incubó Cloruro Cálcico en tampón Hepes 10 mM con el sustrato biotinilado inmovilizado en la placa de microtitulación seguido de lavado. No se descubrió activación cuando se añadía la enzima a la placa preincubada con Calcio que se había lavado. La activación también se ensayó sobre sHASEGP nativa liberada por fosfolipasa C que puso de manifiesto una activación similar con Calcio, descartando un artefacto del marcador epitópico HIS6 carboxi terminal.

60 Ejemplo 14

Efectos de la albúmina sobre la actividad de sHASEGP

Se descubrió que la dilución de rHUPH20 recombinante y otras preparaciones de hialuronidasas obtenidas de testículos de matadero necesitaban albúmina además de Calcio para una actividad óptima.

ES 2 335 005 T3

a. Protocolo

Se diluyó Albúmina Sérica Humana (ICN) en tampón Hepes 10 mM con Calcio para determinar los efectos de la proteína albúmina sobre la actividad enzimática. Se examinaron ensayos enzimáticos con sHASEGP y preparaciones comerciales usando tanto CaCl₂ 1 mM como Albúmina Sérica Humana 1 mg/ml.

b. Resultados

Activación de actividad hialuronidasa se descubrió a altas diluciones en presencia de albúmina. No estaba claro si esta actividad era el resultado de impedir la desnaturalización o si de que la albúmina afectaba a la disponibilidad del sustrato. Una formulación preferible de sHASEGP humana podría incluir por lo tanto Albúmina y una sal metálica que consiste en Calcio o Magnesio.

15 Ejemplo 15

Actividad de propagación de sHASEGP purificada *in vivo*

20 a. Protocolo

Se diluyó sHASEGP purificada en Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Pluronic al 0,1% hasta 0,5 U/ μ l en agua apirógena con NaCl 0,15 M. Se realizaron una serie de diluciones en 20 μ l finales de solución salina para dar un total de 0,01, 0,05, 0,1 Unidades por inyección. Se añadieron 20 μ l de solución de Tripán Azul a un volumen final de 40 μ l y se inyectaron por vía subcutánea en la piel lateral a cada lado de ratones balb^{Nu/Nu} que se habían anestesiado previamente i. p. mediante administración de ketamina/xilacina. Se midieron las áreas con colorante en 2 dimensiones con un microcalibrador de t = 0 a t = 45 min. El área se representó como mm². Como control se incluyó HYAL1 humana recombinante que carece de actividad a pH neutro pero se secreta.

30 b. Resultados

ARTÍCULO DE ENSAYO	ÁREA CON COLORANTE A 45 MIN
A. Control de Solución Salina	51,5 mm ²
B. sHASEGP 0,01 U	76,8 mm ²
C. sHASEGP 0,05 U	98,22 mm ²
D. sHASEGP 0,10 U	180,4 mm ²
E. HYAL1 100 U	67,48 mm ²

45 Ejemplo 16

Cinética de la actividad de difusión de sHASEGP

50 a. Protocolo

Se separó sHASEGP_{His6} purificada recombinante en 2 alícuotas. Una se calentó a 95°C durante 15 minutos en un termociclador con una tapa calentada. La otra permaneció a temperatura ambiente. Se verificó la inactivación térmica de la actividad enzimática en el ensayo enzimático basado en microtitulación. Para el análisis cinético se ensayó material inactivado por calor frente al nativo. Se inyectaron 4 Unidades de sHASEGP purificada o material inactivado por calor equivalente por vía subcutánea con colorante tripán azul. Se ensayaron las áreas a diversos puntos temporales hasta 15 minutos.

60

65

b. Resultados

4 UNIDADES	4 UNIDADES INACTIVADAS POR CALOR
$t_{\text{minutos postinyección}}$	$t_{\text{minutos postinyección}}$
$t_0 = 52,38$	$t_0 = 50,58$
$t_3 = 116,51$	$T_3 = 65,48$
$t_{6,5} = 181,93$	$T_{6,5} = 63,87$
$t_{10} = 216,96$	$T_{10} = 65,80$
$t_{16} = 279,99$	$T_{16} = 74,3$

Ejemplo 17

Restauración de la barrera dérmica descompuesta por sHASEGP

a. Protocolo

Para establecer el tiempo de regeneración de los poros abiertos con sHASEGP después de la administración subcutánea, se inyectaron 2 Unidades de sHASEGP purificada o control de solución salina en dos sitios laterales opuestos por vía subcutánea en animales a $t = 0$, seguido de inyección con tripán azul en el mismo sitio a 30 min, 60 min y 24 horas. Se registró el área de difusión del colorante a $t = 15$ minutos postinyección para cada punto temporal en comparación con el control.

b. Resultados

2 UNIDADES	CONTROL DE SOLUCIÓN SALINA
$T_{\text{horas postinyección de sHASEGP}}$	$t_{\text{horas postinyección de sHASEGP}}$
$t_{0,5 h} = 183$	$t_{0,5 h} = 54$
$t_{1 h} = 167$	$t_{1 h} = 50$
$t_{22h} = 61$	$t_{22 h} = 48$

Los dos resultados demuestran que la barrera dérmica se reconstituye a las 24 horas de la administración de 2 Unidades de enzima.

Ejemplo 18

Determinación del tamaño de los canales abiertos por sHASEGP

Se demostró que los canales abiertos por sHASEGP humana en el espacio intersticial son suficientes para permitir la difusión de una pequeña molécula, es decir, colorante tripán azul. Sin embargo, se desconocía cuáles eran los límites superiores en el tamaño de partículas que podían difundir en presencia de sHASEGP.

a. Protocolo

Se usaron moléculas fluorescentes de tamaños variables para determinar el tamaño de los canales abiertos por la sHASEGP humana. Dextranos tratados con Fluoresceína de un Peso Molecular Promedio de 4.400 y 2 millones de Da (Sigma) así como perlas marcadas con fluoresceína de diámetros definidos de 20 nanómetros a 500 nanómetros (Molecular Probes), se administraron por vía subcutánea en un volumen de $40 \mu\text{l}$, siguiendo la inyección de sHASEGP o control de solución salina en los mismos sitios. Después se midió el área del frente de colorante en dos dimensiones a 15 minutos postinyección.

ES 2 335 005 T3

b. Resultados

Agente de Difusión	Tamaño de Partícula de Ensayo de Difusión	Área a 15 min	Desv. Típ.
sHASEGP	4400 Da	84,2	25,7
Control	4400 Da	38,0	5,8
sHASEGP	2 x 10E6Da	141,2	4,5
Control	2 x 10E6Da	51,7	8,1
sHASEGP	20nm de Diámetro	92,3	20,6
Control	20nm de Diámetro	51,6	3,0
sHASEGP	100nm de Diámetro	61,0	5,7
Control	100nm de Diámetro	40,0	7,0
sHASEGP	200nm de Diámetro	35,5	1,6
Control	200nm de Diámetro	27,9	8,2
sHASEGP	500nm de Diámetro	44,8	13,6
Control	500nm de Diámetro	41,2	9,8

Los resultados demostraron que las moléculas de aproximadamente 1 kDa (Tripán Azul) a 50 nm de diámetro (Perlas de Látex) mostraban una difusión aumentada después de la administración de sHASEGP. Mientras que la albúmina sérica bovina (66 kDa) mostraba una cinética similar de difusión al tripán azul, las perlas de látex de 50 nm requerían un tiempo significativamente mayor para difundir. Las perlas de 500 nm no mostraban difusión hasta 480 minutos.

Ejemplo 19

Perfiles farmacocinéticos en suero de anticuerpos biotinilados después de la coinyección subcutánea de sHASEGP humana

a. Protocolo

Se anestesiaron ratones Balb/c hembra con una mezcla de quetamina/xilacina. Después a los ratones se les inyectó por vía subcutánea 20 μ l de una solución 0,5 mg/ml de IgG de ratón biotinilada mezclada con 20 μ l de solución salina o 20 μ l de sHASEGP que contenía 4 Unidades de actividad.

b. Resultados

TIEMPO POSTINYECCIÓN	CONTROL	sHASEGP (4U)
IgG Sérica t = 0 h	0 ng/ml	0 ng/ml
IgG Sérica t = 2 h	0 ng/ml	360 ng/ml
IgG Sérica t = 51 h	4152 ng/ml	4176 ng/ml

Los resultados demuestran que la sHASEGP aumenta la cinética de distribución sérica de moléculas de gran tamaño en circulación. Cuando no se podía detectar IgG biotinilada en el grupo de control a las 2 horas, eran evidentes 360 ng/ml a las 2 horas en el grupo de sHASEGP.

