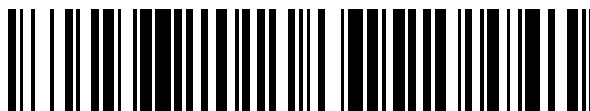


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 630**

51 Int. Cl.:

**A61M 5/172** (2006.01)

**A61K 38/28** (2006.01)

**A61K 38/47** (2006.01)

**A61P 5/50** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2009 E 09739183 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2300046**

54 Título: **Composiciones de insulina de acción súper rápida**

30 Prioridad:

**09.05.2008 US 127044 P**

**28.04.2008 US 125835 P**

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

**18.03.2015**

73 Titular/es:

**HALOZYME, INC. (100.0%)  
11388 Sorrento Valley Road  
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**FROST, GREGORY I.;  
BILINSKY, IGOR;  
VAUGHN, DANIEL y  
SUGARMAN, BARRY**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 531 630 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

Composiciones de insulina de acción súper rápida

5 **Campo de la invención**

Se proporcionan combinaciones, composiciones y kits que contienen una composición de insulina de acción rápida y una composición de enzima degradante de hialuronano formulada para administración parenteral. Estos productos pueden usarse en métodos para tratar enfermedades o afecciones tratables por insulina. También se proporcionan métodos para administración de insulina y una enzima degradante de hialuronano.

**Antecedentes**

La diabetes da como resultado hiperglucemia crónica debido a la incapacidad del páncreas para producir cantidades adecuadas de insulina o debido a la incapacidad de las células para sintetizar y liberar la insulina de forma apropiada. También puede experimentarse hiperglucemia por pacientes con enfermedad crítica, dando como resultado mortalidad y morbilidad aumentadas. Se ha administrado insulina como un producto terapéutico para tratar a pacientes que tienen diabetes, incluyendo, por ejemplo, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y diabetes gestacional, para imitar la respuesta de insulina endógena que se produce en individuos normales. También se ha administrado insulina a pacientes críticamente enfermos con hiperglucemia para controlar los niveles de glucosa en sangre.

Típicamente, se administran insulinas de acción rápida a dichos sujetos en respuesta a hiperglucemia o en anticipación a la hiperglucemia, tal como después del consumo de una comida, que puede dar como resultado control glucémico. Sin embargo, las formas de acción rápidas actuales tienen un retardo en la absorción y acción, y por tanto no se aproximan a la acción de la insulina endógena rápida. Por lo tanto, dichas formulaciones no actúan lo suficientemente rápido para detener la producción de glucosa hepática que se produce poco después de esta primera fase de liberación de insulina. Debido al retardo en la acción farmacológica, las preparaciones de insulina de acción rápida deberían administrarse antes de las comidas para conseguir el control glucémico deseado. Además, las dosis que deben administrarse conducen a una duración prolongada de la acción que contribuye a hipoglucemia, y en muchos casos, a la obesidad. Por lo tanto, existe la necesidad de composiciones de insulina alternativas que imiten más eficazmente la respuesta de insulina endógena cuando se administran a un sujeto, lo que conduce a un control glucémico más eficaz y a una reducción en los efectos secundarios negativos de la terapia con insulina, tales como el aumento de peso.

Bonito, A. ((1954) "effect of hyaluronidase administration on glycemc curves due to insulin in normal and diabetic subjects" *Minerva Medica*, Edizioni Minerva Medica, 45(31): 1068-1073) describe la inyección subcutánea de insulina no humana nativa y preparaciones de hialuronidasa de testículo de toro a pacientes normales y diabéticos. Se muestra que la hialuronidasa aumenta la velocidad de absorción de insulina y prolonga el tiempo de su efecto.

Riet Correra *et al.* ((1962) "Potentialization of the action of insulins by hyaluronidase." *Annales d'Endocrinologie* 23:23-28) describe la administración intravenosa de insulina regular (extraída de tejido animal) y hialuronidasa y su efecto en los niveles de glucosa en sangre en perros y concluye que la combinación de hialuronidasa con insulina aumenta la acción hiperglucémica de la insulina

**Sumario**

La presente invención proporciona una composición de insulina de acción súper rápida, que comprende:

50 una concentración terapéuticamente eficaz de un análogo de insulina de acción rápida para mantener los niveles de glucosa en sangre normales, en donde:

el análogo de insulina de acción rápida es insulina glulisina o insulina aspart;

55 los niveles de glucosa en sangre son niveles prandiales de glucosa en sangre; y

una concentración de una enzima degradante de hialuronano suficiente para hacer que la composición sea una composición de insulina de acción súper rápida tras su administración, en donde

60 la composición de insulina de acción súper rápida tiene una aparición de la acción que se asemeja estrechamente a la liberación de insulina endógena post-prandial de un sujeto no diabético; y

la composición de insulina de acción súper rápida se formula para una vía de administración seleccionada de entre administración subcutánea, intramuscular, intradérmica e intraperitoneal.

65

Se proporcionan composiciones de insulina de acción súper rápida que pueden actuar más rápidamente y/o aumentar la exposición sistémica durante un periodo de tiempo preseleccionado en comparación con composiciones de acción rápida. Por lo tanto, se proporcionan composiciones de insulina de acción súper rápida. Las composiciones contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina de acción rápida y una cantidad de una enzima degradante de hialuronano para hacer la composición de acción súper rápida. Las composiciones se formulan para administración parenteral, tal como administración subcutánea, intradérmica o intramuscular. La dosificación de insulina (cantidad administrada) puede determinarse por la cantidad suficiente para conseguir el control glucémico, que puede determinarse de forma empírica, tal como por exposición a glucosa. Típicamente, un objetivo en el tratamiento es administrar la cantidad más baja posible de insulina para conseguir control glucémico y reducir el número de acontecimientos hiperglucémicos y/o hipoglucémicos. Las dosis menores de insulina usadas en las composiciones de insulina de acción súper rápida pueden reducir el riesgo de aumento de peso y obesidad en sujetos diabéticos. Las composiciones pueden proporcionarse en cualquier recipiente o vehículo adecuado, tal como en un vial estéril, jeringa, cartucho, bolígrafo de insulina, bomba de insulina o en un depósito de sistema de bucle cerrado.

Se describen en el presente documento composiciones de insulina de acción súper rápida que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina de acción rápida para controlar los niveles de glucosa en sangre y una cantidad de una enzima degradante de hialuronano suficiente para hacer que la composición sea una composición de insulina de acción súper rápida. También se describen métodos para preparar composiciones de insulina de acción súper rápida, tales como cualquier composición de insulina de acción súper rápida descrita en el presente documento, seleccionando una insulina de acción rápida y combinándola con una cantidad suficiente de enzima degradante de hialuronano para hacer que la composición sea una composición de insulina de acción súper rápida. En algunos ejemplos de las composiciones y métodos de preparación de las composiciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de insulina de acción rápida es de o desde aproximadamente 10 U/ml a o hasta aproximadamente 500 U/ml de insulina, y la cantidad suficiente de una enzima degradante de hialuronano para hacer que la composición sea una composición de insulina de acción súper rápida es funcionalmente equivalente a al menos o aproximadamente 1 U/ml, 2 U/ml, 3 U/ml, 4 U/ml, 5 U/ml, 6 U/ml, 7 U/ml, 8 U/ml, 9 U/ml, 10 U/ml, 15 U/ml, 20 U/ml o 25 U de actividad hialuronidasa/ml. En algunos ejemplos, la cantidad suficiente de una enzima degradante de hialuronano para hacer que la composición sea una composición de insulina de acción súper rápida es funcionalmente equivalente a al menos o aproximadamente 30 o 35 Unidades de actividad hialuronidasa/ml. Por ejemplo, la cantidad de insulina de acción rápida en las composiciones puede ser o es de aproximadamente 10 U/ml, 20 U/ml, 30 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 60 U/ml, 70 U/ml, 80 U/ml, 90 U/ml, 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 250 U/ml, 300 U/ml, 350 U/ml, 400 U/ml, 450 U/ml o 500 U/ml, y la cantidad de enzima degradante de hialuronano en las composiciones puede ser funcionalmente equivalente a o a aproximadamente 1 U/ml, 2 U/ml, 3 U/ml, 4 U/ml, 5 U/ml, 6 U/ml, 7 U/ml, 8 U/ml, 9 U/ml, 10 U/ml, 15 U/ml, 20 U/ml, 25 U/ml, 30 U/ml, 35 U/ml, 37,5 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 60 U/ml, 70 U/ml, 80 U/ml, 90 U/ml, 100 U/ml, 200 U/ml, 300 U/ml, 400 U/ml, 500 U/ml, 600 U/ml, 700 U/ml, 800 U/ml, 900 U/ml, 1.000 U/ml, 2.000 U/ml, 3.000 U/ml o 5000 U/ml. El volumen de la composición puede ser, por ejemplo, de o aproximadamente de 1 ml, 3 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml o 50 ml. En algunos ejemplos, la composición se formula para suministro mediante un sistema de bucle cerrado, un bolígrafo de insulina o una bomba de insulina, y puede formularse para administración de dosis individual o administración de dosis múltiple.

La cantidad terapéuticamente eficaz de la insulina de acción rápida puede ser menor que la cantidad terapéuticamente eficaz de insulina de acción rápida requerida para conseguir el mismo efecto terapéutico en ausencia de la enzima degradante de hialuronano. La cantidad de enzima degradante de hialuronano es suficiente para conseguir una exposición sistémica a insulina que es al menos o aproximadamente un 30 % mayor durante los primeros 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 o 60 minutos después de la administración parenteral que la exposición sistémica durante el mismo periodo de tiempo después de la administración parenteral de la misma insulina de acción rápida sin un enzima degradante de hialuronano y/o es suficiente para lograr el metabolismo de glucosa sistémico (citado en ocasiones en el presente documento como eliminación de glucosa) que es al menos o aproximadamente un 30 % mayor durante los primeros 30, 45, 60, 90, 120 o 180 minutos después de la administración que el metabolismo de glucosa sistémica durante el mismo periodo después de administración parenteral de la misma insulina de acción rápida sin un enzima degradante de hialuronano. En todas las composiciones proporcionadas en el presente documento y métodos proporcionados en el presente documento, las cantidades de cada componente pueden variar dependiendo del sujeto al que se administran las composiciones y/o la insulina de acción rápida concreta (o mezcla de la misma) que se proporcione. En caso necesario, las cantidades pueden determinarse empíricamente.

Se describen composiciones de insulina que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina de acción rápida y una cantidad de una enzima degradante de hialuronano. La cantidad de enzima degradante de hialuronano es suficiente para conseguir una exposición sistémica a insulina que es al menos o aproximadamente un 30 % mayor durante los primeros 30 a 40 minutos después de la administración que la exposición sistémica durante el mismo periodo después de la administración parenteral de la misma insulina de acción rápida en ausencia de la enzima degradante de hialuronano.

La cantidad de enzima degradante de hialuronano puede ser suficiente para que la composición de insulina de acción súper rápida resultante dé como resultado un aumento del nivel de glucosa en sangre después de los

5 primeros 30, 45, 60, 90, 120 o 180 minutos después de la administración parenteral que es al menos o aproximadamente de un 20 % a un 30 % menor que el aumento en los niveles de glucosa en sangre durante el mismo periodo de tiempo después de la administración parenteral de la misma insulina de acción rápida sin una enzima degradante de hialuronano. El aumento en el nivel de glucosa en sangre puede ser de al menos o

5 aproximadamente un 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % menor que el aumento en el nivel de glucosa en sangre después de la administración parenteral de la insulina de acción rápida sin una enzima degradante de hialuronano.

10 También se describen composiciones de insulina de acción súper rápida que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina de acción rápida y una cantidad de enzima degradante de hialuronano que es suficiente para conseguir un metabolismo de glucosa sistémico que es al menos o aproximadamente un 30 % mayor que la eliminación de la glucosa sistémica (es decir metabolismo) durante los primeros 60 minutos después de la administración parenteral de la misma insulina de acción rápida sin un enzima degradante de hialuronano.

15 En las composiciones de insulina de acción súper rápida proporcionadas en el presente documento, las cantidades ejemplares de insulina (es decir, la cantidad que la composición proporciona para una única dosificación) son de o aproximadamente de 0,05 Unidades, 0,06 Unidades, 0,07 Unidades, 0,08 Unidades, 0,09 Unidades, 0,1 Unidades, 0,2 Unidades, 0,3 Unidades, 0,4 Unidades, 0,5 Unidades, 0,6 Unidades, 0,7 Unidades, 0,8 Unidades, 0,9 Unidades, 1 Unidad, 2 Unidades, 5 Unidades, 10 Unidades, 15 Unidades, 20 Unidades, 25 Unidades, 30 Unidades, 35

20 Unidades, 40 Unidades o 50 Unidades. Las cantidades ejemplares de enzima degradante de hialuronano incluyen una cantidad funcionalmente equivalente a o de aproximadamente 0,3 Unidades, 0,5 Unidades, 1 Unidad, 3 Unidades, 5 Unidades, 10 Unidades, 20 Unidades, 30 Unidades, 40 Unidades, 50 Unidades, 100 Unidades, 150 Unidades, 200 Unidades, 250 Unidades, 300 Unidades, 350 Unidades, 400 Unidades, 450 Unidades, 500 Unidades, 600 Unidades, 700 Unidades, 800 Unidades, 900 Unidades, 1.000 Unidades, 2.000 Unidades, 3.000 Unidades, 4.000 o más Unidades de actividad hialuronidasa.

25

Las composiciones de insulina de acción súper rápida descritas en este documento pueden conseguir una exposición sistémica prandial (por ejemplo 0-4 horas después de la administración), a insulina que es al menos o

30 aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 140 %, 160 %, 180 %, 200 %, 300 % o un 400 % mayor que la exposición sistémica después de administración parenteral de insulina en ausencia de la enzima degradante de hialuronano. Las composiciones de insulina de acción súper rápida descritas en el presente documento pueden conseguir un metabolismo de glucosa sistémico (es decir, una cuantificación de la retirada de glucosa de la sangre expresada como una velocidad (cantidad/tiempo) o la cantidad total durante un periodo de tiempo predeterminado) que es al menos o aproximadamente un 30 %, 40 %, 50 %, 60

35 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 140 %, 160 %, 180 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 % o un 400 % mayor que el metabolismo de glucosa en sangre después de la administración parenteral de insulina sin una enzima degradante de hialuronano.

Las composiciones de insulina de acción súper rápida proporcionadas en el presente documento incluyen

40 opcionalmente un agente quelante, tal como, pero sin limitación ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o etilendiaminotetraacetato. El agente quelante puede proporcionarse como un complejo con un metal a o aproximadamente a concentraciones equimolares con el mismo, tal como el complejo de agente quelante EDTA calcio. La concentración de EDTA calcio es o es de aproximadamente 0,02 mM, 0,04 mM, 0,06 mM, 0,08 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM o 20 mM.

45

Las composiciones de insulina de acción súper rápida en el presente documento incluyen generalmente cinc. La concentración de cinc típicamente es o es de aproximadamente 0,002 miligramos por 100 Unidades de insulina (mg/100 U), 0,005 mg/100 U, 0,01 mg/100 U, 0,012 mg/100 U, 0,014 mg/100 U, 0,016 mg/100 U, 0,017 mg/100 U, 0,018 mg/100 U, 0,02 mg/100 U, 0,022 mg/100 U, 0,024 mg/100 U, 0,026 mg/100 U, 0,28 mg/100 U, 0,03 mg/100 U,

50 0,04 mg/100 U, 0,05 mg/100 U, 0,06 mg/100 U, 0,07 mg/100 U, 0,08 mg/100 U o 0,1 mg/100 U. En general, las insulinas de acción rápida se formulan con cinc; la cantidad usada en el presente documento puede ser una cantidad que conserva la misma concentración de cinc cuando se combina con la enzima degradante de hialuronano. Las composiciones ejemplares pueden contener EDTA calcio y cinc a relaciones molares de o de aproximadamente 0,5:1, 1:1, 1,5:1, 2:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 300:1 o 1,000:1, tal como aproximadamente o 0,010-0,50 mg de cinc, tal como 0,017 mg de cinc por 100 U de insulina humana, y EDTA calcio 0,1 a 50 mM. Otras composiciones de insulina de acción súper rápida ejemplares contienen cinc en una relación molar de aproximadamente 1:3 con insulina de acción súper rápida y EDTA calcio a una relación molar de aproximadamente 1:3 a 10:1 para la insulina de acción rápida.

55

Las composiciones de insulina de acción súper rápida también incluyen opcionalmente un modificador de tonicidad, tal como, pero sin limitación, un aminoácido, polialcohol, tal como glicerol, y/o una sal, tal como cloruro sódico. La osmolaridad de la composición puede ser o es de aproximadamente 200 mOsm/kg, 220 mOsm/kg, 240 mOsm/kg, 260 mOsm/kg, 280 mOsm/kg, 300 mOsm/kg, 320 mOsm/kg, 340 mOsm/kg, 360 mOsm/kg, 380 mOsm/kg o 400 mOsm/kg. El pH es adecuado para administración parenteral, tal como de aproximadamente o de 5,5 a 8,5,

60 particularmente, de 6 a 8, tal como, aproximadamente o de 6, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8 o 8. Las composiciones pueden incluir opcionalmente un estabilizador para la insulina de acción rápida, un estabilizador para

65

la enzima degradante de hialuronano o ambos. Los estabilizantes incluyen, pero sin limitación, un detergente, un polialcohol, un metal, una sal, un codisolvente y/o una proteína. Son ejemplos de dichos estabilizadores albúmina de suero y/o polisorbato, a una concentración suficiente para conseguir mayor estabilidad de la composición y/o un componente. Puede incluirse albúmina de suero a una concentración de o aproximadamente de 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml o 1 mg/ml. Puede incluirse polisorbato, por ejemplo, a una concentración del 0,001 %, 0,002 %, 0,003 %, 0,004 %, 0,005 %, 0,006 %, 0,007 %, 0,008 %, 0,009 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 % o 0,1 %. Otros ingredientes opcionales incluyen, por ejemplo, un eliminador de oxígeno, tal como ácido ascórbico, ascorbato, ácido cítrico, citrato, metionina, que pueden estar a una concentración de 1 mM, 2 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM, o 20 mM, y/o albúmina y/o un conservante, tal como un compuesto que contiene un anillo aromático, por ejemplo, m-cresol o fenol.

La insulina de acción rápida puede ser, por ejemplo, monomérica o multimérica, tal como dimérica o hexamérica. La insulina es un análogo de insulina. Son ejemplos de análogos de insulina un análogo de insulina seleccionado de entre una insulina con una cadena A que contiene o que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 103 y una cadena B que contiene o que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID N° 147-149. En algunas composiciones de insulina de acción súper rápida ejemplares, la insulina de acción rápida es una insulina humana de acción rápida. Además, las composiciones de insulina de acción súper rápida pueden contener mezclas de insulinas. Las mezclas pueden ser insulinas de acción rápida, o mezclas de una insulina de acción rápida y también una insulina o insulinas de acción más lenta, tales como una insulina de acción basal.

Las enzimas degradantes de hialuronano contenidas en las composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen, por ejemplo, hialuronidasas, tales como hialuronidasas animales, incluyendo humanas, particularmente formas solubles de las mismas. Son enzimas degradantes de hialuronano ejemplares las hialuronidasas, particularmente hialuronidasas solubles, tales como una PH20, o una forma truncada de la misma. La PH20 puede ser, por ejemplo, una PH20 ovina, bovina o humana truncada. Se incluyen las que contienen o tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID N° 1-39 y 67-96 y formas truncadas de las mismas o variantes alélicas, variantes de especie u otras variantes de las mismas. La PH20 humana truncada, particularmente formas truncadas solubles, incluye cualquiera de entre los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID N° 4-9, o variantes alélicas y otras variantes de las mismas. Las variantes de las hialuronidasas típicamente tienen al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 88 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con cualquiera de las SEC ID N° 1-39 y 67-96, particularmente con formas solubles, y conservan la actividad hialuronidasa. La hialuronidasa soluble puede ser la composición que es rHuPH20.

La enzima degradante de hialuronano puede ser una condroitinasa, tal como, pero sin limitación, condroitín ABC liasa, condroitín AC liasa y condroitín C liasa. Las condroitinasas ejemplares tienen o contienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID N° 98-100, o formas truncadas de las mismas o variantes alélicas, variantes de especie y otras variantes de las mismas. Las variantes tienen típicamente al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 88 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con un polipéptido expuesto en cualquiera de SEC ID N° 98-100 o con una condroitinasa de tipo silvestre.

Las composiciones de insulina de acción súper rápida proporcionadas en el presente documento pueden formularse para administración de dosificación múltiple, o para administración de dosis individual. Las cantidades terapéuticamente eficaces ejemplares de insulina dependen de la insulina en la composición y el sujeto al que se administra la composición. Dichas cantidades de dosificación individuales incluyen, por ejemplo, exacta o aproximadamente 0,05 Unidades, 0,06 Unidades, 0,07 Unidades, 0,08 Unidades, 0,09 Unidades, 0,1 Unidades, 0,2 Unidades, 0,3 Unidades, 0,4 Unidades, 0,5 Unidades, 0,6 Unidades, 0,7 Unidades, 0,8 Unidades, 0,9 Unidades, 1 Unidad, 2 Unidades, 5 Unidades, 10 Unidades, 15 Unidades, 20 Unidades, 25 Unidades, 30 Unidades, 35 Unidades, 40 Unidades, 50 Unidades o 100 Unidades. En dichas composiciones, la cantidad de enzima degradante de hialuronano puede ser o es funcionalmente equivalente a o aproximadamente 0,3 Unidades, 0,5 Unidades, 1 Unidad, 2 Unidades, 3 Unidades, 4 Unidades, 5 Unidades, 10 Unidades, 20 Unidades, 30 Unidades, 40 Unidades, 50 Unidades, 100 Unidades, 150 Unidades, 200 Unidades, 250 Unidades, 300 Unidades, 350 Unidades, 400 Unidades, 450 Unidades, 500 Unidades, 600 Unidades, 700 Unidades, 800 Unidades, 900 Unidades o 1.000 Unidades de actividad hialuronidasa.

Las composiciones de insulina de acción súper rápida pueden formularse para suministro mediante una bomba. Se proporcionan sistemas de bucle cerrado para controlar los niveles de glucosa en sangre. Los sistemas son cualquiera conocido por los expertos en la materia, pero modificados por contener la insulina de acción rápida y la enzima degradante de hialuronano como se describe en el presente documento y la dosificación o programación adecuada para suministrar dosificaciones terapéuticas de insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano para producir una composición de insulina de acción súper rápida. Los sistemas de bucle cerrado pueden incluir un depósito que contiene una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano, donde la enzima degradante de hialuronano está presente en una cantidad suficiente para hacer que la combinación

resultante sea una composición de insulina de acción súper rápida. En otra realización se proporciona un sistema de bucle cerrado para controlar los niveles de glucosa en sangre que contiene un depósito que contiene una insulina de acción rápida y un segundo depósito que contiene una enzima degradante de hialuronano.

5 Los sistemas de bucle cerrado pueden incluir opcionalmente uno o más de un sensor de glucosa, un sistema de suministro para suministrar la enzima degradante de hialuronano e insulina de acción rápida y programa informático diseñado para integrar las funciones de bombeo y control, con lo que la enzima degradante de hialuronano y la insulina de acción rápida se suministran para conseguir un control glucémico que imita al control glucémico en un sujeto no diabético. Los sistemas de bucle cerrado también pueden contener en un depósito separado o mezclado  
10 con la insulina de acción rápida y/o hialuronano, una insulina de acción más lenta, tal como una basal. El sistema también puede incluir cualquiera de los ingredientes opcionales indicados anteriormente. La insulina de acción rápida y la enzima degradante de hialuronano pueden incluir cualquiera de las descritas anteriormente.

En el sistema de bucle cerrado, el depósito que contiene la insulina de acción rápida puede contener un número  
15 suficiente de unidades para mantener el control glucémico durante al menos medio día, un día o más y puede contener exacta o aproximadamente 0,1 Unidades, 0,2 Unidades, 0,3 Unidades, 0,4 Unidades, 0,5 Unidades, 0,6 Unidades, 0,7 Unidades, 0,8 Unidades, 0,9 Unidades, 1 Unidad, 2 Unidades, 5 Unidades, 10 Unidades, 15 Unidades, 20 Unidades, 25 Unidades, 30 Unidades, 35 Unidades, 40 Unidades, 50 Unidades, 100 Unidades, 200 Unidades, 300 Unidades, 400 Unidades, 500 Unidades, 600 Unidades, 700 Unidades, 800 Unidades, 900 Unidades,  
20 1.000 Unidades, 2.000 Unidades, 5.000 Unidades, 6.000 Unidades, 7.000 Unidades o más de insulina. El sistema de bucle cerrado puede suministrar cualquier cantidad deseada o incrementos de dosis de insulina y/o enzima degradante de hialuronano, tales como exacta o aproximadamente 0,05 Unidades, 0,1 Unidades, 0,2 Unidades, 0,3 Unidades, 0,4 Unidades, 0,5 Unidades, 0,6 Unidades, 0,7 Unidades, 0,8 Unidades, 0,9 Unidades, 1 Unidad, 2 Unidades, 5 Unidades, 10 Unidades, 15 Unidades, 20 Unidades, 25 Unidades, 30 Unidades, 35 Unidades, 40 Unidades, 50 Unidades o más de insulina por incremento. El depósito que contiene la enzima degradante de hialuronano puede contener una cantidad de enzima degradante de hialuronano que es funcionalmente equivalente a o aproximadamente 1 Unidad, 5 Unidades, 10 Unidades, 20 Unidades, 30 Unidades, 40 Unidades, 50 Unidades,  
25 100 Unidades, 150 Unidades, 200 Unidades, 250 Unidades, 300 Unidades, 350 Unidades, 400 Unidades, 450 Unidades, 500 Unidades, 600 Unidades, 700 Unidades, 800 Unidades, 900 Unidades, 1.000 Unidades, 2.000 Unidades, 3.000, 4.000 Unidades, 5.000 Unidades, 6.000 Unidades, 7.000 Unidades, 8.000 Unidades, 9.000 Unidades, 10.000 Unidades, 20.000 Unidades o más actividad hialuronidasa y puede suministrar la enzima degradante de hialuronano en incrementos de dosis individuales de una cantidad de enzima degradante de hialuronano que es funcionalmente equivalente a o aproximadamente a, por ejemplo, 0,3 Unidades, 0,5 Unidades, 1 Unidad, 2 Unidades, 3 Unidades, 5 Unidades, 10 Unidades, 20 Unidades, 30 Unidades, 40 Unidades, 50 Unidades,  
30 100 Unidades, 150 Unidades o más de actividad hialuronidasa.

También se describen combinaciones que contienen una primera composición que contiene desde o desde aproximadamente 10 U a o hasta aproximadamente 500 U de insulina, y una segunda composición que contiene suficiente cantidad de enzima degradante de hialuronano que, cuando se administra con la insulina, hace que la  
40 insulina de acción rápida sea una insulina de acción súper rápida. La cantidad suficiente de enzima degradante de hialuronano es funcionalmente equivalente a al menos o a aproximadamente 1 U/ml, 2 U/ml, 3 U/ml, 4 U/ml, 5 U/ml, 6 U/ml, 7 U/ml, 8 U/ml, 9 U/ml, 10 U/ml, 15 U/ml, 20 U/ml o 25 U de actividad hialuronidasa/ml. En algunos ejemplos, la cantidad suficiente de enzima degradante de hialuronano es funcionalmente equivalente a al menos o aproximadamente 35 U de actividad hialuronidasa/ml. Por ejemplo, la cantidad de enzima degradante de hialuronano en la segunda composición puede ser funcionalmente equivalente a o a aproximadamente 1 U/ml, 2 U/ml, 3 U/ml, 4 U/ml, 5 U/ml, 6 U/ml, 7 U/ml, 8 U/ml, 9 U/ml, 10 U/ml, 15 U/ml, 20 U/ml, 25 U/ml, 30 U/ml, 35 U/ml, 37,5 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 60 U/ml, 70 U/ml, 80 U/ml, 90 U/ml, 100 U/ml, 200 U/ml, 300 U/ml, 400 U/ml, 500 U/ml, 600 U/ml, 700 U/ml, 800 U/ml, 900 U/ml, 1.000 U/ml, 2.000 U/ml, 3.000 U/ml o 5.000 U/ml. En algunos ejemplos, la cantidad de insulina de acción rápida en la primera composición es o es de aproximadamente 10 U/ml, 20 U/ml, 30 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 60 U/ml, 70 U/ml, 80 U/ml, 90 U/ml, 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 250 U/ml, 300 U/ml, 350 U/ml, 400 U/ml, 450 U/ml o 500 U/ml.

También se describen combinaciones de una primera composición que contiene un enzima degradante de hialuronano y una segunda composición que contiene una insulina de acción rápida. Las composiciones se formulan para administración parenteral. En algunos casos, la cantidad de enzima degradante de hialuronano es suficiente si se mezcla con la segunda composición para hacer que la composición resultante sea una composición de insulina de acción súper rápida. En otros casos, la cantidad de la enzima degradante de hialuronano es suficiente si se administra antes de la administración de la primera composición para hacer que la composición de insulina de acción rápida sea una composición de insulina de acción súper rápida.  
55

En las combinaciones descritas en el presente documento, las insulinas de acción rápida y las enzimas degradantes de hialuronano y otros componentes son como se ha descrito anteriormente para las composiciones. También se describen kits que contienen las combinaciones. La composición de insulina puede formularse para administrar una dosificación prandial para una única comida, tal como, pero sin limitación, aproximadamente 0,001 U/kg, 0,005 U/kg, 0,01 U/kg, 0,02 U/kg, 0,03 U/kg, 0,04 U/kg, 0,05 U/kg, 0,06 U/kg, 0,07 U/kg, 0,08 U/kg, 0,09 U/kg, 0,10 U/kg, 0,11 U/kg, 0,12 U/kg, 0,13 U/kg, 0,14 U/kg, 0,15 U/kg, 0,20 U/kg, 0,25 U/kg, 0,30 U/kg, 0,40 U/kg, 0,50 U/kg, 1 U/kg, 1,5  
60 65

U/kg, o 2 U/kg. La cantidad de enzima degradante de hialuronano se formula para administrar al sujeto una dosis prandial para una sola comida y, por ejemplo, es o es de aproximadamente 0,3 U, 0,5 U, 1 U, 2 U, 3 U, 4 U, 5 U, 10 U, 20 U, 30 U, 40 U, 50 U, 100 U, 150 U, 200 U, 250 U, 300 U, 350 U, 400 U, 450 U, 500 U, 600 U, 700 U, 800 U, 900 U, 1.000 U, 2.000 U, 3.000 U, 4.000 U, 5.000 U o más. Las composiciones en la combinación pueden formularse para administración subcutánea.

Se describen métodos en los que se administran las composiciones de insulina de acción súper rápida y combinaciones proporcionadas en el presente documento. Típicamente, dicha administración es administración parenteral, tal como intravenosa, subcutánea o a través de cualquier vía adecuada. En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la insulina de acción rápida y la enzima degradante de hialuronano pueden administrarse por separado, de forma intermitente, o juntas en composiciones separadas o co-formuladas. También se describen métodos para controlar los niveles de glucosa en un sujeto administrando cualquiera de las composiciones de insulina de acción súper rápida o combinaciones proporcionadas en el presente documento. En algunos casos, las composiciones o combinaciones se administran como una dosificación prandial, incluyendo tal como administrando menos de o aproximadamente 20, 10, 5 minutos antes de una comida, hasta menos de o aproximadamente 10 minutos después de una comida o con la comida.

También se describen métodos que implican instruir a un paciente para que se administre una composición de insulina de acción rápida menos de o aproximadamente 20, 10, 5 minutos antes de una comida, hasta menos de o aproximadamente 30 minutos después de una comida, donde la insulina de acción rápida se co-administra con una cantidad suficiente de enzima degradante de hialuronano para hacer que la composición de insulina de acción rápida sea una composición de acción súper rápida. La insulina de acción rápida y la enzima degradante de hialuronano pueden co-formularse o proporcionarse por separado para co-administración. En dichos métodos, puede instruirse al paciente para que se administre la composición de insulina de acción rápida en o aproximadamente en el momento de ingestión de una comida. En algunos ejemplos, las instrucciones son escritas. En otros ejemplos, las instrucciones son orales.

Se describen métodos para controlar los niveles de glucosa en sangre en un sujeto, administrando a un sujeto una enzima degradante de hialuronano y una insulina de acción rápida, donde la enzima degradante de hialuronano y la insulina de acción rápida se administran en cantidades suficientes para

- a) obtener un aumento máximo en la concentración de insulina en la sangre que es al menos o aproximadamente de un 20 % a un 30 % mayor que el aumento máximo en la concentración de insulina en la sangre obtenida después de la administración de la insulina de acción rápida del mismo modo en ausencia de una enzima degradante de hialuronano; y/o
- b) reducir la cantidad de tiempo que se tarda en alcanzar la concentración de insulina máxima en la sangre hasta no más del 80 % del tiempo que se tarda en alcanzar la concentración de insulina máxima en la sangre cuando se administra la insulina de acción rápida de la misma manera en ausencia de una enzima degradante de hialuronano; y/o
- c) aumentar la concentración de insulina 15 minutos después de la administración en al menos o aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90 o 100 pmol/l.

Según los métodos, el aumento máximo de la concentración de insulina en sangre es de al menos o aproximadamente un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 140 %, 160 %, 180 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 % o 400 % mayor que el aumento máximo en la concentración de insulina en ausencia de la enzima degradante de hialuronano. El tiempo que se tarda en alcanzar la concentración máxima de insulina en la sangre puede reducirse no más de un 80 % del tiempo que se tarda en alcanzar la concentración de insulina máxima en sangre en ausencia de la enzima degradante de hialuronano. Por ejemplo, la concentración de insulina después de la administración de una dosis de 20 U de insulina 15 minutos después de la administración puede aumentarse en al menos o aproximadamente 60 pmol/l, 80 pmol/l, 100 pmol/l, 120 pmol/l, 140 pmol/l, 160 pmol/l, 180 pmol/l, o 200 pmol/l.

Los sujetos diabéticos pueden tener diabetes de Tipo 1 o de Tipo 2, y la cantidad de insulina de acción rápida administrada al sujeto se reduce en comparación con cuando se administra la insulina de acción rápida de la misma manera en ausencia de enzima degradante de hialuronano. Por ejemplo, la cantidad de insulina de acción rápida administrada a un sujeto diabético de Tipo 1 puede reducirse en al menos o aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, o más, y la cantidad de insulina de acción rápida administrada a un sujeto diabético de Tipo 2 puede reducirse en al menos o aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más.

También se describen métodos para controlar o prevenir el aumento de peso y/o la obesidad en un sujeto diabético, tal como aumento de peso asociado con la terapia de insulina prandial. Típicamente, esto se consigue administrando una enzima degradante de hialuronano y una insulina de acción rápida a una dosis que es menor que la dosis de una insulina de acción rápida cuando se administra en ausencia de una enzima degradante de hialuronano. Los sujetos diabéticos pueden ser obesos o estar en riesgo de obesidad, y pueden tener diabetes de Tipo 1, diabetes de Tipo 2, diabetes gestacional u otra diabetes. Un ejemplo de sujetos diabéticos son sujetos con diabetes de Tipo 2.

En un ejemplo, se consigue el control o la prevención de la obesidad en un sujeto diabético administrando a un sujeto diabético obeso o un sujeto diabético en riesgo de obesidad una dosificación terapéuticamente eficaz de una insulina de acción rápida en combinación con enzima degradante de hialuronano. La composición puede administrarse exacta o aproximadamente en el momento de la comida y

- 5
- a) la cantidad de enzima degradante de hialuronano es suficiente para hacer que la insulina de acción rápida administrada sea una insulina de acción súper rápida; y
  - b) la dosificación de la insulina de acción rápida consigue sustancialmente el mismo grado de eliminación de glucosa prandial durante los primeros 40 minutos después de la administración que una dosificación mayor de la misma insulina de acción rápida administrada de la misma manera en ausencia de la enzima degradante de hialuronano. La dosificación de la insulina de acción rápida en la composición de insulina de acción súper rápida, en comparación con la dosis mayor de insulina de acción rápida, tiene una tendencia reducida a provocar hipoglucemia y obesidad postprandial. Los sujetos diabéticos pueden tener diabetes de Tipo 2, y la cantidad de insulina de acción rápida administrada al sujeto puede reducirse en comparación con cuando se administra la insulina de acción rápida de la misma manera en ausencia de una enzima degradante de hialuronano. Por ejemplo, la cantidad de insulina de acción rápida administrada a un sujeto diabético de Tipo 2 puede reducirse en al menos o aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más.

20 También se describen métodos para reducir o prevenir el aumento de peso asociado con terapia de insulina prandial administrando por vía subcutánea a un sujeto diabético en riesgo de aumento de peso por terapia de insulina prandial, exacta o aproximadamente en el momento de la comida, una composición de insulina que contiene una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano, de modo que la cantidad de insulina de acción rápida administrada para tratar la hiperglucemia postprandial en el sujeto se reduce en comparación con la cantidad de la misma insulina de acción rápida requerida para tratar la hiperglucemia cuando se administra de la misma manera en ausencia de la enzima degradante de hialuronano. La cantidad reducida de insulina de acción rápida hace que la composición que contiene la enzima degradante de hialuronano tenga menos probabilidad de provocar aumento de peso en el sujeto. Por ejemplo, puede administrarse a un sujeto diabético de Tipo 2 una composición de insulina como se ha descrito anteriormente que contiene una cantidad de insulina de acción rápida que es al menos o aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % u 80 % menor que la cantidad de la misma insulina de acción rápida requerida para tratar la hiperglucemia cuando se administra de la misma manera en ausencia de la enzima degradante de hialuronano. En algunos casos, la composición de insulina se administra en un régimen crónico de terapia de insulina prandial.