ES 2 335 005 T3

Ejemplo 20

Actividad de propagación de moléculas inyectadas por vía subcutánea después de la inyección intravenosa de sHASEGP humana

5

a. Protocolo

Se utilizaron cuatro sitios para la inyección de colorante por dosis de cada artículo de ensayo y control de vehículo. La inyección de colorante era 45 minutos después de la inyección i. v.. Cada dosis de artículo de ensayo o de control se inyectó i. v. en 2 animales. La medición del área del frente de colorante después de 45 minutos de la administración de enzima se calculó a los 2,5, 5, 10 y 15 minutos para cada dosis o control de vehículo.

10

b. Resultados

15

Los resultados demostraban que la sHASEGP altamente purificada estaba disponible por vía sistémica para tejidos distales tras la administración intravenosa. La actividad de propagación de sHASEGP administrada por vía sistémica era dependiente de dosis, siendo una inyección de 10 unidades indistinguible del control de vehículo.

20

Tipo	Dosis IV	Tiempo Minutos	Área Media (mm ²)	DT
PH20	1000	2,5	86,417	2,834193
PH20	1000	5	102,17	2,221146
PH20	1000	10	124,53	6,304944
PH20	1000	15	129,81	1,434319
PH20	300	2,5	59,137	7,218615
PH20	300	5	73,638	7,51197
PH20	300	10	87,092	8,686008
PH20	300	15	92,337	10,66466
PH20	100	2,5	56,308	7,741934
PH20	100	5	63,156	11,42052
PH20	100	10	76,519	16,18449
PH20	100	15	77,432	17,32264
PH20	30	2,5	50,534	10,64287
PH20	30	5	59,493	5,163971
PH20	30	10	68,102	11,00071
PH20	30	15	71,118	9,934212
PH20	10	2,5	36,4	3,807072
PH20	10	5	39,859	6,680932
PH20	10	10	45,649	4,44936
PH20	10	15	48,41	6,546835
Control 0		2,5	34,652	5,935037
Control 0		5	36,279	3,614544
Control 0		10	44,687	5,821216
Control 0		15	53,002	2,812439

65

REIVINDICACIONES

1. Una glicoproteína sustancialmente purificada que comprende un polipéptido hialuronidasa soluble activo a pH
5 neutro que contiene al menos un resto azúcar ligado a N, en el que:

el resto azúcar ligado a N está unido covalentemente a un resto asparagina del polipéptido;

la glicoproteína sustancialmente purificada comprende una secuencia de aminoácidos incluida en la SEC ID N°: 1
10 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 91% con una
secuencia de aminoácidos incluida en la SEC ID N°: 1; y

la glicoproteína sustancialmente purificada es soluble.

15 2. Una glicoproteína sustancialmente purificada de la reivindicación 1, en la que el polipéptido está codificado por
una molécula de ácido nucleico que codifica los aminoácidos 36-482 de la SEC ID N°: 1 o los aminoácidos 1-482 de
la SEC ID N°: 1.

20 3. La glicoproteína sustancialmente purificada de la reivindicación 2, en la que la molécula de ácido nucleico tiene
una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 48.

4. La glicoproteína sustancialmente purificada de la reivindicación 1, en la que el polipéptido incluye una secuencia
de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1 que está truncada en un resto aminoacídico que es o está entre los restos
25 aminoacídicos 467 y 483.

5. La glicoproteína sustancialmente purificada de la reivindicación 1, en la que el polipéptido incluye una secuencia
de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1 que está truncada en un resto aminoacídico seleccionado de entre 467,
477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483.

30 6. La glicoproteína sustancialmente purificada de la reivindicación 5, en la que el polipéptido se secreta en células
CHO.

7. Una glicoproteína sustancialmente purificada de la reivindicación 1, en la que el polipéptido está modificado
35 con un polímero.

8. Una glicoproteína sustancialmente purificada de la reivindicación 7, en la que el polímero es PEG o dextrano.

9. Un método para producir una glicoproteína sustancialmente purificada de la reivindicación 1, que comprende:
40 introducir un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la reivindicación 1 unido operativamente a un promotor
adecuado en una célula capaz de incorporar restos de azúcares ligados a N en el polipéptido;

45 cultivar la célula en condiciones por las que se exprese un polipéptido codificado por la célula; y

recuperar el polipéptido o polipéptidos expresados.

10. El método de la reivindicación 9, en el que la célula es una célula CHO.

50 11. Una composición farmacéutica que comprende una glicoproteína de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que el polipéptido se produce por expresión en
células de mamífero de una molécula de ácido nucleico que codifica los aminoácidos 1-482 de la SEC ID N°: 1 o una
55 molécula de ácido nucleico que codifica los aminoácidos 36-482 de la SEC ID N°: 1.

13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en la que la célula de mamífero es una célula CHO.

60 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, que comprende además un agente farmacéuticamente
activo.

15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en la que el agente farmacéuticamente activo se selec-
ciona de entre un agente quimioterápico, un agente analgésico, un agente antiinflamatorio, un agente antimicrobiano,
un agente amebicida, un agente tricomonocida, un agente antiparkinsoniano, un agente antimalárico, un agente anticon-
65 vulsivante, un agente antidepresor, un agente antiartrítico, un agente antifúngico, un agente antihipertensor, un agente
antipirético, un agente antiparasitario, un agente antihistamínico, un agente agonista alfa-adrenérgico, un agente alfa-
bloqueante, un agente anestésico, un agente broncodilatador, un agente biocida, un agente bactericida, un agente bacte-
riostático, un agente bloqueante beta-adrenérgico, un agente bloqueante de canales de calcio, un agente farmacológico

ES 2 335 005 T3

cardiovascular, un agente anticonceptivo, un agente descongestivante, un agente diurético, un agente depresor, un agente de diagnóstico, un agente electrolítico, un agente hipnótico, un agente hormonal, un agente hiperglucemiante, un agente relajante muscular, un agente de contracción muscular, un agente oftálmico, un agente parasimpaticomimético, un agente energizante psíquico, un agente sedante, un agente simpaticomimético, un agente tranquilizante, un agente urinario, un agente vaginal, un agente viricida, un agente vitamínico, un agente antiinflamatorio no esteroideo, un agente inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un polipéptido, una proteína, un ácido nucleico, un fármaco, una molécula orgánica o un inductor del sueño.

16. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en la que el agente farmacéuticamente activo se selecciona de entre insulina, una citocina, un anticuerpo y un anticuerpo monoclonal.

17. Un conjugado que comprende una glicoproteína soluble de la reivindicación 1 o que comprende un dominio de una proteína soluble de la reivindicación 1.

18. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 11-16 para el uso en el tratamiento de un exceso de glicosaminoglicanos; para tratar un tumor; para tratar un trastorno cardiovascular; para aumentar la penetración de agentes quimioterápicos en tumores sólidos; para el uso en la inducción de licuefacción del humor vítreo; para el uso en el suministro de una molécula de menos de 500 nm de tamaño a un tejido que contenga cantidades excesivas de glicosaminoglicanos.

19. Uso de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 11-16 en la formulación de un medicamento para tratar un exceso de glicosaminoglicanos; para tratar un trastorno cardiovascular; para aumentar la penetración de agentes quimioterápicos en tumores sólidos; para el uso en la inducción de licuefacción del humor vítreo; o para el uso en el suministro de una molécula menor de 500 nm de tamaño a un tejido que contenga cantidades excesivas de glicosaminoglicanos

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 335 005 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> DeliaTroph Pharmaceuticals, Inc.
 Frost, Gregory
 5 Kundu, Anirban
 Bookbinder, Louis
- <120> GLICOPROTEÍNA HILAUROINIDASA SOLUBLE (sHASEGP), PROCESO PARA PREPARARLA, USOS
 10 Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LA COMPRENDEN
- <130> DELIA1340WO
- 15 <150> US 60/452.360
 <151> 05-03-2003
- <160> 53
- 20 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
- 25 <211> 509
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
- 30 <220>
 <221> CARBOHID
 <222> 82, 166, 235, 254, 368, 393, 490
- 35 <400> 1