35 Se describen en el presente documento métodos para reducir o prevenir el aumento de peso en un sujeto diabético administrando a un sujeto diabético en riesgo de aumento de peso por terapia de insulina prandial, un ciclo de terapia de insulina prandial subcutánea durante un periodo de al menos treinta días. Las dosificaciones de insulina prandial administradas en el transcurso de la terapia contienen una combinación de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano. La cantidad de enzima degradante de hialuronano en cada dosificación es suficiente para hacer que la insulina de acción rápida sea una composición de insulina de acción súper rápida, y la cantidad de insulina de acción rápida contenida en la dosificación para tratar la hiperglucemia postprandial del sujeto es menor que una cantidad de la misma insulina de acción rápida requerida para tratar la hiperglucemia en ausencia de la enzima degradante de hialuronano. Dicho ciclo de terapia de insulina prandial puede dar como resultado un menor aumento de peso que un ciclo similar de terapia usando dosificaciones mayores de insulina de acción rápida en ausencia de enzima degradante de hialuronano.

45 También se describen métodos para controlar los niveles de glucosa en un sujeto administrando al sujeto una dosificación prandial de composición de insulina de acción súper rápida, donde:

- a) la composición de insulina de acción súper rápida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano;
- b) la insulina de acción rápida es una insulina regular;
- c) la dosificación se administra, o se recomienda para su administración prandial o preprandial, más cercana al momento de la comida que la misma o una mayor dosificación de la misma insulina regular de acción rápida administrada por la misma vía de administración en ausencia de una enzima degradante de hialuronano; y
- d) la dosificación de la composición de insulina de acción súper rápida tiene al menos el mismo efecto terapéutico que la insulina regular de acción rápida sin la enzima degradante de hialuronano.

60 La composición de insulina de acción súper rápida por ejemplo se administra o se recomienda para su administración menos de o aproximadamente 20 minutos antes de una comida, hasta menos de o aproximadamente 10 o 20 minutos después de una comida. Típicamente, la dosificación de la insulina de acción rápida en la composición de insulina de acción súper rápida es menor o igual que la dosificación de la insulina de acción rápida administrada por la misma vía en ausencia de la enzima degradante de hialuronano.

65 En la práctica de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, las composiciones pueden administrarse por cualquier vía adecuada y usando cualquier dispositivo o recipiente adecuado, tal como mediante jeringa, bolígrafo de insulina, bomba de insulina o sistema de bucle cerrado. Las composiciones o combinaciones



pueden contener cualquiera de las insulinas de acción rápida y enzimas degradantes de hialuronano descritas anteriormente, con cualquiera de los reactivos adicionales como se han descrito anteriormente. La cantidad de insulina en la composición administrada al sujeto puede ser una dosificación prandial para una única comida y es de aproximadamente 0,001 U/kg, 0,005 U/kg, 0,01 U/kg, 0,02 U/kg, 0,05 U/kg a 0,30 U/kg, tal como 0,05 U/kg, 0,06 U/kg, 0,07 U/kg, 0,08 U/kg, 0,09 U/kg, 0,10 U/kg, 0,11 U/kg, 0,12 U/kg, 0,13 U/kg, 0,14 U/kg, 0,15 U/kg, 0,20 U/kg, 0,25 U/kg, 0,30 U/kg, 0,40 U/kg, 0,50 U/kg, 1,0 U/kg, 1,5 U/kg o 2 U/kg. La cantidad de enzima degradante de hialuronano administrada al sujeto es para coadministración (por separado, intermitentemente, o juntas en composiciones separadas o co-formuladas) con una dosificación prandial de insulina de acción rápida para una única comida. La cantidad de enzima degradante de hialuronano puede ser o es de aproximadamente 0,3 U, 0,5 U, 1 U, 2 U, 5 U, 10 U, 20 U, 30 U, 40 U, 50 U, 100 U, 150 U, 200 U, 250 U, 300 U, 350 U, 400 U, 450 U, 500 U, 600 U, 700 U, 800 U, 900 U, 1.000 U, 2.000 U, 3.000 U, 4.000 U, 5.000 U o más.

Se describen artículos de fabricación que contienen material de envasado y cualquiera de las composiciones o combinaciones de insulina de acción súper rápida dentro del material de envasado con instrucciones opcionales para administración a un sujeto diabético.

Las insulinas de acción rápida, insulinas, enzimas degradantes de hialuronano y otros componentes incluyen los descritos anteriormente.

## 20 Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** representa los perfiles farmacocinéticos del análogo de insulina de acción rápida, insulina Humalog®, y la insulina regular de acción rápida, insulina Humulin® R, cuando se administran por vía subcutánea con o sin co-administración de rHuPH20. La concentración de insulina en plasma en diversos puntos temporales después de la administración a sujetos sanos normales usando un procedimiento de Pinza Hiperinsulinémica-Euglucémica se determinó por radioinmunoensayo (RIA).

La **Figura 2** representa los perfiles farmacodinámicos del análogo de insulina de acción rápida, insulina Humalog®, y la insulina regular de acción rápida, insulina Humulin® R, cuando se administran por vía subcutánea con o sin co-administración de rHuPH20 usando un procedimiento de Pinza Hiperinsulinémica-Euglucémica. Se determinó la velocidad de infusión de glucosa que se requería para mantener los niveles de glucosa en sangre entre 90 y 110 mg/dl después de la administración de insulina a sujetos sanos normales.

### Descripción detallada

## 35 Esquema

### A. Definiciones

#### B. Insulina de "acción súper rápida"

- 40 1. Visión de conjunto de insulina, diabetes y terapias de insulina de acción rápida existentes
2. Farmacodinámica y farmacocinética de una composición de insulina de acción súper rápida

### C. Polipéptidos de insulina y formulación

#### D. Enzimas degradantes de hialuronano

45

##### 1. Hialuronidasas

###### a. Hialuronidasas de tipo mamífero

###### b. Hialuronidasas bacterianas

50

###### c. Hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos

##### 2. Otras enzimas degradantes de hialuronano

##### 3. Enzimas degradantes de hialuronano solubles

55

###### a. PH20 humana soluble

###### b. PH20 humana soluble recombinante (rHuPH20)

##### 4. Glucosilación de enzimas degradantes de hialuronano

##### 5. Modificación de enzimas degradantes de hialuronano para mejorar sus propiedades farmacocinéticas

60

### E. Métodos para producir ácidos nucleicos que codifican una hialuronidasa soluble y polipéptidos de la misma

#### 1. Vectores y células

#### 2. Restos enlazadores

#### 3. Expresión

65

- a. Células procariotas
- b. Células de levadura
- c. Células de insecto
- d. Células de mamífero
- e. Plantas

5

#### 4. Técnicas de purificación

### F. Preparación, formulación y administración de insulina y polipéptidos de hialuronidasa solubles

10

- 1. Formulaciones
- Polvos liofilizados
- 2. Dosificación y administración
- Modo de administración

15

- a. Jeringas
- b. Bolígrafo de insulina
- c. Bombas de insulina y otros dispositivos de suministro de insulina
- d. Sistema de bucle cerrado

20

### G. Métodos para evaluar la actividad, biodisponibilidad y farmacocinética

- 1. Farmacocinética, farmacodinámica y tolerabilidad
- 2. Actividad biológica

25

- a. Insulina
- b. Enzimas degradantes de hialuronano

### H. Usos terapéuticos

30

#### 1. Diabetes Mellitus

- a. Diabetes de Tipo 1
- b. Diabetes de Tipo 2
- c. Diabetes gestacional

35

#### 2. Terapia de insulina para pacientes críticamente enfermos

### I. Terapias de combinación

40

- J. Artículos de fabricación y kits
- K. Ejemplos

## A. DEFINICIONES

45

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención o las invenciones. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para términos en el presente documento, prevalecerán las de la presente sección. Cuando se haga referencia a una URL u otro identificador o dirección tal, se entiende que dichos identificadores pueden cambiar y la información particular en internet puede aparecer y desaparecer, pero puede encontrarse información equivalente buscando en internet. La referencia a la misma demuestra la disponibilidad y disseminación pública de dicha información.

50

55

Tal como se usa en el presente documento, "insulina" se refiere a una hormona, precursor o un análogo sintético o recombinante de la misma que actúa para aumentar la captación y almacenamiento de glucosa y/o reduce la producción de glucosa endógena. Se traduce una insulina humana ejemplar como un polipéptido precursor de 110 aminoácidos, proinsulina (SEC ID N°: 101), que contiene un péptido señal de 24 aminoácidos que dirige la proteína al retículo endoplásmico (RE) donde la secuencia señal se escinde, dando como resultado proinsulina (SEC ID N°: 102). La proinsulina se procesa adicionalmente para liberar el péptido de 31 aminoácidos C o de cadena conectora (correspondiente a los restos de aminoácidos 57 a 87 del polipéptido de proinsulina expuesto en SEC ID N°: 101, y a los restos de aminoácidos 33 a 63 del polipéptido de proinsulina expuesto en SEC ID N°: 102). La insulina resultante contiene una cadena A de 21 aminoácidos (correspondiente a los restos de aminoácidos 90 a 110 del polipéptido de proinsulina expuesto en SEC ID N°: 101, y a los restos de aminoácidos 66 a 86 del polipéptido de proinsulina expuesto en SEC ID N°: 102), y una cadena B de 30 aminoácidos (correspondiente a los restos de aminoácidos 25 a 54 del polipéptido de proinsulina expuesto en SEC ID N°: 101, y a los restos de aminoácidos 1 a 30 del polipéptido de proinsulina expuesto en SEC ID N°: 102) que se entrecruzan por enlaces disulfuro. Una insulina humana entrecruzada de forma apropiada contiene tres enlaces disulfuro: uno entre la

65

posición 7 de la cadena A y la posición 7 de la cadena B, un segundo entre la posición 20 de la cadena A y la posición 19 de la cadena B, y un tercero entre las posiciones 6 y 11 de la cadena A. La referencia a insulina incluye polipéptidos de preproinsulina, proinsulina e insulina en formas monocatenarias o bicatenarias, formas truncadas de las mismas que tienen actividad e incluye variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de corte y empalme y otras variantes, tales como análogos de insulina, incluyendo polipéptidos que tienen al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con el polipéptido precursor expuesto en SEC ID N°: 101 o la forma madura del mismo. Los análogos de insulina ejemplares incluyen los expuestos en las SEC ID N°: 147-149, 152 y los que contienen una cadena A expuesta en las SEC ID N°: 150, 156, 158, 160, 162 y 164 y/o una cadena B expuesta en las SEC ID N°: 151, 153-155, 157, 159, 161, 163 y 165.

Los polipéptidos de insulina ejemplares son aquellos de origen mamífero, incluyendo humano. Se exponen secuencias de aminoácidos de insulina de origen humano en las SEC ID N°: 101-104. Los análogos de insulina ejemplares incluyen aquellos expuestos en las SEC ID N°: 147-149, 152 y los que contienen una cadena A expuestas en las SEC ID N°: 150, 156, 158, 160, 162 y 164 y/o una cadena B expuestas en las SEC ID N°: 151, 153-155, 157, 159, 161, 163 y 165. Los polipéptidos de insulina también incluyen cualquiera de origen no humano incluyendo, pero sin limitación, cualquiera de los polipéptidos precursores de insulina expuestos en las SEC ID N°: 105-146. La referencia a una insulina incluye insulinas monoméricas y multiméricas, incluyendo insulinas hexaméricas, así como insulinas humanizadas.

Tal como se usa en el presente documento "insulina acción rápida" se refiere a cualquier insulina o composición de insulina de acción rápida para administración aguda a un sujeto diabético en respuesta a una afección hiperglucémica real, percibida o anticipada en el sujeto que surge en el momento de, o en un periodo de aproximadamente cuatro horas después de, la administración de la insulina de acción rápida (tal como una afección hiperglucémica prandial resultante de o que se anticipa que resulta de, el consumo de una comida), por lo que la insulina de acción rápida es capaz de prevenir, controlar o aliviar la afección hiperglucémica aguda. Típicamente una composición de insulina de acción rápida muestra niveles de insulina máximos transcurridas exacta o aproximadamente no más de cuatro horas después de la administración subcutánea a un sujeto. Las composiciones de insulina de acción rápida incluyen insulinas recombinantes e insulinas aisladas (también denominadas insulinas "regulares") tales como la insulina comercializada como Humulin® R, insulinas porcinas o insulinas bovinas, así como análogos de insulina diseñados para ser de acción rápida según los cambios de aminoácidos. Las preparaciones de insulina regulares ejemplares incluyen, pero sin limitación, insulinas regulares humanas, tales como las que se venden con las marcas comerciales Humulin® R, Novolin® R y Velosulin®, insulina humana, inyección de USP e insulina humana, USP, así como formulaciones ácidas de insulina, tales como, por ejemplo, insulina Toronto, insulina Antigua e insulina Transparente, e insulinas de cerdo regulares, tales como Iletin II® (insulina porcina). Los análogos de insulina de acción rápida ejemplares incluyen, por ejemplo, insulina lispro (por ejemplo insulina Humalog®), insulina aspart (por ejemplo, insulina NovoLog®) e insulina glulisina (por ejemplo insulina Apidra®), la composición de insulina de acción rápida comercializada como VIAject® y VIAtab® (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 7.279.457). Aunque la expresión "insulina de acción rápida" no abarca "insulinas de acción basal", las composiciones de insulina de acción súper rápida descritas en el presente documento pueden incluir opcionalmente, además de una insulina de acción rápida, una o más insulinas de acción basal.

Tal como se usa en el presente documento, una insulina humana, se refiere a una insulina que es sintética o se produce de forma recombinante basándose en el polipéptido humano, incluyendo variantes alélicas y análogos del mismo.

Tal como se usan en el presente documento, las insulinas humanas de acción rápida o composiciones de insulina de acción rápida humana incluyen cualquier insulina humana o composición de una insulina humana que sea de acción rápida, pero excluye insulinas no humanas, tales como insulina regular de cerdo.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "insulinas de acción basal" o "insulinas basales" se refieren a las insulinas administradas para mantener un nivel de insulina basal como parte de un régimen de tratamiento general para tratar una afección crónica tal como diabetes. Típicamente, una insulina de acción basal se formula para mantener un nivel de insulina aproximadamente en estado estacionario mediante la liberación controlada de insulina cuando se administra periódicamente (por ejemplo una vez o dos veces al día). Las insulinas de acción basal incluyen insulinas cristalinas (por ejemplo NPH y Lente®, insulina protamina, insulina surfen), análogos de insulina basal (insulina glargina, HOE 901, NovoSol Basal) y otras formulaciones químicas de la insulina (por ejemplo, suspensiones en goma arábica, lecitina u oleosas) que retardan la velocidad de absorción de la insulina regular. Tal como se usa en el presente documento, las insulinas de acción basal pueden incluir insulinas que se entiende típicamente que son de acción prolongada (alcanzando típicamente una concentración máxima relativamente baja, teniendo a la vez una duración máxima de acción por encima de aproximadamente 20-30 horas) o acción intermedia (provocando típicamente concentraciones de insulina máxima aproximadamente a las 4-12 horas después de la administración).

Tal como se usa en el presente documento, "composición de insulina de acción súper rápida" se refiere a una composición de insulina que contiene una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano (tal como una hialuronidasa soluble, incluyendo pero sin limitación, preparaciones de rHuPH20), de modo que la composición de insulina, durante los primeros cuarenta minutos después de la administración parenteral a un sujeto, proporcione una exposición de insulina sistémica acumulada en el sujeto que es mayor que la exposición de insulina sistémica acumulada proporcionada al sujeto durante el mismo periodo después de administrar la misma dosificación de la misma insulina de acción rápida, por la misma vía, en ausencia de la enzima degradante de hialuronano. La composición de insulina de acción súper rápida como se describe en el presente documento puede incluir opcionalmente una insulina de acción basal.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "afección hiperglucémica" o "hiperglucemia" se refieren a una elevación no deseada de glucosa en sangre.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "afección hipoglucémica" o "hipoglucemia" se refiere a una disminución no deseada de glucosa en sangre.

Tal como se usa en el presente documento, "eliminación de glucosa sistémica" o "metabolismo de glucosa sistémico" se refiere a la retirada de glucosa de la sangre y puede expresarse como una velocidad (cantidad/tiempo) o como una cantidad (cantidad durante un periodo de tiempo). La eliminación de glucosa sistémica puede determinarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la eliminación de glucosa sistémica puede medirse usando el procedimiento de Pinza Hiperinsulinémica-Euglicémica en condiciones de ayuno, tales como las ejemplificadas y descritas en el presente documento, donde la cantidad o velocidad de glucosa infundida por vía intravenosa para mantener los niveles de glucosa en sangre constantes, tales como, por ejemplo, 90-110 mg/dl, sea equivalente a la eliminación de glucosa sistémica. La diferencia en la eliminación de glucosa sistémica conseguida por diferentes composiciones de insulina, tales como la diferencia en la eliminación de glucosa sistémica conseguida mediante la administración de una composición de insulina de acción súper rápida frente a la conseguida por una insulina de acción rápida, puede determinarse por lo tanto usando dichos procedimientos. La diferencia en la eliminación de glucosa sistémica entre insulinas comparadoras también puede determinarse midiendo la actividad reductora de glucosa relativa de las insulinas comparadoras en un punto temporal dado después de un ensayo de exposición a glucosa. Por ejemplo, un ensayo de exposición a glucosa (tal como, por ejemplo, un ensayo de tolerancia a glucosa oral de 75 g o una formulación de alimento de ensayo normalizada, bien conocida por los expertos en la materia) puede usarse para comparar diferentes preparaciones de insulina. En dichos ensayos de exposición, se administra una cantidad de glucosa u otro carbohidrato a un sujeto, inmediatamente seguido de una administración parenteral no intravenosa de la composición de insulina. Los niveles de glucosa en sangre (es decir, concentración de glucosa en la sangre del sujeto) se mide después en un momento predeterminado para determinar el efecto reductor de la insulina en sangre. En estas comparaciones de exposición oral entre diversas preparaciones de insulina, el tiempo transcurrido después del cual se miden los niveles de glucosa en sangre debe ser adecuado para permitir la captación de glucosa sistémica. Los estudios descritos anteriormente para determinar la eliminación de glucosa sistémica pueden realizarse usando modelos animales y/o sujetos humanos.

Tal como se usa en el presente documento, el control glucémico o "control de los niveles de glucosa en sangre" se refiere al mantenimiento de las concentraciones de glucosa en sangre a un nivel deseado, típicamente entre 70 y 130 mg/dl o 90-110 mg/dl.

Tal como se usa en el presente documento, "exposición de insulina sistémica acumulativa" o "exposición sistémica acumulativa a insulina" se refiere a la cantidad de insulina que ha sido absorbido en la sangre después de la administración parenteral de la insulina. La exposición sistémica acumulativa a insulina puede determinarse calculando el área bajo la curva para un periodo de tiempo específico, donde la curva se genera representando la concentración de insulina en sangre, suero o plasma en función del tiempo.

Tal como se usa en el presente documento, un sistema de bucle cerrado es un sistema integrado para proporcionar un control glucémico continuo. Los sistemas de bucle cerrado contienen un mecanismo para medir la glucosa en sangre, un mecanismo para suministrar una o más composiciones, incluyendo una composición de insulina, y un mecanismo para determinar la cantidad de insulina que es necesario suministrar para conseguir el control glucémico. Típicamente, por lo tanto, los sistemas de bucle cerrado contienen un sensor de glucosa, un dispositivo de suministro de insulina, tal como una bomba de insulina, y un controlador que recibe información del sensor de glucosa y proporciona órdenes al dispositivo de suministro de insulina. Las órdenes pueden generarse por un programa informático en el controlador. El programa informático típicamente incluye un algoritmo para determinar la cantidad de insulina que se requiere suministrar para conseguir el control glucémico, basándose en los niveles de glucosa en sangre detectados por el sensor de glucosa o anticipados por el usuario.

Tal como se usa en el presente documento, el régimen de dosificación se refiere a la cantidad de insulina administrada y la frecuencia de administración. El régimen de dosificación está en función de la enfermedad o afección para tratar, y por lo tanto puede variar.

Tal como se usa en el presente documento, una enzima degradante de hialuronano se refiere a una enzima que cataliza la escisión de un polímero de hialuronano (también denominado ácido hialurónico o HA) en fragmentos de menor peso molecular. Son enzimas degradantes de hialuronano ejemplares las hialuronidasas, y condroitinasas y liasas particulares que tienen la capacidad de despolimerizar el hialuronano. Las condroitinasas ejemplares que son enzimas degradantes de hialuronano incluyen, pero sin limitación, condroitín ABC liasa (también conocida como condroitinasa ABC), condroitín AC liasa (también conocido como condroitín sulfato liasa o condroitín sulfato eliminasa) y condroitín C liasa. La condroitín ABC liasa comprende dos enzimas, condroitín-sulfato-ABC endoliasa (CE 4.2.2.20) y condroitín-sulfato-ABC exoliasa (EC 4.2.2.21). Unas condroitín-sulfato-ABC endoliasas y condroitín-sulfato-ABC exoliasas incluyen, pero sin limitación, las de *Proteus vulgaris* y de *Flavobacterium heparinum* (la condroitín-sulfato-ABC endoliasa de *Proteus vulgaris* se expone en SEC ID N°: 98; Sato *et al.* (1994) Appl Microbiol. Biotechnol. 41 (1):39-46). Las enzimas condroitinasa AC ejemplares de las bacterias incluyen, pero sin limitación, las de *Flavobacterium heparinum*, *Victivallis vadensis*, expuestas en SEC ID N°: 99, y *Arthrobacter aureus* (Tkalec *et al.* (2000) Applied and Environmental Microbiology 66(1):29-35; Ernst *et al.* (1995) Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30(5):387-444). Las enzimas condroitinasas C ejemplares de las bacterias incluyen, pero sin limitación, las de *Streptococcus* y *Flavobacterium* (Hibi *et al.* (1989) FEMS-Microbiol-Lett. 48(2):121-4; Michelacci *et al.* (1976) J. Biol. Chem.251:1154-8; Tsuda *et al.* (1999) Eur. J. Biochem. 262:127-133).

Tal como se usa en el presente documento, la hialuronidasa se refiere a una clase de enzimas degradantes de hialuronano. Las hialuronidasas incluyen hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.2.1 o EC 4.2.99.1), hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos (EC 3.2.1.36) e hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35). Las hialuronidasas incluyen cualquiera de origen no humano incluyendo, pero sin limitación, murinas, caninas, felinas, leporinas, aviares, bovinas, ovinas, porcinas, equinas, piscinas, raninas, bacterianas y cualquiera de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas no humanas ejemplares incluyen hialuronidasas de vacas (SEC ID N°: 10, 11, 64 y BH55 (Patentes de Estados Unidos N° 5.747.027 y 5.827.721), avispa amarilla (SEC ID N°: 12 y 13), abeja melífera (SEC ID N°: 14), *Dolichovespula maculata* (SEC ID N°: 15), avispa cartonera (SEC ID N°: 16), ratón (SEC ID N°: 17-19, 32), cerdo (SEC ID N°: 20-21), rata (SEC ID N°: 22-24, 31), conejo (SEC ID N°: 25), oveja (SEC ID N°: 26, 27, 63 y 65), orangután (SEC ID N°: 28), mono cynomolgus (SEC ID N°: 29), cobaya (SEC ID N°: 30), *Arthrobacter* sp. (cepa FB24) (SEC ID N°: 67), *Bdellovibrio bacteriovorus* (SEC ID N°: 68), *Propionibacterium acnes* (SEC ID N°: 69), *Streptococcus agalactiae* ((SEC ID N°: 70); 18RS21 (SEC ID N°: 71); serotipo Ia (SEC ID N°: 72); serotipo III (SEC ID N°: 73)), *Staphylococcus aureus* (cepa COL) (SEC ID N°: 74); cepa MRSA252 (SEC ID N°: 75 y 76); cepa MSSA476 (SEC ID N°: 77); cepa NCTC 8325 (SEC ID N°: 78); cepa RF122 bovina (SEC ID N°: 79 y 80); cepa USA300 (SEC ID N°: 81), *Streptococcus pneumoniae* ((SEC ID N°: 82); cepa ATCC BAA-255/R6 (SEC ID N°: 83); serotipo 2, cepa D39/NCTC 7466 (SEC ID N°: 84), *Streptococcus pyogenes* (serotipo M1) (SEC ID N°: 85); serotipo M2, cepa MGAS10270 (SEC ID N°: 86); serotipo M4, cepa MGAS10750 (SEC ID N°: 87); serotipo M6 (SEC ID N°: 88); serotipo M12, cepa MGAS2096 (SEC ID N°: 89 y 90); serotipo M12, cepa MGAS9429 (SEC ID N°: 91); serotipo M28 (SEC ID N°: 92); *Streptococcus suis* (SEC ID N°: 93-95); *Vibrio fischeri* (cepa ATCC 700601/ES114 (SEC ID N°: 96)), y la enzima hialuronidasa de *Streptomyces hyaluronolyticus*, que es específica para el ácido hialurónico y no escinde condroitina o condroitina sulfato (Ohya, T. y Kaneko, Y. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198:607). Las hialuronidasas también incluyen las de origen humano. Las hialuronidasas humanas ejemplares incluyen HYAL1 (SEC ID N°: 36), HYAL2 (SEC ID N°: 37), HYAL3 (SEC ID N°: 38), HYAL4 (SEC ID N°: 39), y PH20 (SEC ID N°: 1). También se incluyen entre las hialuronidasas hialuronidasas solubles, incluyendo, PH20 ovina y bovina, PH20 humana soluble y rHuPH20 soluble. Son ejemplos de hialuronidasas solubles bovinas u ovinas disponibles en el mercado Vitrase® (hialuronidasa ovina) y Amphadase® (hialuronidasa bovina).

La referencia a enzimas degradantes de hialuronano incluye polipéptidos precursores de enzimas degradantes de hialuronano y polipéptidos maduros de enzimas degradantes de hialuronano (tales como aquellos a los que se ha retirado una secuencia señal), formas truncadas de los mismos que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de corte y empalme y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con los polipéptidos precursores expuestos en las SEC ID N°: 1 y 10-48, 63-65, 67-100 o la forma madura de los mismos. Por ejemplo, la referencia a enzima degradante de hialuronano también incluye las variantes de polipéptidos precursores de PH20 humana expuestas en las SEC ID N°: 50-51. Las enzimas degradantes de hialuronano también incluyen las que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y las que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, pegilación, albuminación, glucosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones polipeptídicas conocidas en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, una hialuronidasa soluble se refiere a un polipéptido caracterizado por su solubilidad en condiciones fisiológicas. Las hialuronidasas solubles pueden distinguirse, por ejemplo, por su reparto en la fase acuosa de una solución de Triton X-114 calentada a 37 °C (Bordier *et al.*, (1981) J. Biol. Chem., 256: 1604-7). Las hialuronidasas ancladas a membrana, tales como las ancladas a lípidos, se repartirán en la fase rica en detergente, pero se repartirán en la fase acuosa o escasa en detergente después del tratamiento con Fosfolipasa C. Se incluyen entre las hialuronidasas solubles las hialuronidasas ancladas a membrana en las que una o más regiones asociadas con el anclaje de la hialuronidasa a la membrana se ha retirado o modificado, donde la forma soluble conserva la actividad hialuronidasa. Las hialuronidasas solubles incluyen hialuronidasas solubles recombinantes y las contenidas en o purificadas a partir de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, extractos de

testículo de ovejas o vacas. Son ejemplos de dichas hialuronidasas solubles las PH20 humanas solubles. Otras hialuronidasas solubles incluyen PH20 ovina (SEC ID N°: 27, 63, 65) y bovina (SEC ID N°: 11, 64).

5 Tal como se usa en el presente documento, PH20 humana soluble o sHuPH20 incluye polipéptidos maduros que carecen de todo o una parte del sitio de unión a glucosilfosfatidilinositol (GPI) en el extremo C terminal de modo que tras la expresión, los polipéptidos son solubles. Los polipéptidos sHuPH20 ejemplares incluyen polipéptidos maduros que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC ID N°: 4-9 y 47-48. Los polipéptidos precursores para dichos polipéptidos de sHuPH20 ejemplares incluyen una secuencia señal. Son precursores ejemplares los expuestos en las SEC ID N°: 3 y 40-46, cada uno de los cuales contiene una secuencia  
10 señal de 35 aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1-35. Los polipéptidos de HuPH20 solubles también incluyen los degradados durante o después de los métodos de producción y purificación descritos en el presente documento.

15 Tal como se usa en el presente documento, la PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20) se refiere a una forma soluble de PH20 humana que se expresa de forma recombinante en células de Ovario de Hámster Chino (CHO). La rHuPH20 está codificada por un ácido nucleico que incluye la secuencia señal y se expone en SEC ID N°: 49. También se incluyen moléculas de ADN que son variantes alélicas de las mismas y otras variantes solubles. El ácido nucleico que codifica rHuPH20 se expresa en células CHO que secretan el polipéptido maduro. Como se produce en el medio de cultivo, hay heterogeneidad en el extremo C terminal de modo que el producto incluye una  
20 mezcla de especies que pueden incluir una cualquiera o más de SEC ID N° 4-9 en diversas abundancias. También se incluyen variantes alélicas correspondientes y otras variantes, incluyendo las correspondientes a los polipéptidos precursores de PH20 humana expuestos en SEC ID N°: 50-51. Otras variantes pueden tener un 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con cualquiera de las SEC ID N°: 4-9 y 47-48 siempre que conserven una actividad hialuronidasa y sean solubles.

25 Tal como se usa en el presente documento, la actividad se refiere a una actividad o actividades funcionales de un polipéptido o parte del mismo asociadas con una proteína de longitud completa (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,  
30 capacidad para formar multímeros y la capacidad para unirse específicamente con un receptor o ligando para el polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento, la actividad hialuronidasa se refiere a la capacidad para catalizar de forma enzimática la escisión del ácido hialurónico. El ensayo de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) XXII para hialuronidasa determina la actividad hialuronidasa de forma indirecta midiendo la cantidad de sustrato de ácido  
35 hialurónico de mayor peso molecular, o hialuronano (HA), que permanece después de que se permite que la enzima reaccione con el HA durante 30 minutos a 37 °C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Puede usarse una solución de Patrón de Referencia en un ensayo para determinar la actividad relativa, en unidades, de cualquier hialuronidasa. Se conocen en la técnica ensayos *in vitro* para  
40 determinar la actividad hialuronidasa de hialuronidasas, tales como rHuPH20 soluble, y se describen en el presente documento. Los ensayos ejemplares incluyen el ensayo de microturbidez descrito posteriormente (véase por ejemplo el Ejemplo 3) que mide la escisión del ácido hialurónico por hialuronidasa indirectamente detectando el precipitado insoluble formado cuando el ácido hialurónico no escindido se une con la albúmina de suero. Pueden usarse Patrones de Referencia, por ejemplo, para generar una curva patrón para determinar la actividad en  
45 unidades de la hialuronidasa que se ensaya.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad funcionalmente equivalente" o variaciones gramaticales de la misma, con referencia a una enzima degradante de hialuronano, se refiere a la cantidad de enzima degradante de hialuronano que consigue el mismo efecto que una cantidad (tal como una cantidad conocida de unidades de actividad de hialuronidasa) de una enzima de referencia, tal como una hialuronidasa. Por ejemplo, la actividad de cualquier enzima degradante de hialuronano puede compararse con la actividad de rHuPH20 para  
50 determinar la cantidad funcionalmente equivalente de una enzima degradante de hialuronano que conseguiría el mismo efecto que una cantidad conocida de rHuPH20. Por ejemplo, la capacidad de un enzima degradante de hialuronano para actuar como un agente de dispersión o difusión puede evaluarse inyectándolo en la piel lateral de ratones con azul de tripano (véase por ejemplo Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20050260186), y puede determinarse la cantidad de enzima degradante de hialuronano requerida para conseguir la misma cantidad de difusión que, por ejemplo, 100 unidades de un Patrón de Referencia de hialuronidasa. La cantidad de enzima degradante de hialuronano requerida es, por lo tanto, funcionalmente equivalente a 100 unidades. En otro ejemplo,  
55 la capacidad de una enzima degradante de hialuronano para aumentar el nivel y velocidad de absorción de una insulina coadministrada puede evaluarse en sujetos humanos, tal como se describe posteriormente en el Ejemplo 1, y puede determinarse la cantidad de enzima degradante de hialuronano requerida para conseguir el mismo aumento en el nivel y tasa de absorción de insulina que, por ejemplo, la cantidad administrada de rHuPH20 (tal como evaluando la concentración de insulina máxima en la sangre ( $C_{m\acute{a}x}$ ), el tiempo requerido para conseguir la concentración de insulina máxima en la sangre ( $t_{m\acute{a}x}$ ) y la exposición a insulina sistémica acumulada durante un periodo de tiempo dado (ABC).  
65

Tal como se usa en el presente documento, los restos de aminoácidos  $\alpha$  de origen natural son los restos de los 20 aminoácidos  $\alpha$  hallados en la naturaleza que se incorporan a una proteína mediante el reconocimiento específico de la molécula de ARNt cargada con su codón de ARNm afin en seres humanos.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, los ácidos nucleicos incluyen ADN y ARN y análogos de los mismos, incluyendo ácidos péptido nucleicos (APN) y mezclas de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser mono o bicatenarios. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, que están opcionalmente marcados, tal como con un marcador detectable, tal como un marcador fluorescente o un radiomarcador, se contemplan moléculas monocatenarias. Dichas moléculas son típicamente de una longitud tal que su diana es estadísticamente única o de 10 un número de copias bajo (típicamente menos de 5, generalmente menos de 3) para sondear o cebar una biblioteca. En general, una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria a o idéntica a un gen de interés. Las sondas y cebadores pueden ser de 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de longitud.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, un péptido se refiere a un polipéptido que es de longitud mayor o igual a dos aminoácidos, y de longitud menor o igual a 40 aminoácidos.

20 Tal como se usa en el presente documento, los aminoácidos que aparecen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento se identifican de acuerdo con sus abreviaturas de tres letras o una letra conocidas (Tabla 1). Los nucleótidos que aparecen en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones de una única letra convencionales usadas habitualmente en la técnica.

25 Tal como se usa en el presente documento, un "aminoácido" es un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo de ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para los fines del presente documento, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos de origen natural, aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos en los que el carbono  $\alpha$  tiene una cadena lateral).

30 Tal como se usa en el presente documento, "resto de aminoácido" se refiere a un aminoácido formado tras la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Se supone que los restos de aminoácidos descritos en el presente documento están en la forma isomérica "L". Los restos en la forma isomérica "D", que se designan de este modo, pueden sustituir cualquier resto de aminoácido L siempre que se conserve la propiedad funcional deseada por el polipéptido. NH<sub>2</sub> se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino terminal de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxilo libre presente en el extremo carboxilo terminal de un polipéptido. Acorde con la nomenclatura de polipéptidos convencional descrita en J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968), y 35 adoptada 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, se muestran abreviaturas para restos de aminoácidos en la Tabla 1:

**Tabla 1 - Tabla de correspondencia**

| SÍMBOLO |          |              |
|---------|----------|--------------|
| 1-Letra | 3-Letras | AMINOÁCIDO   |
| Y       | Tyr      | Tirosina     |
| G       | Gly      | Glicina      |
| F       | Phe      | Fenilalanina |
| M       | Met      | Metionina    |
| A       | Ala      | Alanina      |
| S       | Ser      | Serina       |
| I       | Ile      | Isoleucina   |
| L       | Leu      | Leucina      |
| T       | Thr      | Treonina     |
| V       | Val      | Valina       |
| P       | Pro      | prolina      |
| K       | Lys      | Lisina       |
| H       | His      | Histidina    |
| Q       | Gln      | Glutamina    |

| SÍMBOLO |          |                    |
|---------|----------|--------------------|
| 1-Letra | 3-Letras | AMINOÁCIDO         |
| E       | Glu      | ácido glutámico    |
| Z       | Glx      | Glu y/o Gln        |
| W       | Trp      | Triptófano         |
| R       | Arg      | Arginina           |
| D       | Asp      | ácido aspártico    |
| N       | Asn      | asparagina         |
| B       | Asx      | Asn y/o Asp        |
| C       | Cys      | Cisteína           |
| X       | Xaa      | Desconocido u otro |

Debería observarse que todas las secuencias de restos de aminoácidos representadas en el presente documento por fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de amino terminal a carboxilo terminal. Además, se define en general que la expresión “resto de aminoácido” incluye los aminoácidos enumerados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 1) y aminoácidos modificados y no habituales, tales como los indicados en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, e incorporados en el presente documento por referencia. Además, debería observarse que un guion al comienzo o final de una secuencia de restos de aminoácidos indica un enlace peptídico con una secuencia adicional de uno o más restos de aminoácidos, con un grupo amino terminal tal como NH<sub>2</sub> o con un grupo carboxilo terminal tal como COOH.

Tal como se usa en el presente documento, “aminoácidos de origen natural” se refiere a los 20 aminoácidos L que aparecen en polipéptidos.

Tal como se usa en el presente documento, “aminoácido no natural” se refiere a un compuesto orgánico que tiene una estructura similar a un aminoácido natural pero que se ha modificado estructuralmente para imitar la estructura y reactividad de un aminoácido natural. Los aminoácidos de origen no natural incluyen por lo tanto, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos de origen natural e incluyen, pero sin limitación, los isoestereómeros D de aminoácidos. Se describen en el presente documento aminoácidos no naturales ejemplares y se conocen por los expertos en la materia.