	Met	Gly	Val	Leu	Lys	Phe	Lys	His	Ile	Phe	Phe	Arg	Ser	Phe	Val	Lys
	1				5					10					15	
	Ser	Ser	Gly	Val	Ser	Gln	Ile	Val	Phe	Thr	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Cys
40				20					25					30		
	Cys	Leu	Thr	Leu	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn	Val	Pro
			35					40					45			
	Phe	Leu	Trp	Ala	Trp	Asn	Ala	Pro	Ser	Glu	Phe	Cys	Leu	Gly	Lys	Phe
			50				55					60				
45	Asp	Glu	Pro	Leu	Asp	Met	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Ile	Gly	Ser	Pro	Arg
	65					70					75					80
	Ile	Asn	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	Val	Thr	Ile	Phe	Tyr	Val	Asp	Arg	Leu
					85					90					95	
	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Tyr	Ile	Asp	Ser	Ile	Thr	Gly	Val	Thr	Val	Asn	Gly
				100					105					110		
50	Gly	Ile	Pro	Gln	Lys	Ile	Ser	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Asp	Lys	Ala	Lys
				115				120					125			
	Lys	Asp	Ile	Thr	Phe	Tyr	Met	Pro	Val	Asp	Asn	Leu	Gly	Met	Ala	Val
			130				135					140				
55	Ile	Asp	Trp	Glu	Glu	Trp	Arg	Pro	Thr	Trp	Ala	Arg	Asn	Trp	Lys	Pro
	145					150					155					160
	Lys	Asp	Val	Tyr	Lys	Asn	Arg	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Asn
					165					170					175	
	Val	Gln	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Ala	Thr	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Glu	Phe
60				180					185					190		
	Glu	Lys	Ala	Gly	Lys	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Leu	Gly	Lys
				195				200					205			
	Leu	Leu	Arg	Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys
				210			215					220				
65	Tyr	Asn	His	His	Tyr	Lys	Lys	Pro	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ser	Cys	Phe	Asn
	225					230					235					240
	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser
					245					250					255	

ES 2 335 005 T3

Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270
 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285
 5 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 290 295 300
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320
 10 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335
 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 340 345 350
 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 355 360 365
 15 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 20 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 25 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480
 30 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
 485 490 495
 Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
 500 505

35 <210> 2
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 2

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 45 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr
 35

50 <210> 3
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 3

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 60 Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
 20 25 30
 Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
 35 40 45
 65 Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr

ES 2 335 005 T3

	50		55		60														
	Pro	Tyr	Ile	Asp	Ser	Ile	Thr	Gly	Val	Thr	Val	Asn	Gly	Gly	Ile	Pro			
	65					70					75				80				
5	Gln	Lys	Ile	Ser	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Asp	Lys	Ala	Lys	Lys	Asp	Ile			
					85					90					95				
	Thr	Phe	Tyr	Met	Pro	Val	Asp	Asn	Leu	Gly	Met	Ala	Val	Ile	Asp	Trp			
				100					105					110					
10	Glu	Glu	Trp	Arg	Pro	Thr	Trp	Ala	Arg	Asn	Trp	Lys	Pro	Lys	Asp	Val			
			115					120					125						
	Tyr	Lys	Asn	Arg	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Val	Gln	Leu			
			130				135						140						
15	Ser	Leu	Thr	Glu	Ala	Thr	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Glu	Phe	Glu	Lys	Ala			
	145					150						155				160			
	Gly	Lys	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Leu	Gly	Lys	Leu	Leu	Arg			
				165						170						175			
20	Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys	Tyr	Asn	His			
				180					185					190					
	His	Tyr	Lys	Lys	Pro	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ser	Cys	Phe	Asn	Val	Glu	Ile			
			195					200					205						
	Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser	Thr	Ala	Leu			
			210			215						220							
25	Tyr	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Gln	Gln	Ser	Pro	Val	Ala	Ala	Thr			
	225					230						235				240			
	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val	Ser	Lys	Ile			
				245						250						255			
30	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr	Arg	Ile	Val			
				260					265						270				
	Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu	Leu	Val	Tyr			
			275					280					285						
	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Val	Ile	Trp			
			290			295						300							
35	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu	Asp			
	305					310						315				320			
	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn	Val	Thr	Leu			
				325						330					335				
40	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln	Gly	Val	Cys			
			340						345					350					
	Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu	Asn	Pro	Asp			
			355					360					365						
45	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr	Val	Arg	Gly			
			370			375						380							
	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys	Phe	Tyr	Cys			
	385					390						395			400				
	Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp	Val	Lys	Asp			
				405						410					415				
50	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Cys	Ile	Asp	Ala			
				420					425						430				
	Phe	Leu	Lys	Pro	Pro	Met	Glu	Thr	Glu	Glu	Pro	Gln	Ile	Phe	Tyr	Asn			
			435					440					445						
55	Ala	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Thr	Met	Phe	Ile	Val	Ser	Ile	Leu			
			450				455					460							
	Phe	Leu	Ile	Ile	Ser	Ser	Val	Ala	Ser	Leu									
	465					470													

60 <210> 4
 <211> 448
 <212> PRT
 65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 335 005 T3

<400> 4

5 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
20 25 30
10 Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
35 40 45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
50 55 60
15 Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65 70 75 80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
85 90 95
20 Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
100 105 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
115 120 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130 135 140
25 Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145 150 155 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
165 170 175
30 Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
180 185 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
195 200 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
210 215 220
35 Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225 230 235 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
245 250 255
40 Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
260 265 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
275 280 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
290 295 300
45 Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305 310 315 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
325 330 335
50 Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
340 345 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
355 360 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
370 375 380
55 Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385 390 395 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
405 410 415
60 Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
420 425 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
435 440 445

<210> 5

<211> 482

ES 2 335 005 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 5

	Met	Gly	Val	Leu	Lys	Phe	Lys	His	Ile	Phe	Phe	Arg	Ser	Phe	Val	Lys
	1				5					10					15	
10	Ser	Ser	Gly	Val	Ser	Gln	Ile	Val	Phe	Thr	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Cys
				20					25					30		
	Cys	Leu	Thr	Leu	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn	Val	Pro
			35					40					45			
	Phe	Leu	Trp	Ala	Trp	Asn	Ala	Pro	Ser	Glu	Phe	Cys	Leu	Gly	Lys	Phe
15		50				55						60				
	Asp	Glu	Pro	Leu	Asp	Met	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Ile	Gly	Ser	Pro	Arg
	65					70					75					80
	Ile	Asn	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	Val	Thr	Ile	Phe	Tyr	Val	Asp	Arg	Leu
				85						90				95		
20	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Tyr	Ile	Asp	Ser	Ile	Thr	Gly	Val	Thr	Val	Asn	Gly
				100					105					110		
	Gly	Ile	Pro	Gln	Lys	Ile	Ser	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Asp	Lys	Ala	Lys
			115				120						125			
	Lys	Asp	Ile	Thr	Phe	Tyr	Met	Pro	Val	Asp	Asn	Leu	Gly	Met	Ala	Val
25		130					135					140				
	Ile	Asp	Trp	Glu	Glu	Trp	Arg	Pro	Thr	Trp	Ala	Arg	Asn	Trp	Lys	Pro
	145					150					155					160
	Lys	Asp	Val	Tyr	Lys	Asn	Arg	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Asn
				165						170				175		
30	Val	Gln	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Ala	Thr	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Glu	Phe
			180						185					190		
	Glu	Lys	Ala	Gly	Lys	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Leu	Gly	Lys
			195					200					205			
	Leu	Leu	Arg	Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys
35		210					215					220				
	Tyr	Asn	His	His	Tyr	Lys	Lys	Pro	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ser	Cys	Phe	Asn
	225					230					235					240
	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser
				245						250				255		
40	Thr	Ala	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Gln	Gln	Ser	Pro	Val
			260						265					270		
	Ala	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val
			275					280					285			
45	Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr
		290					295					300				
	Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu
	305					310					315					320
	Leu	Val	Tyr	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile
				325						330				335		
50	Val	Ile	Trp	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu
			340						345					350		
	Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn
			355					360					365			
55	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln
			370				375					380				
	Gly	Val	Cys	Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu
	385					390					395					400
	Asn	Pro	Asp	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr
60				405						410					415	
	Val	Arg	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys
				420					425					430		
	Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp
			435					440					445			
65	Val	Lys	Asp	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Cys
		450					455						460			

ES 2 335 005 T3

Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480
 Phe Tyr

5
 <210> 6
 <211> 1530
 <212> ADN
 10 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 15 <222> (1)...(1530)
 <223> Glicoproteína hialuronidasa anclada a GPI PH-20