Tal como se usa en el presente documento, una construcción de ADN es una molécula de ADN lineal o circular, mono o bicatenaria, que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera no hallada en la naturaleza. Las construcciones de ADN existen como resultado de la manipulación humana e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.

Tal como se usa en el presente documento, un segmento de ADN es una parte de una molécula de ADN mayor que tiene atributos específicos. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido específico es una parte de una molécula de ADN mayor, tal como un plásmido o fragmento plasmídico, que, cuando se lee en la dirección 5' a 3', codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido específico.

Tal como se usa en el presente documento, el término polinucleótido significa un polímero mono o bicatenario de desoxirribonucleótidos o bases ribonucleotídicas leídas del extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse a partir de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro*, o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula polinucleotídica se proporciona en el presente documento con respecto a nucleótidos (abreviado “nt”) o pares de bases (abreviado “pb”). El término nucleótido se usa para moléculas mono y bicatenarias donde el contexto lo permita. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias se usa para indicar longitud general y se entenderá que es equivalente a la expresión pares de bases. Se reconocerá por los expertos en la materia que las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en su longitud y que los extremos de las mismas pueden estar escalonados; por lo tanto todos los nucleótidos dentro de una molécula polinucleotídica bicatenaria pueden no estar emparejados. Dichos extremos no emparejados no excederán, en general, de 20 nucleótidos de longitud.

Tal como se usa en el presente documento, “similitud” entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud puede basarse en el grado de identidad y/u homología de secuencias de restos y los restos contenidos en las mismas. Se conocen por los expertos en la materia métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, en un método para evaluar la similitud de secuencia, se alinean dos secuencias de



aminoácidos o nucleótidos de manera que produzcan un nivel máximo de identidad entre las secuencias. "Identidad" se refiere al grado en que las secuencias de aminoácidos o nucleótidos son invariantes. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos, y en cierto grado las secuencias de nucleótidos, también tiene en cuenta diferencias conservativas y/o sustituciones frecuentes en aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservativas son aquellas que conservan las propiedades físico químicas de los restos implicados. Los alineamientos pueden ser globales (alineamiento de las secuencias comparadas sobre la longitud completa de las secuencias e incluyendo todos los restos) o locales (el alineamiento de una parte de las secuencias que incluye solamente la región o las regiones más similares).

La "identidad" en sí misma tiene un significado reconocido en la técnica y puede calcularse usando técnicas publicadas. (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, Parte I, 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). Aunque existen varios métodos para medir la identidad entre dos polinucleótidos o polipéptidos, el término "identidad" se conoce bien por los expertos en la materia (Carillo, H. y Lipton, D., SIAM J Applied Math 48: 1073 (1988)).

Tal como se usa en el presente documento, homólogo (con respecto a secuencias de ácido nucleico y/o aminoácidos) significa aproximadamente mayor que o igual al 25 % de homología de secuencia, típicamente mayor que o igual al 25 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %; el porcentaje preciso puede especificarse si es necesario. Para los fines del presente documento los términos "homología" e "identidad" se usan con frecuencia de forma intercambiable, a no ser que se indique de otro modo. En general, para la determinación del porcentaje de homología o identidad, se alinean secuencias de modo que se obtenga la coincidencia de mayor orden (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, Parte I, 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) SIAM J Applied Math 48: 1073). Mediante homología de secuencia, se determina el número de aminoácidos conservados por programas de algoritmos de alineamiento convencionales, y pueden usarse con penalizaciones de hueco por defecto establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas hibridarían típicamente a rigurosidad moderada o a alta rigurosidad por toda la longitud del ácido nucleico de interés. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que contienen codones degradados en lugar de codones en la molécula de ácido nucleico que hibrida.

Si dos moléculas cualesquiera tienen secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos que son al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % "idénticas" u "homólogas" puede determinarse 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. USA 85: 2444 (otros programas incluyen el paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12(I): 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 Carillo *et al.* (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073). Por ejemplo, la función BLAST de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica 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 Grupo de Informática Genética de la Universidad de Wisconsin (UWG) (Madison WI). El porcentaje de homología o identidad de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico puede determinarse, por ejemplo, comparando la información de secuencia usando un programa informático GAP (por ejemplo, Needleman *et al.* (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, como se revisa en Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482). Brevemente, 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 unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov *et al.* (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745, como se describe en Schwartz y Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para huecos de los extremos.

Por lo tanto, tal como se usa en el presente documento, el término "identidad" u "homología" representa una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de ensayo y uno de referencia. Tal como se usa en el presente documento, la expresión al menos "un 90 % idéntico a" se refiere a porcentajes de identidad del 90 al 99,99 en relación a la secuencia de ácido nucleico o aminoácidos de referencia del polipéptido. La identidad a un nivel del 90 % o más es indicativa del hecho de que, suponiendo para fines de ejemplificación que se comparan un polipéptido de ensayo y de referencia de una longitud 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 solo en la longitud completa de un polipéptido o pueden agruparse en una o más localizaciones de diversas longitudes hasta el máximo permisible, por ejemplo diferencia de 10/100 aminoácidos (de aproximadamente 90 % de identidad). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácido nucleico o aminoácidos. Al nivel de homologías o identidades por encima de
- 5 aproximadamente 85-90 %, el resultado debería ser independiente del programa y los parámetros de hueco expuestos; dichos altos niveles de identidad pueden evaluarse fácilmente, con frecuencia mediante alineamiento manual sin depender de un programa informático.
- Tal como se usa en el presente documento, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similitud y/o
- 10 identidad) para alinear posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Típicamente, se alinean dos o más secuencias que están relacionadas por un 50 % o más de identidad. Un conjunto de secuencias alineadas se refiere a 2 o más secuencias que se alinean en posiciones correspondientes y puede incluir alinear secuencias derivadas de ARN, tales como EST y otros ADNc, alineados con secuencia de ADN genómico.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, “cebador” se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede actuar como un punto de inicio de la síntesis de ADN dirigida por molde en condiciones apropiadas (por ejemplo, en presencia de cuatro nucleósido trifosfatos diferentes y un agente de polimerización, tal como ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Se apreciará que una determinada molécula de ácido nucleico puede actuar como una “sonda” y como un “cebador”. Un cebador, sin
- 20 embargo, tiene un grupo hidroxilo 3’ para extensión. Un cebador puede usarse en una diversidad de métodos, incluyendo, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR de transcriptasa inversa (RT), PCR de ARN, LCR, PCR múltiple, PCR saliente (*panhandle*), PCR de captura, PCR de expresión, RACE 3’ y 5’, PCR in situ, PCR mediada por ligamiento y otros protocolos de amplificación.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, “par de cebadores” se refiere a un conjunto de cebadores que incluye un cebador 5’ (cadena arriba) que hibrida con el extremo 5’ de una secuencia para amplificar (por ejemplo por PCR) y un cebador 3’ (cadena abajo) que hibrida con el complemento del extremo 3’ de la secuencia a amplificar.
- Tal como se usa en el presente documento, “hibrida específicamente” se refiere a la hibridación, por formación de
- 30 pares de bases complementarias, de una molécula de ácido nucleico (un oligonucleótido) con una molécula de ácido nucleico diana. Los expertos en la materia están familiarizados con parámetros *in vitro* e *in vivo* que afectan a la hibridación específica, tal como longitud y composición de la molécula particular. Los parámetros particularmente relevantes para hibridación *in vitro* incluyen además temperatura de hibridación y lavado, composición del tampón y concentración salina. Son condiciones de lavado ejemplares para retirar moléculas de ácido nucleico unidas de
- 35 forma no específica a alta rigurosidad SSPE 0,1 x, SDS 0,1 %, 65 °C y a rigurosidad media son SSPE 0,2 x, SDS 0,1 %, 50 °C. Se conocen en la técnica condiciones de rigurosidad equivalentes. El experto en la materia puede ajustar fácilmente estos parámetros para conseguir hibridación específica de una molécula de ácido nucleico con una molécula de ácido nucleico diana apropiada para una aplicación particular. Complementario, cuando se refiere a dos
- 40 secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de hibridar, típicamente con menos del 25 %, 15 % o 5 % de emparejamientos erróneos entre nucleótidos opuestos. Si es necesario, se especificará el porcentaje de complementariedad. Típicamente las dos moléculas se seleccionan de modo que hibriden en condiciones de alta rigurosidad.
- Tal como se usa en el presente documento, sustancialmente idéntico para un producto significa suficientemente
- 45 similar a la propiedad de interés si está suficientemente poco cambiada de modo que pueda usarse el producto sustancialmente idéntico en lugar del producto.
- Tal como se usa en el presente documento, también se entiende que las expresiones “sustancialmente idéntico” o
- 50 “similar” varían con el contexto como se entiende por los expertos en la materia relevante.
- Tal como se usa en el presente documento, una variante alélica o variación alélica se refiere a cualquiera de dos o
- 55 más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de forma natural mediante mutación, y puede dar como resultado polimorfismos fenotípicos dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos alterada. La expresión “variante alélica” también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen. Típicamente la forma de
- 60 referencia del gen codifica una forma de tipo silvestre y/o forma predominante de un polipéptido de una población o un único miembro de referencia de una especie. Típicamente, las variantes alélicas, que incluyen variantes entre y dentro de las especies típicamente tienen al menos un 80 %, 90 % o más de identidad de aminoácidos con una forma de tipo silvestre y/o predominante de la misma especie; el grado de identidad depende del gen y si la comparación es entre especies o dentro de las especies. En general, las variantes alélicas intraespecie tienen al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad o más con una forma de tipo silvestre y/o predominante, incluyendo una identidad del 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor con una forma de tipo silvestre y/o predominante de un polipéptido. La referencia a una variante alélica en el presente documento se refiere en general
- 65 a variaciones en proteínas entre miembros de la misma especie.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, "alelo", que se usa de forma intercambiable en el presente documento con "variante alélica" se refiere a las formas alternativas de un gen o partes del mismo. Los alelos ocupan el mismo locus o posición en cromosomas homólogos. Cuando un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es homocigoto para ese gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterocigoto para el gen. Los alelos de un gen específico pueden diferir entre sí en un único nucleótido o varios nucleótidos, y pueden incluir modificaciones tales como sustituciones, deleciones e inserciones de nucleótidos. Un alelo de un gen también puede ser una forma de un gen que contiene una mutación.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, las variantes de especies se refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamífero, tales como ratón y ser humano.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, una variante de corte y empalme se refiere a una variante producida mediante el procesamiento diferencial de un transcrito primario de ADN genómico que da como resultado más de un tipo de ARNm.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, la modificación es en referencia a la modificación de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o de una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico e incluye deleciones, inserciones y reemplazos de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Los métodos para modificar un polipéptido son rutinarios para los expertos en la materia, tales como el uso de metodologías de ADN recombinante.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término promotor significa una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que posibilitan la unión de ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. Se encuentran habitualmente, pero no siempre, secuencias promotoras en las regiones 5' no codificantes de genes.
- 30 Tal como se usa en el presente documento, un polipéptido o una proteína aislada o purificada o parte biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido del que se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Puede determinarse que las preparaciones están sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables como se determina por métodos convencionales de análisis, tales como cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), usados por los expertos en la materia para evaluar dicha pureza, o suficientemente puras de modo que la purificación adicional no altere de forma detectable las propiedades físicas y químicas, tales como actividades enzimáticas y biológicas de la sustancia. Se conocen métodos para purificar los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros por los expertos en la materia. Un compuesto sustancialmente químicamente puro, sin embargo, puede ser una mezcla de estereoisómeros. En dichos casos, la purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.
- 35 La expresión sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína está separada de componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de forma recombinante. En una realización, la expresión sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tienen menos de aproximadamente un 30 % (en peso seco) de proteínas no enzimáticas (también denominadas en el presente documento proteína contaminante), en general menos de aproximadamente el 20 % de proteínas no enzimáticas o el 10 % de proteínas no enzimáticas o menos de aproximadamente el 5 % de proteínas no enzimáticas. Cuando la proteína enzimática se produce de forma recombinante, también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, 10 % o 5 % del volumen de la preparación de proteína enzimática.
- 40 Tal como se usa en el presente documento, la expresión sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos incluye preparaciones de proteínas enzimáticas en las que la proteína está separada de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. La expresión incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tienen menos de aproximadamente el 30 % (en peso seco) 20 %, 10 %, 5 % o menos de precursores químicos o productos químicos o componentes no enzimáticos.
- 45 Tal como se usa en el presente documento, sintético, con referencia a, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico sintético o un gen sintético o un péptido sintético se refiere a una molécula de ácido nucleico o molécula polipeptídica que se produce por métodos recombinantes y/o por métodos de síntesis química.
- 50 Tal como se usa en el presente documento, la producción por medios recombinantes usando métodos de ADN recombinante significa el uso de los métodos bien conocidos de biología molecular para expresar proteínas codificadas por ADN clonado.
- 55 Tal como se usa en el presente documento, el 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 típicamente siguen siendo episómicos, pero pueden diseñarse para efectuar la integración de un gen o parte del mismo en un cromosoma del genoma. También se contemplan vectores que son cromosomas artificiales, tales
- 60
- 65

como cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de mamífero. La selección y uso de dichos vehículos se conocen bien por los expertos en la materia.

5 Tal como se usa en el presente documento, 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 efectuar la expresión de dichos fragmentos de ADN. Dichos segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y opcionalmente pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación y similares. Los vectores de expresión derivan generalmente de ADN plasmídico o viral, o pueden contener elementos de ambos. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, un virus recombinante u otro vector que, tras su introducción en una célula hospedadora apropiada, da como resultado la expresión del ADN clonado. Se conocen bien por los expertos en la materia vectores de expresión apropiados e incluyen los que son replicables en células eucariotas y/o células procariotas y los que siguen siendo episómicos o los que se integran en el genoma de la célula hospedadora.

15 Tal como se usa en el presente documento, el vector también incluye “vectores de virus” o “vectores virales”. Los vectores virales son virus modificados por ingeniería genética que se unen operativamente a genes exógenos para transferir (como vehículos o lanzaderas) los genes exógenos a células.

20 Tal como se usa en el presente documento, unido operativamente cuando se refiere a segmentos de ADN significa que los segmentos se disponen de modo que actúen en concierto para sus fines pretendidos, por ejemplo, la transcripción se inicia cadena abajo del promotor y cadena arriba de cualquier secuencia transcrita. El promotor es habitualmente el dominio con el que se une la maquinaria transcripcional para iniciar la transcripción y continua a través del segmento codificante hasta el terminador.

25 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término a evaluar incluya la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteasa, o un dominio de la misma, presente en la muestra, y también de obtener un índice, relación, porcentaje, visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta y no es necesario que la especie química de hecho detectada sea por supuesto producto de proteólisis en sí mismo, sino que puede ser, por ejemplo, un derivado del mismo o alguna sustancia adicional. Por ejemplo, detección de un producto de escisión de una proteína de complemento, tal como por SDS-PAGE y tinción de proteína con azul de Coomassie.

30 Tal como se usa en el presente documento, la actividad biológica se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o a las respuestas fisiológicas que resultan de la administración *in vivo* de un compuesto, composición u otra mezcla. La actividad biológica, por lo tanto, abarca los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de dichos compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas pueden observarse en sistemas *in vitro* diseñados para ensayar o usar dichas actividades. Por lo tanto, para los fines del presente documento una actividad biológica de una proteasa es su actividad catalítica en la que se hidroliza un polipéptido.

40 Tal como se usa en el presente documento, 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 equivalente en referencia a dos proteínas o péptidos, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos con solamente sustituciones de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad o función de la proteína o el péptido. Cuando equivalente se refiere a una propiedad, no es necesario que la propiedad esté presente en el mismo grado (por ejemplo, dos péptidos pueden mostrar diferentes tasas del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades son habitualmente sustancialmente las mismas.

50 Tal como se usa en el presente documento, “modular” y “modulación” o “alterar” se refieren a un cambio de una actividad de una molécula, tal como una proteína. Las actividades ejemplares incluyen, pero sin limitación, actividades biológicas, tales como transducción de señales. La modulación puede incluir un aumento de la actividad (es decir, regulación positiva o actividad agonista), una reducción de la actividad (es decir, regulación negativa o inhibición) o cualquier otra alteración en una actividad (tal como un cambio de periodicidad, frecuencia, duración, cinética u otro parámetro). La modulación puede depender del contexto y típicamente la modulación se compara con un estado designado, por ejemplo, la proteína de tipo silvestre, la proteína en un estado constitutivo, o la proteína como se expresa en un tipo de célula o afección designado.

60 Tal como se usa en el presente documento, una composición se refiere a cualquier mezcla. Puede ser una solución, suspensión, líquido, polvo, pasta, acuosa, no acuosa o cualquier combinación de los mismos.

65 Tal como se usa en el presente documento, una combinación se refiere a cualquier asociación entre o dentro de dos o más artículos. La combinación puede ser dos o más artículos separados, tal como dos composiciones o dos colecciones, puede ser una mezcla de los mismos, tal como una única mezcla de los dos o más artículos, o cualquier variación de los mismos. Los elementos de una combinación están generalmente funcionalmente asociados o relacionados.

Tal como se usa en el presente documento, "enfermedad o trastorno" se refiere a una afección patológica en un organismo resultante de causa o afección incluyendo, pero sin limitación, infecciones, afecciones adquiridas, afecciones genéticas y caracterizadas por síntomas identificables. Las enfermedades y trastornos de interés en el presente documento son los que implican componentes del ECM.

5 Tal como se usa en el presente documento, "tratar" a un sujeto con una enfermedad o afección significa que los síntomas del sujeto se alivian parcial o totalmente, o permanecen estáticos después del tratamiento. Por lo tanto el tratamiento abarca profilaxis, terapia y/o cura. La profilaxis se refiere a la prevención de una enfermedad potencial y/o una prevención de empeoramiento de síntomas o progresión de una enfermedad. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de una composición de insulina de acción súper rápida proporcionada en el presente documento.

15 Tal como se usa en el presente documento, un agente farmacéuticamente eficaz incluye cualquier agente terapéutico o agentes bioactivos, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, anestésicos, vasoconstrictores, agentes de dispersión, fármacos terapéuticos convencionales, incluyendo moléculas pequeñas farmacológicas y proteínas terapéuticas.

20 Tal como se usa en el presente documento, tratamiento significa cualquier manera en la que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad u otra indicación, se alivian o se alteran de forma beneficiosa de otra manera.

25 Tal como se usa en el presente documento, un efecto terapéutico significa un efecto resultante del tratamiento de un sujeto que altera, típicamente mejora o alivia los síntomas de una enfermedad o afección o que cura una enfermedad o afección. Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de una composición, molécula o compuesto que da como resultado un efecto terapéutico después de su administración a un sujeto.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal, incluyendo un mamífero, tal como un ser humano.

35 Tal como se usa en el presente documento, un paciente se refiere a un sujeto humano que muestra síntomas de una enfermedad o trastorno.

40 Tal como se usa en el presente documento, el alivio de los síntomas de una enfermedad o trastorno particular mediante un tratamiento, tal como mediante la administración de una composición farmacéutica u otro producto terapéutico, se refiere a cualquier reducción, bien permanente o bien temporal, duradera o transitoria, de los síntomas que pueden atribuirse a o asociarse con la administración de la composición o producto terapéutico.

45 Tal como se usa en el presente documento, la prevención o profilaxis se refiere a métodos en los que se reduce el riesgo de desarrollar la enfermedad o afección.

50 Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un agente, compuesto, material o composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Por lo tanto, es la cantidad necesaria para prevenir, curar, aliviar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.

55 Tal como se usa en el presente documento, una dosificación de insulina terapéuticamente eficaz es la cantidad de insulina requerida o suficiente para conseguir el control glucémico. Esta cantidad puede determinarse de forma empírica, tal como por exposición a glucosa o comida. Las composiciones proporcionadas en el presente documento contienen una cantidad terapéuticamente eficaz o concentración de insulina de modo que se administren dosificaciones terapéuticamente eficaces.

60 Tal como se usa en el presente documento, la forma de dosis unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y envasadas individualmente como se conoce en la técnica.

65 Tal como se usa en el presente documento, una formulación de una única dosificación se refiere a una formación para administración directa.

Tal como se usa en el presente documento, un "artículo de fabricación" es un producto que se prepara y se vende. Tal como se usa a lo largo de la presente solicitud, se entiende que la expresión abarca una composición de insulina de acción rápida y una composición de enzima degradante de hialuronano contenida en el mismo artículo de envase o por separado.

Tal como se usa en el presente documento, fluido se refiere a cualquier composición que puede fluir. Los fluidos abarcan por lo tanto composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones similares.

Tal como se usa en el presente documento, un "kit" se refiere a una combinación de composiciones proporcionadas en el presente documento y otro artículo para un fin, incluyendo, pero sin limitación, reconstitución, activación, instrumentos/dispositivos para suministro, administración, diagnóstico y evaluación de una actividad o propiedad biológica. Los kits incluyen opcionalmente instrucciones para su uso.

5 Tal como se usa en el presente documento, un extracto celular o lisado se refiere a una preparación o fracción que se realiza a partir de una célula lisada o rota.

10 Tal como se usa en el presente documento, animal incluye cualquier animal, tal como, pero sin limitación, primates incluyendo seres humanos, gorilas y monos; roedores tales como ratones y ratas; aves de corral, tales como pollos; rumiantes, tales como cabras, vacas, ciervos, ovejas; ovinos, tales como cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen a los seres humanos como el animal contemplado. Las enzimas proporcionadas en el presente documento son de cualquier fuente, animal, vegetal, procariota y fúngica. La mayoría de las enzimas son de origen animal, incluyendo origen de mamífero.

15 Tal como se usa en el presente documento, un control se refiere a una muestra que es sustancialmente idéntica a la muestra de ensayo, excepto que no se trata con un parámetro de ensayo, o, si es una muestra de plasma, puede ser de un voluntario normal no afectado por la afección de interés. Un control también puede ser un control interno.

20 Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una", uno y "el" o "la" incluyen referentes plurales a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un compuesto, que comprende "un dominio extracelular" incluye compuestos con uno o una pluralidad de dominios extracelulares.

25 Tal como se usa en el presente documento, los intervalos y cantidades pueden expresarse como "aproximadamente" un valor o intervalo particular. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto, "aproximadamente 5 bases" significa "aproximadamente 5 bases" y también "5 bases".

30 Tal como se usa en el presente documento, "opcional" u "opcionalmente" significa que el acontecimiento o circunstancia descrito posteriormente sucede o no sucede, y que la descripción incluye casos en los que dicho acontecimiento o circunstancia sucede y casos en los que no. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo está no sustituido o está sustituido.

35 Tal como se usa en el presente documento, las abreviaturas para cualquier grupo protector, aminoácidos y otros compuestos son, a no ser que se indique de otro modo, acordes con su uso habitual, sus abreviaturas reconocidas o con la Comisión de IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica (véase, (1972) Biochemistry 11: 1726).

## **B. Composiciones de insulina de acción súper rápida**

40 Se proporcionan en el presente documento composiciones de insulina de acción súper rápida. Las composiciones de insulina de acción súper rápida se obtienen combinando, antes de o en el momento de la administración, una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano. También se describen métodos y usos de la composición de insulina de acción súper rápida para tratar las mismas enfermedades y afecciones para las que se han indicado hasta la fecha insulinas de acción rápida, por ejemplo, diabetes mellitus, para el control de la hiperglucemia y otras enfermedades y afecciones. Las insulinas de acción rápida (por ejemplo insulina lispro Humalog® e insulina Humulin® R) no imitan de forma adecuada la adición de insulina endógena de la liberación de insulina prandial de primera fase. Se ha descubierto ahora que combinando una insulina de acción rápida con una enzima degradante de hialuronano, los métodos, composiciones y combinaciones descritas en el presente documento proporcionan una composición de insulina de acción súper rápida que se asemeja más estrechamente a la liberación de insulina postprandial endógena (es decir, natural) de un sujeto no diabético.

### **1. Visión de conjunto de la insulina, diabetes y terapias de insulina de acción rápida existentes**

55 La insulina es una hormona polipeptídica de origen natural secretada por el páncreas. Las células del cuerpo requieren de insulina para captar eficazmente y usar glucosa de la sangre. La glucosa es el sustrato de energía predominante para llevar a cabo las funciones celulares. Además de ser el modulador primario de la homeostasis de carbohidratos, la insulina tiene efectos en el metabolismo de la grasa. Puede cambiar la capacidad del hígado y del tejido adiposo, entre otros, para liberar grasa almacenada. La insulina tiene diversos efectos farmacodinámicos por todo el cuerpo, incluyendo pero sin limitación aumento de la síntesis de lípidos, reducción de la degradación de lípidos, aumento de la síntesis de proteínas, regulación de enzimas y procesos clave en el metabolismo de la glucosa (incluyendo estimulación de la captación de glucosa, estimulación de la oxidación de glucosa, aumento de la síntesis de glucógeno y reducción de la degradación de glucógeno).

65 Aunque la insulina se secreta de forma basal, habitualmente en el intervalo de 0,5 a 1,0 unidades por hora, sus niveles aumentan después de una comida. Después de una comida, el páncreas secreta un bolo de insulina en respuesta a un aumento de la glucosa. La insulina estimula la captación de glucosa en células, y señala al hígado para que reduzca la producción de glucosa; esto da como resultado un retorno de la glucosa en sangre a niveles

- normales. En adultos normales, hay dos fases de liberación de insulina en respuesta a una comida. La fase temprana es un aumento de la liberación de insulina que se produce en un periodo de 2-15 minutos después de comer. La liberación de fase tardía se extiende aproximadamente 2 horas. La fase temprana es responsable de detener la producción de glucosa hepática, reduciendo de este modo los niveles de glucosa en sangre y sensibilizando o señalizando a los tejidos periféricos para aumentar la captación de glucosa. En el músculo, se almacenan grandes cantidades de glucosa en forma de glucógeno. Parte del glucógeno se degrada en lactato, que circula al hígado y puede convertirse de nuevo en glucosa y almacenarse como glucógeno. Entre comidas el hígado degrada estos almacenes de glucógeno para proporcionar glucosa al cerebro y otros tejidos.
- 5
- 10 La diabetes da como resultado hiperglucemia crónica debido a la incapacidad o capacidad reducida del páncreas para producir cantidades adecuadas de insulina o debido a la incapacidad o capacidad reducida de las células para sintetizar y/o liberar la insulina requerida. En pacientes diabéticos, la eficacia de la respuesta de primera fase anteriormente descrita está reducida o ausente, lo que conduce a niveles de glucosa postprandiales elevados. Por ejemplo, el área bajo la curva (ABC) de glucosa en sangre durante las primeras cuatro horas postprandiales (es decir primeras cuatro horas después de comer), es de 2,5 a 3,0 veces mayor en pacientes diabéticos que en no diabéticos. Las excursiones de glucosa postprandial contribuyen a una hiperglucemia general y a niveles de HbA1c elevados, y estas excursiones son los contribuyentes primarios para las elevaciones de HbA1c vistas en estadios tempranos de la diabetes de Tipo 2.
- 15
- 20 Muchos pacientes diabéticos requieren tratamiento con insulina cuando el páncreas produce cantidades inadecuadas de insulina, o no puede usar la insulina que produce, para mantener el control glucémico adecuado. Se ha administrado insulina como un producto terapéutico para tratar a pacientes que tienen diabetes, incluyendo, por ejemplo, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y diabetes gestacional, para imitar la respuesta de insulina endógena que sucede en individuos normales. La insulina también se ha administrado a pacientes críticamente enfermos con hiperglucemia para controlar los niveles de glucosa en sangre. Se usan diferentes fuentes de insulina dependiendo de las necesidades del paciente. Las preparaciones de insulina comerciales pueden clasificarse dependiendo de la duración de su actividad (véase, por ejemplo, DeFelippis *et al.* (2002) *Insulin Chemistry and Pharmacokinetics*. En Ellenberg and Rifkin's *Diabetes Mellitus* (pp. 481-500) McGraw-Hill Professional). Por ejemplo, se proporciona insulina en formulaciones de acción rápida, así como formulaciones de acción intermedia o larga, denominándose
- 25
- 30 las dos últimas clasificaciones en el presente documento insulinas de acción basal. Las formas de acción rápida tienen un inicio rápido, mostrando típicamente niveles de insulina máximos en 2-3 horas o menos, y no más de cuatro horas. Por lo tanto, se usan formas de acción rápida de insulina en la regulación de la glucosa prandial. Otras formas de insulina incluyen acción intermedia, que alcanza la concentración de insulina máxima a las aproximadamente 4-12 horas después de la administración subcutánea, e insulinas de acción larga que alcanzan un máximo relativamente modesto y tienen una duración máxima de acción de 20-30 horas. Las formas de acción intermedia y larga se componen con frecuencia de preparaciones de insulina amorfa y/o cristalina, y se usan predominantemente en terapias basales.
- 35
- 40 El objetivo de la administración prandial de composiciones de insulina de acción rápida es obtener un nivel de glucosa en sangre estable a lo largo del tiempo mediante administración parenteral de la insulina de acción rápida antes, durante o poco después del momento de la comida. De esta manera, los niveles de insulina en sangre se elevan temporalmente para (a) detener la producción de glucosa hepática y (b) aumentar la captación de glucosa; manteniendo de este modo el control glucémico durante el aumento de la glucosa en sangre asociado con la digestión de la comida.
- 45
- 50 Se usa insulina humana recombinante (por ejemplo, insulina Humulin® R) para autoadministración por inyección antes del momento de la comida. Desafortunadamente, la insulina humana recombinante tiene que dosificarse por inyección aproximadamente media hora o más antes del momento de la comida para asegurar que no se produzca un aumento en la glucosa en sangre sin oposición por los niveles exógenos de insulina. Una de las razones para la lenta absorción de la insulina humana recombinante se debe a que la insulina forma complejos hexaméricos en presencia de iones de cinc tanto *in vivo* como *in vitro*. Dichos complejos que contienen cinc hexamérico son más estables que la insulina monomérica que carece de cinc. Tras la inyección subcutánea, estos hexámeros de insulina deben disociarse en dímeros o monómeros más pequeños antes de que puedan absorberse a través de los lechos capilares y pasar a la circulación sistémica. La disociación de los hexámeros en dímeros y monómeros depende de la concentración, produciéndose solamente a concentraciones menores a medida que la insulina se difunde desde el sitio de inyección. Por lo tanto, existe un depósito de insulina local en el sitio de inyección después de la administración subcutánea de insulina, proporcionando una concentración inicial alta de insulina hexamérica en el sitio de inyección que no puede absorberse hasta que se reduzca la concentración de insulina (Soeborg *et al.*, (2009) *Eur. J. Pharm. Sci.* 36: 78-90). A medida que la insulina se difunde lentamente desde el sitio de inyección, la concentración de insulina se reduce a medida que aumenta la distancia desde el sitio de inyección, dando como resultado la disociación de los hexámeros y la absorción de los monómeros y dímeros de insulina. Por lo tanto, aunque se produce dispersión de los complejos de insulina hexaméricos de forma natural en el cuerpo, pueden tardar algo de tiempo en producirse, retardando la disponibilidad sistémica de la insulina. Además, debido a esta absorción dependiente de la concentración, las concentraciones de insulina mayores y las dosis mayores se absorben más lentamente (Soeborg *et al.*, (2009) *Eur. J. Pharm. Sci.* 36: 78-90).
- 55
- 60
- 65

Ya que la insulina en forma monomérica se absorbe más rápidamente, mientras que las insulinas en estado hexamérico son más estables, se han desarrollado formas análogas de acción rápida de insulina que muestran una disociación más rápida de hexamérica a monomérica tras la administración subcutánea. Dichas insulinas se modifican, tal como por cambio de aminoácidos, para aumentar la velocidad de disociación, proporcionando de este modo una actividad farmacodinámica más rápida tras su inyección. Como se describe en la Sección C, las formas análogas de acción rápida de insulina incluyen pero sin limitación, insulina glulisina, insulina aspart e insulina lispro.

Las formas de acción rápida de insulinas, incluyendo análogos de acción rápida, tienen un retardo en la absorción y la acción, y por lo tanto no se aproximan a la insulina endógena que tiene una fase temprana que se produce aproximadamente 10 minutos después de comer. Por lo tanto, dichas formulaciones no actúan lo suficientemente rápido como para detener la producción de glucosa hepática que se produce poco después de esta primera fase de la liberación de insulina. Por esta razón, incluso las preparaciones de análogos de insulina de acción rápida deben proporcionarse antes de las comidas para conseguir cualquier probabilidad de control glucémico deseado. Aunque es más fácil estimar el momento de comer a una distancia de 15 minutos que a la distancia de 30-60 minutos requerida para la insulina regular, existe un riesgo de que un paciente pueda comer demasiado pronto o demasiado tarde como para proporcionar el mejor control de glucosa en sangre.

Además, uno de los principales efectos secundarios del tratamiento con cualquier terapia de insulina, incluyendo terapias de insulina de acción rápida, es la hipoglucemia. La hipoglucemia se define como glucosa en sangre baja y se asocia con una diversidad de morbilidades que pueden variar de hambre a síntomas más molestos tales como temblor, sudoración, confusión o incluso hasta padecer un ataque, coma y muerte. La hipoglucemia puede producirse por no comer suficiente, saltarse comidas, hacer más ejercicio de lo habitual o tomar demasiada insulina o usar una preparación de insulina prandial que tiene una duración inapropiadamente larga de exposición y acción. Por ejemplo, ya que muchas terapias de insulina de acción rápida deben proporcionarse antes de una comida, existe un riesgo de que un paciente pueda renunciar a o saltarse la comida, lo que conduce a hipoglucemia. Adicionalmente, tras la administración de una insulina de acción rápida, los niveles de insulina en suero y la acción de la insulina (medida, por ejemplo, como velocidad de infusión de glucosa (GIR)) típicamente permanece elevada después de haberse reducido la carga de glucosa prandial, amenazando con hipoglucemia. Los intentos de controlar mejor las cargas de glucosa máximas aumentando la dosis de insulina aumentan adicionalmente este peligro. Además, debido a que la hipoglucemia postprandial es un resultado habitual de la terapia de insulina, con frecuencia provoca o necesita que los pacientes coman tentempiés entre comidas. Esto contribuye al aumento de peso y obesidad asociados con frecuencia con las terapias de insulina.

## 2. Farmacodinámica y farmacocinética de una composición de insulina de acción súper rápida

Se descubre en el presente documento que la combinación de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano da como resultado una absorción aumentada de la insulina de acción rápida, dando como resultado una elevación más rápida de la concentración de insulina en suero (es decir velocidad de absorción más rápida) y una acción farmacológica. Por lo tanto, la combinación de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano da como resultado una composición de insulina de acción súper rápida capaz de efectuar un rápido aumento de la glucosa en sangre después de la administración parenteral en bolo (es decir, no intravenosa) (tal como, por ejemplo administración parenteral por las vías de administración subcutánea (SC), intramuscular (IM), intraperitoneal (IP) o intradérmica (ID)).

Sin quedar ligado a ninguna teoría, la combinación de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano puede dar como resultado una absorción aumentada de la insulina de acción rápida, en comparación con cuando la insulina se administra sola, debido a un cambio en el mecanismo de dispersión después de la administración subcutánea. Típicamente, la presencia de hialuronano de elevado peso molecular proporciona una barrera al flujo del fluido en bruto después de la inyección subcutánea de solo insulina. Por lo tanto, como se ha analizado anteriormente, la insulina se dispersa desde el sitio de inyección por mecanismos mediados por difusión. A medida que se dispersa la insulina desde el sitio de inyección, la concentración se reduce, facilitando la disociación de hexámeros de insulina a monómeros y dímeros, que son suficientemente pequeños como para absorberse a través de los lechos capilares. Por lo tanto, para absorberse después de la inyección subcutánea, la insulina debe, en primer lugar, dispersarse lentamente desde el sitio de inyección para crear concentraciones de insulina lo suficientemente bajas como para facilitar la disociación y, por lo tanto, la absorción. Sin embargo, cuando la insulina se co-administra con una enzima degradante de hialuronano, tal como, por ejemplo, una hialuronidasa soluble, el hialuronano se degrada por la enzima degradante de hialuronano, permitiendo el flujo de fluido a granel, que se dispersa rápidamente de forma proporcional al gradiente de presión (o conductividad hidráulica). A presión fisiológica, por ejemplo, una hialuronidasa soluble tal como rHuPH20 genera un aumento de aproximadamente 20 veces en la conductancia hidráulica. Por lo tanto, cuando se coadministra con una enzima degradante de hialuronano, la insulina se dispersa rápidamente de una manera mediada por convección después de la degradación de la barrera de hialuronano. Esta absorción rápida de insulina cuando se coadministra por vía subcutánea con enzima degradante de hialuronano puede dar como resultado propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas mejoradas de la insulina en comparación con cuando la insulina se administra sola.