20 <400> 6

```

  atg gga gtg cta aaa ttc aag cac atc ttt ttc aga agc ttt gtt aaa 48
  Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
  1 5 10 15
  tca agt gga gta tcc cag ata gtt ttc acc ttc ctt ctg att cca tgt 96
  Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
  20 25 30
  tgc ttg act ctg aat ttc aga gca cct cct gtt att cca aat gtg cct 144
  Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
  35 40 45
  ttc ctc tgg gcc tgg aat gcc cca agt gaa ttt tgt ctt gga aaa ttt 192
  Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
  50 55 60
  gat gag cca cta gat atg agc ctc ttc tct ttc ata gga agc ccc cga 240
  Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
  65 70 75 80
  ata aac gcc acc ggg caa ggt gtt aca ata ttt tat gtt gat aga ctt 288
  Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
  85 90 95
  ggc tac tat cct tac ata gat tca atc aca gga gta act gtg aat gga 336
  Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
  100 105 110
  gga atc ccc cag aag att tcc tta caa gac cat ctg gac aaa gct aag 384
  Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
  115 120 125
  aaa gac att aca ttt tat atg cca gta gac aat ttg gga atg gct gtt 432
  Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
  130 135 140
  att gac tgg gaa gaa tgg aga ccc act tgg gca aga aac tgg aaa cct 480
  Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
  145 150 155 160
  aaa gat gtt tac aag aat agg tct att gaa ttg gtt cag caa caa aat 528
  Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
  165 170 175
  
```

ES 2 335 005 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

gta caa ctt agt ctc aca gag gcc act gag aaa gca aaa caa gaa ttt 576
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190

gaa aag gca ggg aag gat ttc ctg gta gag act ata aaa ttg gga aaa 624
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205

tta ctt cgg cca aat cac ttg tgg ggt tat tat ctt ttt ccg gat tgt 672
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220

tac aac cat cac tat aag aaa ccc ggt tac aat gga agt tgc ttc aat 720
 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 225 230 235 240

gta gaa ata aaa aga aat gat gat ctc agc tgg ttg tgg aat gaa agc 768
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255

act gct ctt tac cca tcc att tat ttg aac act cag cag tct cct gta 816
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270

gct gct aca ctc tat gtg cgc aat cga gtt cgg gaa gcc atc aga gtt 864
 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285

tcc aaa ata cct gat gca aaa agt cca ctt ccg gtt ttt gca tat acc 912
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 290 295 300

cgc ata gtt ttt act gat caa gtt ttg aaa ttc ctt tct caa gat gaa 960
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320

ctt gtg tat aca ttt ggc gaa act gtt gct ctg ggt gct tct gga att 1008
 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335

gta ata tgg gga acc ctc agt ata atg cga agt atg aaa tct tgc ttg 1056
 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 340 345 350

ctc cta gac aat tac atg gag act ata ctg aat cct tac ata atc aac 1104
 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 355 360 365

gtc aca cta gca gcc aaa atg tgt agc caa gtg ctt tgc cag gag caa 1152
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380

gga gtg tgt ata agg aaa aac tgg aat tca agt gac tat ctt cac ctc 1200
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400

aac cca gat aat ttt gct att caa ctt gag aaa ggt gga aag ttc aca 1248
 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415

gta cgt gga aaa ccg aca ctt gaa gac ctg gag caa ttt tct gaa aaa 1296

ES 2 335 005 T3

Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 ttt tat tgc agc tgt tat agc acc ttg agt tgt aag gag aaa gct gat 1344
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 gta aaa gac act gat gct gtt gat gtg tgt att gct gat ggt gtc tgt 1392
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 ata gat gct ttt cta aaa cct ccc atg gag aca gaa gaa cct caa att 1440
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480
 ttc tac aat gct tca ccc tcc aca cta tct gcc aca atg ttc att gtt 1488
 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
 485 490 495
 agt att ttg ttt ctt atc att tct tct gta gcg agt ttg taa 1530
 Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu *
 500 505

<210> 7

<211> 509

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CARBOHID

<222> 82, 166, 235, 254, 368, 393, 490

<400> 7

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
 100 105 110
 Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205

ES 2 335 005 T3

5 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270
 10 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 290 295 300
 15 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320
 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335
 20 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 340 345 350
 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 355 360 365
 25 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415
 30 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 35 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480
 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
 485 490 495
 40 Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
 500 505

45 <210> 8

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Cebador Inverso para generar un anclaje a GPI que carece de N483 y termina en Y482 con un sitio BamHI en el extremo 5'

55

<400> 8

aattggatcc tcagtagaaa attgaggtt cttc 34

60

<210> 9

<211> 33

<212> ADN

65

<213> Secuencia Artificial

ES 2 335 005 T3

<220>

<223> Cebador Inverso para generar un anclaje a GPI que carece de Y482 y termina en F481 con un sitio BamHI en el extremo 5'

5 <400> 9

aattggatcc tcagaaaatt tgaggttctt ctg 33

10 <210> 10

<211> 34

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Cebador Inverso para generar un anclaje a GPI que carece de F481 y termina en I480 con un sitio BamHI en el extremo 5'

<400> 10

25 **aattggatcc tcaaattga ggttctctg tctc 34**

<210> 11

30 <211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Cebador Inverso para generar un anclaje a GPI que carece de I480 y termina en Q479 con un sitio BamHI en el extremo 5'

40 <400> 11

aattggatcc tcattgaggt tcttctgtct cc 32

45 <210> 12

<211> 32

<212> ADN

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Inverso para generar un anclaje a GPI que carece de Q479 y termina en P478 con un sitio BamHI en el extremo 5'

55 <400> 12

aattggatcc tcaaggttct tctgtctcca tg 32

60 <210> 13

<211> 31

65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 335 005 T3

<220>

<223> Cebador Inverso para generar un anclaje a GPI que carece de P478 y termina en E477 con un sitio BamHI en el extremo 5'

5

<400> 13

aattggatcc tcattctct gctccatgg g 31

10

<210> 14

<211> 32

<212> ADN

15

<213> Secuencia Artificial

<220>

20

<223> Cebador Directo con un sitio de restricción NheI en el extremo 5'

<400> 14

25

aattgctagc atgggagtgc taaaattcaa gc 32

<210> 15

<211> 1473

30

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

35

<221> CDS

<222> (1)...(1473)

<223> sHASEGP hasta P478 y marcada con His

40

45

50

55

60

65

ES 2 335 005 T3

<400> 15

5	atg gga gtg cta aaa ttc aag cac atc ttt ttc aga agc ttt gtt aaa	48
	Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys	
	1 5 10 15	
10	tca agt gga gta tcc cag ata gtt ttc acc ttc ctt ctg att cca tgt	96
	Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys	
	20 25 30	
15	tgc ttg act ctg aat ttc aga gca cct cct gtt att cca aat gtg cct	144
	Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro	
	35 40 45	
20	ttc ctc tgg gcc tgg aat gcc cca agt gaa ttt tgt ctt gga aaa ttt	192
	Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe	
	50 55 60	
25	gat gag cca cta gat atg agc ctc ttc tct ttc ata gga agc ccc cga	240
	Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg	
	65 70 75 80	
30	ata aac gcc acc ggg caa ggt gtt aca ata ttt tat gtt gat aga ctt	288
	Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu	
	85 90 95	
35	ggc tac tat cct tac ata gat tca atc aca gga gta act gtg aat gga	336
	Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly	
	100 105 110	
40	gga atc ccc cag aag att tcc tta caa gac cat ctg gac aaa gct aag	384
	Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys	
	115 120 125	
45	aaa gac att aca ttt tat atg cca gta gac aat ttg gga atg gct gtt	432
	Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val	
	130 135 140	
50	att gac tgg gaa gaa tgg aga ccc act tgg gca aga aac tgg aaa cct	480
	Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro	
	145 150 155 160	
55	aaa gat gtt tac aag aat agg tct att gaa ttg gtt cag caa caa aat	528
	Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn	