Por ejemplo, tal como se proporciona en el presente documento, la composición de insulina de acción súper rápida se absorbe más rápidamente según se demuestra por una reducción de la  $t_{m\acute{a}x}$  y una  $C_{m\acute{a}x}$  aumentada y exposición de insulina sistémica acumulativa que es especialmente pronunciada durante los primeros 40 minutos. Este perfil farmacocinético mejorado se refleja en un inicio y duración acortados del efecto de la insulina. Esto puede ejemplificarse por medidas farmacodinámicas, tales como por velocidades de infusión de glucosa en experimentos de pinza euglucémica tal como se describen en el Ejemplo 1. Por lo tanto, una composición de insulina de acción súper rápida se absorbe más rápidamente que la insulina de acción rápida correspondiente. Resulta interesante que como se expone en las Figuras 1 y 2, las composiciones de insulina de acción súper rápida que contienen una enzima degradante de hialuronano muestran una absorción acelerada tanto de insulinas regulares de acción rápida como de análogos de insulina de acción rápida dando como resultado perfiles farmacodinámicos (PD) y farmacocinéticos (PK) similares, incluso aunque el análogo de insulina de acción rápida sea sustancialmente más rápido que la insulina regular de acción rápida sin la enzima degradante de hialuronano. Por lo tanto, las composiciones de insulina de acción súper rápida muestran perfiles farmacodinámicos (PD) y farmacocinéticos (PK) similares, independientemente de si se incluye en la composición un análogo de insulina de acción rápida o insulina regular de acción rápida. Esta similitud es particularmente sorprendente en los primeros 40 a 60 minutos después de la administración (véase por ejemplo, Figuras 1 y 2). Por lo tanto, una ventaja adicional de la composición de insulina de acción súper rápida es la capacidad para conseguir perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos comparables en los primeros 40 a 60 minutos después de la administración, independientemente de si la insulina de acción rápida es una insulina regular de acción rápida (por ejemplo, insulina Humulin® R) o un análogo de acción rápida (tal como insulina lispro Humalog®, insulina aspart Novalog® o insulina glulisina Apidra®). En algunos casos, tales como cuando la insulina de acción rápida en la composición de insulina de acción súper rápida es un análogo de insulina de acción rápida, en lugar de una insulina regular, la absorción de la insulina de acción rápida cuando se administra con la enzima degradante de hialuronano (es decir como una composición de insulina de acción súper rápida) es más rápida que la más rápida de las insulinas de acción rápida sola. Esto puede manifestarse como, por ejemplo,  $t_{m\acute{a}x}$  reducida y exposición de insulina sistémica acumulativa aumentada, particularmente durante los primeros 40 minutos.

La farmacocinética de la composición de insulina de acción súper rápida difiere de la de insulina de acción rápida correspondiente en varios aspectos importantes. En primer lugar, el perfil de concentración en sangre de insulina en función del tiempo se desplaza a una de las mayores concentraciones en tiempos más tempranos (véase por ejemplo, Figura 1). Esta tasa de aparición de insulina en la circulación sistémica se describe como la tasa de absorción, como se distingue de la tasa de retirada de la circulación sistémica, que se describe como la tasa de eliminación. Las composiciones de insulina de acción súper rápida tienen una mayor velocidad de absorción, dando como resultado mayor exposición temprana, que la insulina de acción rápida correspondiente. Además, debido a que la enzima degradante de hialuronano actúa de forma transitoria y local en el sitio de administración, la velocidad de eliminación de la composición de insulina de acción súper rápida y su potencia una vez que está en la circulación sistémica no son materialmente diferentes de la insulina de acción rápida correspondiente. Aumentando la velocidad de absorción mientras se mantiene la misma velocidad de eliminación, se aumenta la concentración en sangre máxima de insulina ( $C_{m\acute{a}x}$ ) para una composición de insulina de acción súper rápida en relación con la insulina de acción rápida correspondiente. Por lo tanto, se distribuye la misma cantidad total de insulina disponible de forma sistémica de forma diferente en función del tiempo para una composición de insulina de acción súper rápida en relación con la insulina de acción rápida correspondiente, de modo que, después de la administración parenteral de una composición de insulina de acción súper rápida, se produce una mayor fracción de la exposición de insulina sistémica acumulativa sobre puntos temporales más tempranos y una menor fracción de la exposición de insulina sistémica acumulativa se produce sobre puntos temporales posteriores, en comparación con una insulina que es simplemente de acción rápida. Este desplazamiento en la velocidad de absorción permite que la composición de insulina de acción súper rápida se asemeje más estrechamente a la respuesta de insulina endógena del cuerpo al aumento de los niveles de glucosa en sangre que se producen después del consumo de una comida.

Un segundo parámetro farmacocinético independiente, la fracción de la dosis administrada que alcanza la circulación sistémica, también puede diferir de la composición de insulina de acción súper rápida en relación con su insulina de acción rápida correspondiente. Para ciertas insulinas de acción rápida, la amplia mayoría de la dosis administrada está biodisponible de forma sistémica, y por lo tanto puede haber solamente un aumento creciente para la composición de acción súper rápida correspondiente. Sin embargo para otras insulinas de acción rápida, tales como insulina regular (por ejemplo insulina Humulin® R), el aumento en la biodisponibilidad puede ser significativo. La biodisponibilidad relativa de una composición de insulina de acción súper rápida como se describe en el presente documento con respecto a su insulina de acción rápida correspondiente se describe por la relación de la exposición sistémica total ( $ABC_{0-\infty}$ ) de las dos composiciones después de administraciones parenterales no IV idénticas.

Un aspecto importante adicional de las composiciones de insulina de acción súper rápida se refiere a la capacidad para conseguir una mejora en los parámetros farmacodinámicos que miden la respuesta fisiológica a la insulina disponible de forma sistémica. Debido a que las composiciones de insulina de acción súper rápida descritas en el presente documento tienen la misma potencia farmacológica tras alcanzar a la circulación sistémica que la insulina de acción rápida correspondiente, los perfiles farmacocinéticos mejorados ofrecidos por las composiciones de insulina de acción súper rápida (como se ha analizado anteriormente) dan como resultado cambios beneficiosos en

los parámetros farmacodinámicos que miden la respuesta fisiológica a la insulina disponible de forma sistémica. Por ejemplo, la velocidad de infusión de glucosa (GIR) medida cuando la insulina se administra a sujetos en un procedimiento de pinza euglucémica representa un parámetro farmacodinámico ya que mide la velocidad de administración de glucosa intravenosa en función del tiempo requerido para mantener una concentración de glucosa en sangre diana estable. Según la ventaja farmacocinética de mayor velocidad de absorción conseguida por una composición de insulina de acción súper rápida en comparación con la insulina de acción rápida correspondiente, la composición de insulina de acción súper rápida es capaz de desplazar el perfil de GIR (una medida de la respuesta fisiológica a la insulina) hacia mayores velocidades de infusión (es decir, mayor respuesta fisiológica) en tiempos más tempranos. Para las composiciones de insulina de acción súper rápida donde también hay un aumento significativo de la biodisponibilidad sistémica relativa, puede observarse un aumento adicional en la respuesta de GIR, aunque la GIR total está en función tanto de la distribución de los niveles de insulina en función del tiempo como de la dosis sistémica administrada.

Las ventajas farmacocinéticas y farmacodinámicas aportadas por las composiciones de insulina de acción súper rápida descritas en el presente documento conducen a varios usos importantes. En primer lugar, por el desplazamiento de las respuestas de PK y PD a tiempos más tempranos, puede producirse una respuesta de insulina natural para la composición de acción súper rápida para controlar los niveles de glucosa postprandial de lo que es posible con la composición de insulina de acción rápida correspondiente solamente. La respuesta de la insulina natural del cuerpo incluye tanto (a) una explosión inicial de insulina en los primeros 10-15 minutos que señala la detención de la liberación de glucosa hepática y que proporciona concentraciones en sangre de glucosa mínimas entre comidas; y (b) una exposición de insulina total durante aproximadamente 2 horas, que coincide con la composición de carbohidratos de la comida ajustando la liberación de insulina a la circulación sistémica en función de los niveles de glucosa a través de una compleja interacción de respuestas hormonales, incluyendo tanto las respuestas de células beta a los niveles de metabolitos sistémicos (predominantemente glucosa) como hormonas de incretina que potencian la secreción de insulina cuando el tracto intestinal nota la presencia de materiales nutrientes. Por hacer que una mayor fracción de la exposición de insulina disponible de forma sistémica se produzca durante los primeros 10-15 minutos, la composición de insulina de acción súper rápida es más capaz de señalar la detención de la liberación de glucosa hepática (como la respuesta de insulina prandial endógena del cuerpo) en comparación con la composición de insulina de acción rápida correspondiente. Además, las composiciones de insulina de acción súper rápida descritas en el presente documento también son más capaces de imitar el control natural de la glucosa postprandial, teniendo una mayor fracción de la exposición de insulina disponible de forma sistémica durante las primeras 2 horas y una reducción correspondiente en la exposición de insulina durante 2 horas. Los niveles de insulina elevados que se producen más de 2 horas después de la administración pueden dar como resultado un metabolismo de glucosa aumentado cuando la absorción de glucosa postprandial es completa, una situación que conduce a bajos niveles de glucosa en sangre o hipoglucemia. Adicionalmente, debido a que las composiciones de insulina de acción súper rápida tienen un inicio de la acción similar a la respuesta de insulina natural, estas composiciones pueden administrarse en momento de la comida, mientras que muchas composiciones de insulina de acción rápida (por ejemplo, insulina Humulin® R) se administran 30-60 minutos antes de una comida, lo que introduce un riesgo de hipoglucemia si el sujeto retarda u se salta la comida prevista. Por lo tanto, mediante la combinación de exposición de insulina aumentada durante los primeros 15 minutos, y la exposición de insulina reducida después de 2 horas, las composiciones de insulina de acción súper rápida son más capaces de controlar los niveles de glucosa postprandial que las composiciones de insulina de acción rápida correspondientes.

Se administran típicamente insulinas de acción rápida sobre una amplia serie de dosis según se determina por el médico u otro proveedor de atención médica cualificado dependiendo de muchos factores incluyendo los niveles de glucosa reales, el sujeto, el tipo de la diabetes y la composición de la comida. Típicamente, dichas dosis de insulina de acción rápida pueden estar en el intervalo de entre 0,05 Unidades/kg y 2 Unidades/kg. Debido a su farmacocinética y farmacodinámica, pueden administrarse composiciones de insulina de acción súper rápida a dosis menores en comparación con la insulina de acción rápida administrada en ausencia de una enzima degradante de hialuronano. El grado en que la cantidad de una insulina de acción rápida puede reducirse administrándola como una composición de insulina de acción súper rápida varía, dependiendo de, por ejemplo, el tipo de diabetes que tenga el paciente. Típicamente, la reducción de la cantidad de insulina de acción rápida administrada a pacientes diabéticos de Tipo 2 cuando se administra como una composición de insulina de acción súper rápida es mayor que la reducción en la cantidad de insulina de acción rápida administrada a pacientes diabéticos de Tipo 1 cuando se administra como una composición de insulina de acción súper rápida. Por ejemplo, en casos en los que se administre a cada paciente diabético de Tipo 1 y paciente diabético de Tipo 2 0,20 U/kg de insulina de acción rápida para controlar los niveles de glucosa postprandial, puede administrarse al paciente diabético de Tipo 1 0,15 U/kg de insulina de acción rápida en una composición de insulina de acción súper rápida para conseguir el mismo o mejor control glucémico, y puede administrarse al paciente diabético de Tipo 2 0,10 U/kg de insulina de acción rápida en una composición de insulina de acción súper rápida para conseguir el mismo o mejor control glucémico. Por lo tanto, en algunos ejemplos, se contempla en el presente documento que la cantidad de una insulina de acción rápida que se administra a un paciente diabético de Tipo 2 para conseguir el control glucémico puede reducirse, por ejemplo, en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o más cuando se administra con una enzima degradante de hialuronano como una composición de insulina de acción súper rápida en comparación con la cantidad requerida para control glucémico cuando se administra sin una enzima degradante de hialuronano, y que la cantidad de una insulina de acción rápida que se administra a un paciente

diabético de Tipo 1 para conseguir el control glucémico puede reducirse, por ejemplo, en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o más cuando se administra con una enzima degradante de hialuronano como una composición de insulina de acción súper rápida en comparación con la cantidad requerida para control glucémico cuando se administra sin una enzima degradante de hialuronano.

5 Sin quedar ligado por ninguna teoría, la mayor reducción en la dosis de insulina de acción rápida para pacientes diabéticos de Tipo 2 en comparación con pacientes diabéticos de Tipo 1 cuando se administra la insulina con una enzima degradante de hialuronano como una composición de insulina de acción súper rápida es un reflejo de los diferentes perfiles glucémicos postprandiales de pacientes de Tipo 1 y de Tipo 2, y la capacidad de la insulina de acción súper rápida para asemejarse más estrechamente a la liberación de insulina de primera fase natural en sujetos sanos. La diabetes de Tipo 2 se desarrolla como resultado de la función de células  $\beta$  alterada, resistencia a la insulina y/o secreción de insulina alterada. Estos pacientes carecen de la liberación de insulina de fase temprana que se produce en un periodo de minutos desde una exposición a glucosa, tal como una comida, pero aún liberan lentamente la insulina a lo largo del tiempo. Por el contrario, los pacientes diabéticos de Tipo 1 no producen ninguna insulina y por lo tanto carecen de liberación de insulina tanto de primera como de segunda fase, estando esta última sostenida en sujetos sanos hasta que se consigue el control glucémico. Por lo tanto, debido a los que los pacientes diabéticos de Tipo 2 generalmente solamente requieren terapia de insulina principalmente para abordar la hiperglucemia postprandial, un problema a superar en la terapia de insulina prandial en dichos pacientes diabéticos es la aparición de hipoglucemia. La hipoglucemia puede aparecer si la secreción de insulina basal y/o retardada del propio sujeto se acopla con el efecto reductor de glucosa de cualquier insulina exógena en exceso que permanezca después de haberse aliviado el aumento prandial. A lo largo del tiempo, apariciones repetidas de dichos episodios hipoglucémicos postprandiales pueden contribuir al aumento de peso y la obesidad. La farmacocinética y farmacodinámica de las insulinas de acción rápida son tales que la dosis que es necesaria para conseguir una concentración apropiada de insulina en la sangre lo suficientemente rápido para reducir los niveles de glucosa inmediatamente después de la digestión de una comida (es decir una dosis que cubre la liberación de insulina de fase temprana natural) es una que da como resultado exceso de insulina en circulación en sangre después de la digestión y una reducción de los niveles de glucosa postprandial. Por lo tanto, los pacientes diabéticos de Tipo 2 reciben dosis de insulina que cubren más que solamente la liberación de insulina de fase temprana. Las composiciones de insulina de acción súper rápida proporcionadas en el presente documento se asemejan más estrechamente a la respuesta de insulina endógena. Por lo tanto, puede administrarse a pacientes diabéticos de Tipo 2 una composición de insulina de acción súper rápida a una dosis que abarca solamente la liberación de insulina de primera fase, mientras que puede administrarse a los pacientes diabéticos de Tipo 1 una composición de insulina de acción súper rápida a una dosis que abarca todas las fases de liberación de insulina.

35 Por lo tanto, otro uso de las composiciones de insulina de acción súper rápida proporcionadas en el presente documento es reducir los efectos secundarios del aumento de peso y obesidad asociados con la terapia de insulina de acción rápida. La magnitud de este efecto secundario es aproximadamente o proporcional a la dosis de insulina administrada. Como se ha analizado anteriormente, las composiciones de insulina de acción súper rápida pueden proporcionar un control glucémico equivalente de dosis de insulina de acción rápida que las composiciones de acción rápida correspondientes mediante, por ejemplo, una combinación de la mayor biodisponibilidad y la mayor fracción de exposición a insulina sistémica acumulativa durante las primeras 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 o 2 horas después de la administración. Aunque los pacientes diabéticos de Tipo 1 y Tipo 2 pueden experimentar aumento de peso como resultado de la terapia de insulina, los pacientes con diabetes de Tipo 2 están en riesgo particular de aumento de peso, que conduce a obesidad. Los pacientes diabéticos de Tipo 2 carecen de la liberación de insulina de primera fase, pero aún liberan lentamente insulina a lo largo del tiempo. Como resultado, en los estadios tempranos de la enfermedad, los niveles de insulina endógena de pacientes diabéticos de Tipo 2 son demasiado bajos al comienzo de una comida y demasiado altos después de la digestión de la comida. En ausencia de la liberación de insulina de primera fase, el hígado no recibe la señal para detener la fabricación de glucosa. El hígado continúa produciendo glucosa en un momento en el que el cuerpo comienza a producir glucosa nueva mediante la digestión de la comida, dando como resultado hiperglucemia. Entre dos y tres horas después de una comida, la glucosa en sangre de un paciente diabético no tratado se hace tan elevada que el páncreas recibe una señal para secretar una gran cantidad de insulina. En un paciente con diabetes de Tipo 2 temprana, el páncreas aún puede responder y secreta esta gran cantidad de insulina. Esto sucede en el momento en el que la digestión ya casi ha terminado y los niveles de glucosa en sangre deberían comenzar a caer. Esta gran cantidad de insulina tiene dos efectos perjudiciales. En primer lugar, plantea una demanda indebida a un páncreas ya comprometido, lo que puede conducir a su deterioro más rápido y con el tiempo hacer que el páncreas sea incapaz de producir insulina. En segundo lugar, demasiada insulina después de la digestión puede contribuir a aumento de peso, lo que puede exacerbar adicionalmente la condición de enfermedad. Cuando se administra a pacientes con diabetes de Tipo 2 una insulina de acción rápida para controlar la hiperglucemia postprandial, como se ha analizado anteriormente, puede permanecer un exceso de insulina después de la digestión. Por lo tanto, los pacientes diabéticos de Tipo que reciben terapia de insulina pueden tener demasiada insulina después de la digestión, lo que puede conducir a hipoglucemia y al consiguiente aumento de peso. La administración de las composiciones de insulina de acción súper rápida proporcionadas en el presente documento para controlar la hiperglucemia postprandial reduce el riesgo de aumento de peso y obesidad en pacientes diabéticos. Las composiciones de insulina de acción súper rápida pueden contener las dosis menores de insulina de acción rápida.

Para conseguir control glucémico, la insulina de acción rápida en composiciones de insulina de acción súper rápida podría administrarse a un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % del nivel que habría que administrar de la insulina de acción rápida si no estuviera presente la enzima degradante de hialuronano. Por lo tanto, por ejemplo, la cantidad de insulina de acción rápida administrada en una composición de acción súper rápida es típicamente, o es de aproximadamente, 0,05 U/kg, 0,06 U/kg, 0,07 U/kg, 0,08 U/kg, 0,09 U/kg, 1,0 U/kg, 1,1 U/kg, 1,2 U/kg, 1,3 U/kg, 1,4 U/kg, 1,5 U/kg, 1,6 U/kg, 1,7 U/kg, 1,8 U/kg, 1,9 U/kg, o 2,0 U/kg. En virtud de dosis menores, la duración de acción de dichas insulinas puede reducirse para minimizar el potencial de hipoglucemia tardía que se produce debido a la concentración de insulina en plasma elevada que se extiende durante varias horas. Por lo tanto, un inicio más rápido de acción de la composición de insulina de acción súper rápida, que se asemeja más estrechamente al aumento de insulina endógena de la liberación de insulina prandial de primera fase, se espera que proporcione beneficio clínico con respecto a un mejor control glucémico y un menor aumento de peso en pacientes con diabetes mellitus.