ES 2 335 005 T3

	165	170	175	
5	gta caa ctt agt ctc aca gag gcc act gag aaa gca aaa caa gaa ttt Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe 180 185 190	576		
10	gaa aag gca ggg aag gat ttc ctg gta gag act ata aaa ttg gga aaa Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys 195 200 205	624		
15	tta ctt egg cca aat cac ttg tgg ggt tat tat ctt ttt ccg gat tgt Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys 210 215 220	672		
20	tac aac cat cac tat aag aaa ccc ggt tac aat gga agt tgc ttc aat Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn 225 230 235 240	720		
25	gta gaa ata aaa aga aat gat gat ctc agc tgg ttg tgg aat gaa agc Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser 245 250 255	768		
30	act gct ctt tac cca tcc att tat ttg aac act cag cag tct cct gta Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val 260 265 270	816		
35	gct gct aca ctc tat gtg ogc aat cga gtt egg gaa gcc atc aga gtt Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val 275 280 285	864		
40	tcc aaa ata cct gat gca aaa agt cca ctt ccg gtt ttt gca tat acc Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr 290 295 300	912		
45	cgc ata gtt ttt act gat caa gtt ttg aaa ttc ctt tct caa gat gaa Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu 305 310 315 320	960		
50	ctt gtg tat aca ttt ggc gaa act gtt gct ctg ggt gct tct gga att Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile 325 330 335	1008		
55	gta ata tgg gga acc ctc agt ata atg cga agt atg aaa tct tgc ttg Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu 340 345 350	1056		
60	ctc cta gac aat tac atg gag act ata ctg aat cct tac ata atc aac Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn 355 360 365	1104		
65	gtc aca cta gca gcc aaa atg tgt agc caa gtg ctt tgc cag gag caa Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln 370 375 380	1152		
	gga gtg tgt ata agg aaa aac tgg aat tca agt gac tat ctt cac ctc Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu 385 390 395 400	1200		
	aac cca gat aat ttt gct att caa ctt gag aaa ggt gga aag ttc aca Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr 405 410 415	1248		

ES 2 335 005 T3

gta cgt gga aaa ccg aca ctt gaa gac ctg gag caa ttt tct gaa aaa 1296
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430

5 ttt tat tgc agc tgt tat agc acc ttg agt tgt aag gag aaa gct gat 1344
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445

10 gta aaa gac act gat gct gtt gat gtg tgt att gct gat ggt gtc tgt 1392
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460

15 ata gat gct ttt cta aaa cct ccc atg gag aca gaa gaa cct gga tcc 1440
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gly Ser
 465 470 475 480

20 ggt tct ggt gct cac cat cac cat cac cat taa 1473
 Gly Ser Gly Ala His His His His His His *
 485 490

<210> 16
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 16

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
 100 105 110
 Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val

ES 2 335 005 T3

				260					265					270		
	Ala	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val
				275				280					285			
5	Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr
		290					295					300				
	Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu
	305					310					315				320	
10	Leu	Val	Tyr	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile
					325					330					335	
	Val	Ile	Trp	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu
				340					345					350		
	Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn
15			355				360					365				
	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln
		370				375						380				
	Gly	Val	Cys	Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu
	385					390					395					400
20	Asn	Pro	Asp	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr
				405						410					415	
	Val	Arg	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys
			420						425					430		
25	Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp
		435					440					445				
	Val	Lys	Asp	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Cys
		450				455						460				
	Ile	Asp	Ala	Phe	Leu	Lys	Pro	Pro	Met	Glu	Thr	Glu	Glu	Pro	Gly	Ser
30	465					470					475					480
	Gly	Ser	Gly	Ala	His											
				485							490					

<210> 17

35 <211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Cebador Espaciador His Dir

<400> 17

45 ataattggat cccgttctgg tgcaccat caccatcac 39

<210> 18

50 <211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Cebador Espaciador His Inv

<400> 18

60 tataattgcg gccgcctaataat ggtgatggtg atggtgag 38

<210> 19

<211> 30

65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 335 005 T3

<220>
<223> CEBADOR INVERSO 3' SIN CODÓN DE TERMINACIÓN PARA GENERAR un producto de truncamiento HIS-sHASEGP que carece de anclaje a GPI y termina en N483
5
<400> 19
aatggatcca ttgtagaaaa ttgagggtc 30

10 <210> 20
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> CEBADOR INVERSO 3' SIN CODÓN DE TERMINACIÓN PARA GENERAR un producto de truncamiento HIS-sHASEGP que carece de anclaje a GPI y termina en Y482
20
<400> 20
aatggatccg tagaaaattt gagggtcttc 30

25 <210> 21
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> CEBADOR INVERSO 3' SIN CODÓN DE TERMINACIÓN PARA GENERAR un producto de truncamiento HIS-sHASEGP que carece de anclaje a GPI y termina en F481
35
<400> 21
aatggatcc gaaaatttga ggttctctg 30

40 <210> 22
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> CEBADOR INVERSO 3' SIN CODÓN DE TERMINACIÓN PARA GENERAR un producto de truncamiento HIS-sHASEGP que carece de anclaje a GPI y termina en I480
50
<400> 22
attggatcca attgagggtt ctctgtctc. 30

55 <210> 23
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> CEBADOR INVERSO 3' SIN CODÓN DE TERMINACIÓN PARA GENERAR un producto de truncamiento HIS-sHASEGP que carece de anclaje a GPI y termina en Q479
65

ES 2 335 005 T3

<400> 23

aattggatcc ttgaggtct tctgtctcc 29

5 <210> 24

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> CEBADOR INVERSO 3' SIN CODÓN DE TERMINACIÓN PARA GENERAR un producto de truncamiento HIS-sHASEGP que carece de anclaje a GPI y termina en P478

15

<400> 24

aattggatcc aggtctctct gctccatg 29

20 <210> 25

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> CEBADOR INVERSO 3' SIN CODÓN DE TERMINACIÓN PARA GENERAR un producto de truncamiento HIS-sHASEGP que carece de anclaje a GPI y termina en E477

30

<400> 25

aattggatcc ttctctgtc tccatggg 28

35 <210> 26

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Cebador inverso para amplificar un mutante de delección de sHASEGP que termina en A467

45

<400> 26

aattggatcc ctaagcatct atacagacac catcag 36

50 <210> 27

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> Cebador inverso para amplificar un mutante de delección de sHASEGP que termina en A447

60 <400> 27

aattggatcc ctaagcttc tcctacaac tcaag 35

<210> 28

65 <211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 335 005 T3

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar un mutante de delección de sHASEGP que termina en S430

5 <400> 28
 aattggatcc ctaagaaaat tgctccaggt ctc **34**

<210> 29
10 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Cebador inverso para amplificar un mutante de delección de sHASEGP que termina en G 413

<400> 29
20 **aattggatcc ctatccaact ttctcaagtt gaatag** **36**

<210> 30
 <211> 36
25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
30 <223> Cebador inverso para amplificar un mutante de delección de sHASEGP que termina en S 394

<400> 30
35 **aattggatcc ctatgaattc cagttttcc ttatac** **36**

<210> 31
 <211> 35
40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
45 <223> Cebador inverso para amplificar un mutante de delección de sHASEGP que termina en A 372

<400> 31
50 **aattggatcc ctatgctagt gtgacgttga ttatg** **35**

<210> 32
 <211> 33
55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
60 <223> Cebador inverso para amplificar un mutante de delección de sHASEGP que termina en S 347

<400> 32
 aattggatcc ctaacttcgc attatactga ggg **33**

65 <210> 33
 <211> 29

ES 2 335 005 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Cebador directo LN para mutagénesis dirigida para generar una fusión de sHASEGP con líder kappa con L36 como el primer aminoácido de sHASEGP después del líder kappa

10 <400> 33

ctgaatttca gagcacctcc tgtattcc 29

<210> 34

15 <211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Cebador directo FR para mutagénesis dirigida para generar una fusión de sHASEGP con líder kappa con F38 como el primer aminoácido de sHASEGP después del líder kappa

25 <400> 34

ttcagagcac ctctgttat tccaaatg 28

<210> 35

30 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Cebador inverso Asp para mutagénesis dirigida para generar una fusión de sHASEGP con líder kappa con Asp como el último aminoácido del líder kappa antes de L 36 o F 38 de PH-20

40 <400> 35

gtcaccagtg gaacctggaa ccc 23

<210> 36

45 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Cebador inverso Gly para mutagénesis dirigida para generar una fusión de sHASEGP con líder kappa con Gly como el último aminoácido del líder kappa antes de L 36 o F 38 de PH-20

55 <400> 36

accagtggaa cctggaacctc agag 24

<210> 37

60 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Cebador directo para el primer fragmento del líder kappa

ES 2 335 005 T3

<400> 37
gagacagaca cactcctgct atgggtactg 30

5 <210> 38
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Cebador inverso para el primer fragmento del líder kappa

15 <400> 38
cccagagcag cagtaccat agcaggagtg 30

<210> 39
20 <211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Cebador directo para el segundo fragmento del líder kappa

30 <400> 39
ggtactgctg cctcgggttc caggtccac 30

<210> 40
<211> 27
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Cebador inverso para el segundo fragmento del líder kappa

<400> 40
45 **gcgtcaccag tggaaactgg aaccag** 27

<210> 41
<211> 30
<212> ADN
50 <213> Secuencia Artificial

<220>
55 <223> Cebador directo Nhe para líder kappa

<400> 41
attgctagca tggagacaga cacactcctg 30

60 <210> 42
<211> 28
<212> ADN
65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 335 005 T3

<400> 46

5 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 20 25 30
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 35 40 45
 10 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 50 55 60
 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 65 70 75 80
 Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
 85 90 95
 15 Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 100 105 110
 Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 115 120 125
 20 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 130 135 140
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 145 150 155 160
 25 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 165 170 175
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 180 185 190
 30 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 195 200 205
 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 210 215 220
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 225 230 235 240
 35 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 245 250 255
 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 260 265 270
 40 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 275 280 285
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 290 295 300
 45 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 305 310 315 320
 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 325 330 335
 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 340 345 350
 50 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 355 360 365
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 370 375 380
 55 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 385 390 395 400
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 405 410 415
 60 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 420 425 430
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 435 440 445
 65 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
 450 455 460

ES 2 335 005 T3

<210> 47

<211> 40

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cebador 3' BAM INV de sHASEGP con anclaje a GPI hasta L 509 incluyendo TERMINACIÓN

<400> 47

15 **aattggatcc ctacagaaga aatgataaga aacaaaatac 40**

<210> 48

<211> 1449

20 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 48

25

```

atgggagtgc taaaattcaa gcaacatottt ttcagaagct ttgttaaate aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacett ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgcccgaag tgaattttgt 180
cttggaat ttgatgagcc actagatagc agcctcttct ctttcatagg aagccccga 240
ataaacgcca cgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatctt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgctt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc acaaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccaactgagaa agcaaaaaca gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaacccgggt acaatggaag ttgcttcaat 720

```

40

```

gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacacteta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttcocaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggt 900
tttgcataata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatcttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctggtgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctactaa 1449

```

55

<210> 49

<211> 467

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 335 005 T3

<400> 49

5 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
10 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
15 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
20 Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
25 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
30 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
35 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255
40 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260 265 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290 295 300
45 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305 310 315 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile

50

55

60

65

ES 2 335 005 T3

```

                    325                      330                      335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
                    340                      345                      350
5  Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
                    355                      360                      365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
                    370                      375                      380
10 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                      390                      395                      400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                    405                      410                      415
15 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
420                      425                      430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435                      440                      445
20 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450                      455                      460
Ile Asp Ala
465

```

```

25 <210> 50
    <211> 1536
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens
30 <400> 50

```

```

35 atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaate aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgcg tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaaag tgaattttgt 180
cttggaanaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccga 240
ataaacgcca cggggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
40 caagaccate tggacaaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccaactgagaa agcaaaaaca gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatott 660
45 tttccggatt gttacaacca tcaactataag aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagtccggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggtt 900
50 tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgcg ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caactgcaca cttagcagcca aaatgtgtag ccaagtgcct 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
55 aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaathtt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctggtgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaatt 1440
60 ttctacaatg cttcacctc cacactatct gccacaatgt tcatttgag gctggaagtc 1500
tgggatcaag gtattagcag aattggttct ttctga 1536

```

```

65 <210> 51
    <211> 6630
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial

```

ES 2 335 005 T3

<220>

<223> Vector plasmídico HZ24

5 <400> 51

5	tcaatattgg	ccattagcca	tattattcat	tggttatata	gcataaatca	atattggcta	60
	ttggccattg	catacgttgt	atctatatca	taatatgtac	atztatattg	gctcatgtcc	120
	aatatgaccg	ccatgttggc	attgattatt	gactagttat	taatagtaab	caattacggg	180
	gtcattagtt	catagcccat	atattggagt	ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	240
10	gcttggotga	ccgcccacg	acccccgcc	attgacgtca	ataatgacgt	atgttcccac	300
	agtaacgcca	atagggactt	tccattgacg	tcaatgggtg	gagtatttac	ggtaaactgc	360
	ccacttggca	gtacatcaag	tgtatcatat	gccaaagtccg	ccccctattg	acgtcaatga	420
	cggtaaatgg	cccgcctggc	attatgccca	gtacatgacc	ttacgggact	ttcctacttg	480
	gcagtacatc	tacgtattag	tcategetat	taccatgggtg	atgcgggttt	ggcagtacac	540
15	caatgggctg	ggatagcggg	ttgactcaag	gggatttcca	agtctccacc	ccattgaegt	600
	caatggggagt	ttgttttggc	accaaaatca	acgggacttt	ccaaaatgtc	gtaataaccc	660
	cgccccgttg	acgcaaatgg	gcggtaggcg	tgtacgggtg	gaggtctata	taagcagagc	720
	tctttagtg	aaccgtcaga	tcactagaag	ctttattgctg	gtagtttatc	acagttaaat	780
20	tgtaaacgca	gtcagtgett	ctgacacaac	agtctcgaa	ttaagctgca	gaagtgggtc	840
	gtgaggcact	gggcaggtaa	gtatcaaggt	tacaagacag	gtttaaggag	accaatagaa	900
	actgggcttg	tcgagacaga	gaagactctt	gcgtttctga	taggcaceta	ttggtcttac	960
	tgacatccac	tttgcttttc	tctccacagg	tgtccactcc	cagttcaatt	acagctctta	1020
	aggctagagt	acttaatacg	actcactata	ggctagcatg	ggagtgctaa	aattcaagca	1080
25	catctttttc	agaagctttg	ttaaatcaag	tggagtatcc	cagatagttt	tcacctctct	1140
	tctgattcca	tgttgettga	ctctgaattt	cagagcacct	cctgttatte	caaatgtgcc	1200
	ttctctctgg	gcctggaatg	cccgaagtga	attttctctt	ggaaaatttg	atgagcactc	1260
	agatatgagc	ctcttctctt	tcataggaag	ccccgaata	aacgccaccg	ggcaagggtg	1320
	tacaatattt	tatgttgata	gacttggcta	ctatccttac	atagattcaa	tcacaggagt	1380
30	aactgtgaat	ggaggaatcc	cccagaagat	ttccttacia	gaccatctgg	acaaagctaa	1440
	gaaagacatt	acattttata	tgccagtaga	caatttggga	atggctgtta	ttgactggga	1500
	agaatggaga	cccacttggg	caagaaaactg	gaaacctaaa	gatgtttaca	agaataggtc	1560
	tattgaattg	gttcagcaac	aaaatgtaca	acttagtctc	acagaggcca	ctgagaaagc	1620
35	aaaacaagaa	tttgaaaagg	cagggaaagga	tttctctggt	gagactataa	aattgggaaa	1680
	attacttcgg	ccaaatcact	tgtgggggta	ttatcttttt	ccggattggt	acaacctca	1740
	ctataagaaa	cccgggtaca	atggaaagtg	cttcaatgta	gaaataaaaa	gaaatgatga	1800
	tctcaagctg	ttgtgggaatg	aaagcactgc	cttttaccca	tccattttat	tgaacctca	1860
	gcagttctct	gtagctgett	cactctatgt	gcgcaatcga	gttcgggaag	ccatcagagt	1920
40	ttccaaaata	cctgatgcaa	aaagtcact	tccgggtttt	gcataatccc	gcatagtttt	1980
	tactgatcaa	gttttgaaat	tcctttctca	agatgaactt	gtgtatacat	ttggcgaaac	2040
	tgttgcctctg	ggctgctctg	gaattgtaat	atggggaacc	ctcagtataa	tgccaagtat	2100
	gaaatcttgc	ttgctcttag	acaattacat	ggagactata	ctgaatcctt	acataatcaa	2160
	egtcaacta	gcagccaaaa	tgtgtagcca	agtgccttgc	caggagcaag	gagtgtgat	2220
45	aaggaaaaac	tggaaatcaa	gtgactabct	tcacctcaac	ccagataatt	ttgctattca	2280
	acttgagaaa	ggttgaaagt	tcacagtacg	tggaaaaccg	acacttgaag	acctggagca	2340
	atltctgaa	aaattttatt	gcagctgtta	tggacccttg	agttgttaagg	agaaagctga	2400
	tgtaaaagac	actgatgetg	ttgatgtgtg	tattgctgat	gggtctctga	tagatgett	2460
	tctaaaacct	cccattggaga	cagaagaacc	tcaaattttc	tactgaggat	ccatagctaa	2520
50	cgccctctc	cctccccccc	ccctaacgtt	actggccgaa	gcgccttggg	ataaggccgg	2580
	tgtgcgtttg	tctatatggt	atlttccacc	atattgccc	cttttggcaa	tgtgagggcc	2640
	cggaaacctg	gcctctctt	cttgacgagc	attcctaggg	gtctttcccc	tctcgccaaa	2700
	ggaatgcaag	gtctgttgaa	tgtcgtgaag	gaagcagttc	ctctggaagc	ttcttgaaga	2760
55	caaacaacgt	ctgtagcgac	cctttgcagg	cagcggaaac	ccccacctgg	cgacaggtgc	2820
	ctctgcggcc	aaaagccacg	tgtataagat	acacctgcaa	aggcggcaca	accccagtg	2880
	cactgtgtga	ttggataggt	tgtggaaga	gtcaaatggc	tctcctcaag	cgatttcaac	2940
	aagggctga	aggatgcccc	gaaggtacc	cattgtatgg	gatctgatct	ggggcctcgg	3000
	tgcacatgct	ttacatgtgt	ttagtcgagg	ttaaaaaac	gtctaggccc	cccgaaccac	3060
60	ggggacgtgg	tttctctttg	aaaaacacga	tgataagctt	gccacaaccc	acagcggccg	3120
	ctgccatcat	ggttcagcca	ttgaactgca	tcgtcgcctg	gtcccaaat	atggggattg	3180
	gcaagaacgg	agacctacc	tggcctccgc	tcaggaacga	gttcaagtac	ttccaaagaa	3240
	tgaccacaac	ctcttcagtg	gaaggtaac	agaatctggt	gattatgggt	aggaaaacct	3300
	ggttctccat	tectgagaag	aatcgacctt	taaaggacag	aattaatata	gttctcagta	3360
65	gagaactcaa	agaaccacca	cgaggagctc	atlttcttgc	caaaagtttg	gatgatgect	3420
	taagacttat	tgaacaaccg	gaattggcaa	gtaaaagtaga	catggtttgg	atagtcggag	3480

ES 2 335 005 T3

	gcagttctgt	ttaccaggaa	gccatgaatc	aaccaggcca	cctcagactc	tttgtgacaa	3540
	ggatcatgca	ggaatttgaa	agtgacacgt	ttttcccaga	aattgatttg	gggaaatata	3600
	aactctccc	agaataccca	ggcgtcctct	ctgaggtcca	ggaggaaaaa	ggcatcaagt	3660
5	ataagtttga	agtctacgag	aagaaagact	aaacgcgtgg	tacctctaga	gtcgaccocg	3720
	gcggcgctt	cgagcagaca	tgataagata	cattgatgag	tttggacaaa	ccacaactag	3780
	aatgcagtga	aaaaaatgct	ttatttgtga	aatttgtgat	gctattgctt	tatttgtaac	3840
	cattataagc	tgcaataaac	aagttaacaa	caacaattgc	attcatttta	tgtttcaggt	3900
	tcagggggag	atgtgggagg	ttttttaaag	caagtaaac	ctctacaaat	gtggtaaaat	3960
10	cgataaggat	ccgggtctgg	gtaatatgca	agaggcccgc	accgatccgc	cttcccaca	4020
	gttgcgcagc	ctgaaatggc	aatggaacgc	ccctgtagcg	gcgcatlaag	cgcgggcggg	4080
	gtgggtggtt	cgcgcagcgt	gacgcgtaca	cttgccagcg	ccctagcgc	cgtccttct	4140
	gcttcttcc	cttcttctc	cgccacgttc	gcgggtttc	cccgtaagc	tctaaactcg	4200
	gggtccctt	tagggtctcg	atttagtct	ttacggcacc	tcgaccccaa	aaaacttgat	4260
15	tagggtgatg	gttcaagtag	tgggccatcg	ccctgataga	cggtttctcg	ccctttgacg	4320
	ttggagtcca	cgttcttaa	tagtggactc	ttgttccaaa	ctggaacaac	actcaaccct	4380
	atctcggct	attcttttga	tttataaggg	attttgccga	tttcggccta	ttggttaaaa	4440
	aatgagctga	tttaacaaaa	atthaacggc	aattttaaca	aaatattaac	gcttacaatt	4500
	tcctgatgog	gtattttctc	cttacgcctc	tgtgcgggat	ttcacaccgc	atatggtgca	4560
20	ctctcagtag	aatctgctct	gatgcgcctc	agttaagcca	gccccgacac	ccgccaacac	4620
	ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcggcctac	cgcttacaga	caagctgtga	4680
	ccgtctccgg	gagctgcatg	tgtcagaggt	ttcaccgctc	atcaccgaaa	cgcgcgagac	4740
	gaaagggcct	cgatgatacg	ctatttttat	aggttaatgt	catgataata	atggtttctt	4800
	agacgtcagg	tggcactttt	cggggaaatg	tgcgcggaac	ccctatttgt	ttatttttct	4860
25	aaatacatte	aaatatgtat	ccgtctatga	gacaataacc	ctgataaatg	cttcaataat	4920
	attgaaaaag	gaagagtatg	agtattcaac	atctccgtgt	cgcccttatt	cccttttttg	4980
	cggcattttg	cttctctggt	tttgcctacc	cagaaacgct	ggtgaaagta	aaagatgctg	5040
	aagatcagtt	gggtgcacga	gtgggttaca	ctcaactgga	tctcaacagc	ggtaagatcc	5100
	ttgagagttt	tcgccccgaa	gaacgttttc	caatgatgag	cactttttaa	gttctgctat	5160
30	gtggcgcggt	attatcccg	attgacgcgc	ggcaagagca	actcggtcgc	cgcatacaet	5220
	attctcagaa	tgacttggtt	gagtaactac	cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	5280
	tgacagtaag	agaattatgc	agtgcctcca	taaccatgag	tgataaacct	gcgcccaact	5340
	tactctgac	aacgatccga	ggacccaagg	agctaaccgc	ttttttgcac	aacatggggg	5400
	atcatgtaac	tcgcttgat	cgttgggaac	cygagctgaa	tgaagccata	ccaaacgacg	5460
35	agcgtgacac	cacgatgctt	gtagcaatgg	caacaacgct	gcgcaaaacta	ttaactggcg	5520
	aactacttac	ctagcttcc	cggcaacaat	taatagactg	gatggaggcg	gataaagtgt	5580
	caggaccact	tctgctctcg	gcccttccgg	ctggctgggt	tattgctgat	aaatctggag	5640
	ccggtagcgg	tggtctctcg	ggtatcattg	cagcaactgg	gccagatggt	aagccctccc	5700
	gtatcgtagt	tatctacacg	acggggagtc	aggcaactat	ggatgaacga	aatagacaga	5760
40	tcgctgagat	aggtgctca	ctgattaagc	atgggtaact	gtcagaccaa	gtttactcat	5820
	atatacttta	gattgattta	aaacttcatt	tttaatttaa	aaggatctag	gtgaagatcc	5880
	tttttgataa	tctcatgacc	aaaatccctt	aacgtgagtt	ttcgttccac	tgagcgtcag	5940
	accocgtaga	aaagatcaaa	ggtcttctt	gagatcctt	ttttctgcgc	gtaactctgt	6000
45	gcttgcaaac	aaaaaaacca	ccgctaccag	cggtgggtttg	tttgccggat	caagagctac	6060
	caactctttt	tccgaaggta	actggcttca	gcagagcgca	gataccaaat	actgttcttc	6120
	tagttagacc	gtagttaggc	caccacttca	agaactctgt	agcaccgctt	acatacctcg	6180
	ctctgcta	actgttacca	gtggctgctg	ccagtggcga	taagtctgtt	cttaccgggt	6240
	tggaactoaag	acgatagtta	ccggataaag	cgcagcggtc	gggctgaacg	gggggttctg	6300
50	gcacacagcc	cagcttgagg	cgaacgacct	acaccgaact	gagataccta	cagcgtgagc	6360
	tatgagaaaag	cgccacgctt	ccogaaggga	gaaaggcgga	caggtatccg	gtaagcggca	6420
	gggtcggaac	aggagagcgc	acgagggagc	ttccaggggg	aaacgcctgg	tatctttata	6480
	gtcctgtcgg	gtttcggcac	ctctgacttg	agcgtcgatt	tttgtgatgc	tcgtcagggg	6540
	ggcggagcct	atggaaaaac	gcccagaaag	cgcccttttt	acggttctctg	gccttttctg	6600
55	ggccttttgc	tcacatggct	cgacagatct				6630

<210> 52

60 <211> 2009

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 335 005 T3

<400> 52

```

5      atgtggctca cataaattca gaaagtatga tagcagtgta ggtggtagc agcaectcat      60
      aaggtecttc ctagcaaggc aaagggatgc taatgactag ccaatgetct aggaagacat      120
      tgagaccagc caacttcttg ccttgataac tactgaaagc acattgggtg gctggatttt      180
      gaaagcagac ttctggttat aggtgatgca acttgaaaaa caatcctgaa acatgaaaca      240
      agaataataa tatttaaatg taacttaatc attatacctc tttatccatc aaagtgaatt      300
10     cattccattc cctttcatct gtgctcatic tttgcatcag atattgggta aaccaaaagtg      360
      tgtaggaaga aataaatggt ttcatagtca ttactcttta caatgggagt gctaaaatte      420
      aagcacatct ttttcagaag ctttggttaa tcaagtggag tatcccagat agttttcacc      480
      ttcttctctg ttccatggtg cttgactctg aatttcagag cacctcctgt tattccaaat      540
      gtgcctttcc tctgggcctg gaatgcccc aagtgaatctt gtcttgaaa atttgatgag      600
15     ccactagata tgagcctctt ctctttcata ggaagcccc gaataaacgc caccgggcaa      660
      ggtgttacia tattttatgt tgatagactt ggctactatc cttacataga ttcaatcaca      720
      ggagtaactg tgaatggagg aatccccag aagatttctt tacaagacca tctggacaaa      780
      gtaagaaag acattacatt ttatatgcca gtagacaatt tgggaatggc tgttattgac      840
      tgggaagaat ggagaccac ttgggcaaga aactggaac ctaaagatgt ttacaagaat      900
20     aggtctattg aattggttca gcaacaaaat gtacaactta gtctcacaga ggccactgag      960
      aaagcaaac aagaatttga aaaggcaggg aaggatttcc tggtagagac tataaaattg      1020
      ggaaaattac ttcggccaaa tcacttgtgg ggttattatc tttttccgga ttgttacaac      1080
      catcactata agaaaccggg ttacaatgga agttgcttca atgtagaaat aaaaagaaat      1140
      gatgatctca gctgggttggt gaatgaaagc actgctcttt acccatccat ttatttgaac      1200
25     actcagcagt ctctgttagc tgctacactc atcgtgcgca atcagattcg ggaagccatc      1260
      agagtttcca aaatacctga tgcaaaaagt ccacttccgg tttttgcata taccocgata      1320
      gtttttactg atcaagtttt gaaattcctt tctcaagatg aacttgtgta tacatttggc      1380
      gaaactggtg ctctgggtgc ttctggaatt gtaatatggg gaaccctcag tataatgcga      1440
      agtatgaaat cttgcttctc cctagacaat tacatggaga ctatactgaa tccttacata      1500
30     atcaacgtca cactagcagc caaaatgtgt agccaagtgc tttgccagga gcaaggagtg      1560
      tgtataagga aaaactggaa ttcaagtgac tatcttcacc tcaaccocaga taattttgct      1620
      attcaacttg agaaaggtgg aaagttcaca gtactgtgaa aaccgacact tgaagacctg      1680
      gagcaatttt ctgaaaaatt ttattgcagc tgttatagca ccttgagttg taaggagaaa      1740
      gctgatgtaa aagacactga tgctgttgat gtgtgtattg ctgatggtgt ctgtatagat      1800
35     gcttttctaa aacctcccat ggagacagaa gaacctcaa ttttctacia tgcttcaccc      1860
      tccacactat ctgccacaat gttcattggt agtattttgt ttcttatcat ttcttctgta      1920
      gcgagtttgt aattgcgcag gttagctgaa atgaacaata tgtccatctt aaagtgtgct      1980
      ttttcgacta attaaatctt tgaaaagaa      2009

```

<210> 53

<211> 2395

45 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50

55

60

65

ES 2 335 005 T3

<400> 53

5	atgtggctca	cataaattca	gaaagtatga	tagcagtgta	ggtggttagc	agcacctcat	60
	aaggctcctc	ctagcaaggg	atgctaata	ctagccaatg	ctctaggaag	acattgagac	120
	cagccaactt	cttgccttga	taactactga	agagacattg	ggtggctgga	ttttgaaagc	180
	agacttctgg	ttataggtga	tgcaacttga	aaaacaatcc	tgaaacatga	acaagaata	240
	ataatattta	aatgtaactt	aatcattata	cctctttatc	catcaaagtg	aattcattcc	300
10	attccctttc	atctgtgctc	atactttgca	tcagatattg	ggtaaaccaa	agtgtgtagg	360
	aagaaataaa	tgttttcata	gtcattaactc	tttacaatgg	gagtgtctaa	attcaagcac	420
	atctttttca	gaagctttgt	taaatcaagt	ggagtatccc	agatagtttt	caccttcctt	480
	ctgattccat	gttgcttgac	tctgaatttc	agagcacctc	ctgttattcc	aaatgtgcct	540
	ttcctctggg	cctggaatgc	cccaagtgaa	ttttgtcttg	gaaaatttga	tgagccacta	600
15	gatatgagcc	tcttctcttt	cataggaagc	ccccgaataa	acgccacogg	gcaaggtggt	660
	acaatatttt	atggtgatag	acttggctac	tatccttaca	tagattcaat	cacaggagta	720
	actgtgaatg	gaggaatccc	ccagaagatt	tccttacaag	accatctgga	caaagctaag	780
	aaagacatta	cattttatat	gccagtagac	aatgtgggaa	tggtctgtat	tgactgggaa	840
20	gaatggagac	ccacttgggc	aagaaactgg	aaacctaaag	atgtttacaa	gaataggtct	900
	attgaattgg	ttcagcaaca	aaatgtacaa	cttagtctca	cagaggcoac	tgagaaagca	960
	aaacaagaat	ttgaaaaggc	agggaaaggat	ttcctggtag	agactataaa	attgggaaaa	1020
	ttacttccgc	caaatcactt	gtggggttat	tatctttttc	cggattgtta	caaccatcac	1080
	tataagaaac	ccggttacaa	tggaagtgc	ttcaatgtag	aaataaaaag	aatgatgat	1140
25							
	ctcagctggg	tgtggaatga	aagcactgct	ctttacccat	ccatttattt	gaacactcag	1200
30	cagtctcctg	tagctgctac	actctatgtg	cgcaatcgag	ttcgggaagc	catcagagtt	1260
	tccaaaatac	ctgatgcaaa	aagtccactt	ccgggttttg	catatacccg	catagttttt	1320
	actgatcaag	ttttgaaatt	cctttctcaa	gatgaacttg	tgtatacatt	tgccgaaact	1380
	gttgctctgg	gtgcttctgg	aattgtaata	tggggaacct	tcagtataat	gcgaagtatg	1440
	aaatcttgct	tgctcctaga	caattacatg	gagactatac	tgaatcctta	cataatcaac	1500
35	gtcacactag	cagccaaaat	gtgtagccaa	gtgctttgcc	aggagcaagg	agtgtgtata	1560
	aggaaaaact	ggaattcaag	tgactatctt	cacctcaacc	cagataattt	tgctattcaa	1620
	cttgagaaag	gtggaaagtt	cacagtaoct	ggaaaaccga	cacttgaaga	cctggagcaa	1680
	ttttctgaaa	aattttattg	cagctgttat	agcaccttga	gttgtaagga	gaaagctgat	1740
40	gtaaaagaca	ctgatgctgt	tgatgtgtgt	attgctgatg	gtgtctgtat	agatgctttt	1800
	ctaaaacctc	ccatggagac	agaagaacct	caaattttct	acaatgcttc	accctccaca	1860
	ctatctgcca	caatgttcat	ttggaggctg	gaagtctggg	atcaaggat	tagcagaatt	1920
	ggtttcttct	gagagtcatg	agggaaaaat	gtgtttcagg	cctcttccct	tggettacag	1980
	gaaatgaaaa	aaccatgact	atcatcacca	acatccttgg	gtattaagtg	cagtcaactc	2040
45	cctagatgct	gtggggagaa	ggcaagttac	aaagatagac	cttccctcaa	gataatcaga	2100
	ttttcatggg	attatcctta	acctttttga	catcatggag	gctttgggaa	tctgatgaag	2160
	cctatcaatt	ttcttcaga	agatatttat	ataagattat	aagaaaaatt	atgtacacag	2220
	cttattttat	tgcatggat	caaaatgcca	tttataaaga	attatgcctt	ttccatcaat	2280
	tttagcatgg	aaaaataatt	tcaggcaata	tgcttaaaaa	ttgggggaag	acaaaagaaa	2340
50	tccatctcgt	gtaaataaaa	ataaattttg	gttttgctca	aaaaaaaaaa	aaaaa	2395
55							
60							
65							