Además, aportando una velocidad de absorción aumentada, las composiciones de insulina de acción súper rápida como se describen en el presente documento pueden proporcionar un ciclo de retroalimentación más corto entre el efecto de la insulina administrada y el efecto en los niveles de glucosa observados que las composiciones de insulina de acción rápida correspondientes, y por lo tanto son más capaces de asemejarse a la regulación natural de los niveles de glucosa postprandial. Por lo tanto, la farmacocinética modificada de una composición de insulina de acción súper rápida también beneficia al rendimiento de la "bomba de insulina" y de la tecnología de control continuo de glucosa (GCM) existentes. Acortando el tiempo entre una inyección en bolo de insulina postprandial y una respuesta glucémica sistémica, un control más estrecho de los niveles de glucosa de inyecciones subcutáneas más pequeñas repetidas de insulina con GCM podría 'cerrar el bucle' en un dispositivo de control de glucosa para la bomba de insulina combinado (es decir sistema de bucle cerrado o páncreas artificial).

Las composiciones de insulina de acción súper rápida, bien proporcionadas como una única mezcla, o como preparaciones separadas, de insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano puede contener ingredientes adicionales para proporcionar propiedades físicas o químicas deseadas. Por ejemplo, una solución inyectable puede contener uno o más modificadores de tonicidad para proporcionar una solución aproximadamente isotónica, y un disolvente acuoso valorado a pH neutro con un ácido o una base y posiblemente, con un componente tamponante de pH. Las formulaciones de insulina de acción rápida incluyen con frecuencia Zn y un conservante antimicrobiano fenólico tal como m-cresol para estabilizarlos estructuralmente en un estado hexamérico más estable. Pueden usarse quelantes metálicos, tales como EDTA, para ajustar la velocidad de disociación de estos hexámeros, y otros metales divalentes tales como calcio pueden estar presentes para tamponar la capacidad quelante. Las enzimas degradantes de hialuronano requieren con frecuencia componentes adicionales para proporcionar estabilidad física y química, incluyendo pero sin limitación tensioactivos, eliminadores de oxígeno, sales, aminoácidos y polialcoholes.

Las composiciones de insulina de acción súper rápida pueden presentarse como un kit de dos recipientes separados, uno que contiene una composición de insulina de acción rápida y otro que contiene una composición de enzima degradante de hialuronano, para coadministración secuencial (en cualquier orden) o simultánea; o como un kit que contiene un único recipiente que contiene una mezcla de una composición de insulina de acción rápida y una composición de enzima degradante de hialuronano. Si la insulina de acción rápida y la enzima degradante de hialuronano se coadministran, dicha coadministración puede ser secuencial en cualquier orden (por ejemplo la enzima degradante de hialuronano se administra antes que la insulina de acción rápida por lo que la enzima degradante de hialuronano degrada al hialuronano en el sitio de inyección antes de la administración de la insulina de acción rápida); o la coadministración de la insulina de acción rápida y la enzima degradante de hialuronano pueden ser simultáneas. La composición de insulina de acción rápida y las composiciones de enzimas degradantes de hialuronano pueden formularse (juntas o por separado) como un sólido para inyección después de reconstitución con un diluyente apropiado, como soluciones inyectables, o como suspensiones inyectables.

Las siguientes secciones describen insulinas de acción rápida ejemplares y enzimas degradantes de hialuronano solubles usadas en las composiciones de insulina de acción súper rápida descritas en el presente documento, métodos para prepararlas, y el uso de estas para tratar enfermedades y afecciones para las que se usan insulinas de acción rápida actuales.

### C. POLIPÉPTIDOS DE INSULINA Y FORMULACIONES

La insulina es un polipéptido compuesto de 51 restos de amino ácidos que tiene un peso molecular de 5.808 dalton. Se produce en islotes de células beta de Langerhans en el páncreas. Una insulina humana ejemplar se traduce como un polipéptido precursor de 110 amino ácidos, preproinsulina (SEC ID N°: 101), que contiene un péptido de señal de 24 amino ácidos para el RE, la secuencia de señal se escinde, dando como resultado proinsulina (SEC ID N°: 102). La molécula de proinsulina se convierte posteriormente en una insulina madura mediante las acciones de enzimas proteolíticas conocidas como prohormona convertasa (PC1 y PC2) y mediante la acción de la exoproteasa carboxipeptidasa E. Esto da como resultado la retirada de 4 restos de amino ácidos básicos y el péptido C o cadena conectora restante de 31 amino ácidos (correspondiente a los restos de aminoácidos 57 a 87 del polipéptido de preproinsulina expuesto en SEC ID N°: 101). La insulina resultante contiene una cadena A de 21 amino ácidos

(correspondiente a los restos de aminoácidos 90 a 110 del polipéptido de proinsulina expuesto en SEC ID N°: 102) y una cadena B de 30 aminoácidos (correspondiente a los restos de aminoácidos 1 a 30 del polipéptido de proinsulina expuesto en SEC ID N°: 102), que se entrecruzan por enlaces disulfuro. Típicamente, la insulina madura contiene tres enlaces disulfuro: uno entre la posición 7 de la cadena A y la posición 7 de la cadena B, un segundo entre la posición 20 de la cadena A y la posición 19 de la cadena B, y un tercero entre las posiciones 6 y 11 de la cadena A. La secuencia de la cadena A de una insulina madura se expone en SEC ID N°: 103 y la secuencia de la cadena B se expone en SEC ID N°: 104.

La referencia a insulina incluye preproinsulina, proinsulina y polipéptidos de insulina en formas monocatenarias o bicatenarias, formas truncadas de los mismos que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y de especie, variantes codificadas por variantes de corte y empalme y otras variantes, tales como análogos de insulina u otras formas derivadas, incluyendo polipéptidos que tienen al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con el polipéptido precursor expuesto en SEC ID N° 101 o la forma madura del mismo, siempre que la insulina se una con el receptor de insulina humana para iniciar una cascada de señalización que dé como resultado una aumento de la captación y almacenamiento glucosa y/o una reducción de la producción de glucosa endógena. Por ejemplo, las insulinas incluyen variantes de especie de insulina. Estas incluyen, pero sin limitación, insulinas derivadas de bovino (expuesta en SEC ID N° 133) y porcino (SEC ID N° 123). La insulina bovina difiere de insulina humana en los aminoácidos 8 y 10 de la cadena A, y en el aminoácido 30 de la cadena B. La insulina porcina solamente difiere de la insulina humana en el aminoácido 30 en la cadena B donde, como la secuencia bovina, hay una sustitución de alanina en lugar de treonina. Otras variantes de especie ejemplares de la insulina se exponen en cualquiera de las SEC ID N°: 105-146. También se incluyen entre variantes de la insulina análogos de insulina que contienen una o más modificaciones de aminoácidos comparadas con una insulina humana expuesta en las SEC ID N° 103 y 104 (cadenas A y B). Se exponen análogos de insulina ejemplares (cadenas A y B), incluyendo formas análogas de acción rápida y de acción más larga, en las SEC ID N°: 147-165, 182-184). Por ejemplo, los análogos de insulina incluyen, pero sin limitación, glulisina (LysB3, GluB29; expuesta en SEC ID N° 103 (cadena A) y SEC ID N° 149 (cadena B)), HMR-1 153 (LysB3, IleB28; expuesta en SEC ID N° 103 (cadena A) y SEC ID N° 182 (cadena B)), HMR-1423 (GlyA21, HisB31, HisB32; expuesta en SEC ID N° 183 (cadena A) y SEC ID N° 184 (cadena B)), insulina aspart (AspB28; expuesta en SEC ID N° 103 (cadena A) y SEC ID N° 147 (cadena B)), e insulina lispro (LysB28, ProB29; expuesta en SEC ID N° 103 (cadena A) y SEC ID N° 148 (cadena B)). En cada caso anterior, la nomenclatura de los análogos está basada en una descripción de la sustitución de aminoácidos en posiciones específicas en la cadena A o B de insulina, numeradas desde el extremo N terminal de la cadena, en el que el resto de la secuencia es la de la insulina humana natural.

Cualquiera de los polipéptidos de insulina anteriores incluye los que se producen por el páncreas de cualquier especie, tal como un ser humano, y también incluye insulinas que se producen de forma sintética o usando técnicas recombinantes. Por ejemplo, como se describe en otra parte en el presente documento, la insulina puede producirse de forma biosintética expresando genes sintéticos para las cadenas A y B de la insulina, expresando la proinsulina completa y exponiéndola a los métodos enzimáticos y químicos apropiados para generar una insulina madura, o expresando cadenas A y B conectadas por un péptido enlazador (véase por ejemplo, *DeFelippis et al. (2002) Insulin Chemistry and Pharmacokinetics. En Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus (pp. 481-500) McGraw-Hill Professional*).

Las insulinas también incluyen formas monoméricas y oligoméricas, tales como formas hexaméricas. La insulina puede existir como un monómero a medida que circula en el plasma, y también se une a su receptor mientras que está en una forma monomérica. La insulina, sin embargo, tiene una propensión a auto-asociarse en dímeros, y en presencia de iones metálicos tales como  $Zn^{2+}$  puede asociarse fácilmente en estructuras de mayor orden tales como hexámeros. Hay dos sitios de unión de alta afinidad simétricos para  $Zn^{2+}$ , aunque también se han presentado otros sitios de unión a cinc más débiles (véase, por ejemplo, *DeFelippis et al. (2002) Insulin Chemistry and Pharmacokinetics. En Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus (pp. 481-500) McGraw-Hill Professional*). La auto-asociación es importante para la estabilidad de la molécula para prevenir la degradación química y la desnaturalización física. Por lo tanto, en vesículas de almacenamiento en células beta pancreáticas, la insulina existe como un hexámero. Tras la liberación al espacio extracelular, sin embargo, se cree que los hexámeros de insulina pueden experimentar un cambio en pH a condiciones más neutras y los hexámeros que contienen iones de cinc se diluyen, lo que desestabiliza el hexámero. Puede haber otras razones que contribuyan a la desestabilización del hexámero de insulina en un espacio extracelular. La insulina se encuentra por lo tanto predominantemente en la sangre como un monómero. Para aprovechar los efectos estabilizadores, la mayoría de las formulaciones comerciales de insulina contienen iones de cinc en cantidades suficientes para promover la auto-asociación en hexámeros. La estructura hexamérica, sin embargo, ralentiza la velocidad de absorción de estas formulaciones tras su administración subcutánea.

Como se analiza en la sección B, se usa insulina como un producto terapéutico para control glucémico, tal como en pacientes con diabetes. Hay diversos tipos de formulaciones de insulina que existen, dependiendo de si la insulina se administra para controlar la glucosa para terapia basal, para terapia prandial o para una combinación de las mismas. Pueden proporcionarse formulaciones de insulina solamente como formulaciones de acción rápida, solamente como formulaciones de acción basal (es decir, formas de acción intermedia y/o de acción larga), o como

mezclas de las mismas (véase por ejemplo, Tabla 2). Típicamente, las mezclas contienen una insulina de acción rápida y una de acción intermedia o larga. Por ejemplo, las insulinas de acción rápida pueden combinarse con una insulina NPH (una insulina de acción intermedia ejemplar como se analiza posteriormente) en diversas proporciones de mezcla incluyendo 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, y 50:50. Dichas preparaciones premezcladas pueden reducir el número de inyecciones de insulina diarias proporcionando convenientemente requisitos tanto de insulina basal como relacionados con la comida en una única formulación. En consecuencia, las formulaciones de composición de insulina de acción súper rápida descritas en el presente documento incluyen las que opcionalmente puede proporcionar una insulina de acción basal.

Generalmente, cualquier preparación de insulina incluye un polipéptido de insulina o variante (es decir análogo) del mismo, y difiere solamente en las otras sustancias que componen la formulación. Por lo tanto, son los detalles específicos de la formulación los que pueden influir en la duración de acción de diferentes tipos de insulina. Los ejemplos de sustancias incluidas en preparaciones de insulina, incluyen, pero sin limitación, agentes de estabilización tales como cinc, tampón de pH, un modificador de tonicidad tal como glicerina; un agente conservante/antimicrobiano tal como m-cresol; y protamina u otro agente de precipitación o liberación controlada. Además, tal como se proporciona en el presente documento, también pueden prepararse preparaciones de insulina que contienen calcio y un quelante metálico tal como EDTA o EGTA. Puede añadirse una cualquiera o más de las sustancias anteriores a un polipéptido de insulina, tal como en una composición de insulina de acción súper rápida. Los componentes específicos añadidos, y sus cantidades, influyen en el tipo de insulina, su duración de acción, su absorción y biodisponibilidad y por lo tanto en su aplicación.

Por ejemplo, la mayoría de las preparaciones de insulina contienen un ion metálico, tal como cinc, en la formulación que estabiliza la insulina promoviendo la auto-asociación de la molécula. La auto-asociación en formas hexaméricas puede afectar a la absorción de insulina tras su administración. Por lo tanto, la relación de dichos agentes estabilizadores, y la adición de EDTA o EGTA a insulina, permiten una modulación y control adicional de la absorción y biodisponibilidad de insulina, por ejemplo, influyendo en la prevalencia de una estructura de mayor orden presente en el polipéptido. En general, las preparaciones de insulina regulares que son de acción rápida contienen cinc en una cantidad que es o es de aproximadamente 0,01-0,04 mg/100 Unidades. Los estudios químicos han revelado que la solubilidad de la insulina está determinada en gran medida por el contenido de cinc y la naturaleza del tampón en el que se suspende. Por lo tanto, algunas formulaciones de insulina basal de acción más larga se preparan precipitando insulina a partir de un tampón de acetato (en lugar de fosfato) mediante la adición de cinc. Los grandes cristales de insulina con alto contenido en cinc, cuando se recogen y se re-suspenden en una solución de acetato sódico-cloruro sódico (pH 7,2 a 7,5), se absorben lentamente después de inyección subcutánea y ejercen una acción de larga duración. Esta preparación de cristal se denomina suspensión de insulina cinc extendida (insulina ultralenta). Otras preparaciones de insulina que contienen cinc incluyen, por ejemplo, insulinas semilentas (suspensiones de insulina cinc prolongada) e insulinas lentas (suspensiones de insulina cinc), que difieren predominantemente en la concentración de cinc usada. Las preparaciones de insulina que contienen cinc también incluyen las que se modifican por protamina, tales como insulina NPH.

En el otro ejemplo, un agente de precipitación, tal como protamina, puede añadirse a un polipéptido de insulina para generar una suspensión microcristalina. Típicamente, las insulinas cristalinas tienen una duración de acción prolongada en comparación con insulinas que no existen en forma cristalina. Una insulina cinc de protamina, cuando se inyecta por vía subcutánea en una suspensión acuosa, se disuelve solamente lentamente en el sitio de deposición, y la insulina se absorbe a una velocidad retardada. La insulina de suspensión de cinc de protamina se ha reemplazado en gran medida por la suspensión de insulina isófana, también conocida como insulina NPH. Es una suspensión de insulina cinc de protamina modificada que es cristalina. Las concentraciones de insulina, protamina y cinc se disponen de tal modo que la preparación tenga un comienzo y una duración de acción intermedios entre los de la insulina regular y la suspensión de insulina cinc de protamina.

Además, las diferencias de pH en las preparaciones también influyen en el tipo y propiedad de la insulina. Las preparaciones de insulina regulares originales se prepararon a un pH de 2,8 a 3,5, de otro modo formarían partículas a intervalos de pH mayores. Las preparaciones de insulina altamente purificada, sin embargo, pueden prepararse en un intervalo de valores de pH. Además, el tamponado de la preparación de insulina permite que la insulina se prepare en una solución a lo largo de un intervalo más amplio de pH. Típicamente, una insulina que se prepara a pH neutro tiene una mayor estabilidad que las preparadas a pH ácido. Por lo tanto, la mayoría de las insulinas se formulan a pH neutro. Una excepción es la insulina glargina, que se proporciona como una formulación comercial a pH 4,0. En virtud de la adición de dos argininas al extremo C terminal de la cadena B, el punto isoelectrico de la insulina glargina se desplaza haciéndola más soluble a un pH ácido. Existe un cambio de aminoácidos adicional en la cadena A (N21G) para prevenir la desamidación y dimerización resultante de una asparagina sensible a ácido. La secuencia de la cadena A de insulina glargina se expone en SEC ID N° 150 y la cadena B se expone en SEC ID N° 151. Ya que la exposición a pH fisiológico se produce tras la administración, se forman microprecipitados, que hacen a la glargina similar a una insulina de acción larga, cristalina.

La Tabla 2 a continuación resume varios tipos de insulina, su inicio de acción y su aplicación.

65

| Tipo   | Nombre de la marca   | Inicio             | Máximo        | Duración    | Aplicación                        |
|--|--|--------------------|---------------|-------------|-----------------------------------|
| <b>Acción Rápida:<br/>Análogos de insulina</b> | Lispro (por ejemplo Humalog®);<br>Aspart (por ejemplo, NovoLog®);<br>Glulisina           | 5-15 minutos       | 45-90 minutos | 3-4 horas   | Control de glucosa postprandial   |
| <b>Acción Rápida:<br/>Insulina regular</b>     | Regular Insulin (por ejemplo, Humulin® R; Novolin® R; Velosulin® Human)                  | 30 minutos -1 hora | 2-5 horas     | 5-8 horas   | Control de glucosa postprandial   |
| <b>Acción Intermedia</b>                       | Lente® (por ejemplo, Humulin® L, Novolin® L); NPH (por ejemplo, Humulin® N, Novolin® N); | 1-3 horas          | 6-12 horas    | 20-24 horas | Complementación de insulina basal |
| <b>Larga Duración</b>                          | Ultralente (por ejemplo Humulin® U); glargina; detemir (un análogo)                      | 4-6 horas          | 18-28 horas   | 28 horas    | Complementación de insulina basal |
| <b>Mezclas</b>                                 | Humulin® 50/50; Humulin® 70/30; Novolin® 70/30; Humalog® Mix 75/25                       | Varía              | Varía         | Varía       |                                   |

- Las insulinas más habitualmente usadas son insulinas de acción rápida, que incluyen insulina regular (es decir insulina nativa o de tipo silvestre, incluyendo variantes alélicas y de especie de la misma) y análogos de insulina de acción rápida. Para los fines del presente documento, la referencia a insulina es una insulina de acción rápida, a no ser que se indique específicamente de otro modo.

Insulina de acción rápida

- Se proporcionan en el presente documento composiciones de insulina de acción súper rápida que contienen una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano soluble. En general, estas composiciones de insulina de acción súper rápida se absorben después de la administración subcutánea y son detectables y tienen un inicio de la acción en la sangre en el periodo de 30 minutos o menos. Las insulinas de acción rápida que pueden usarse para obtener una composición de insulina de acción súper rápida como se describe en el presente documento incluyen insulina regular, que es la insulina de tipo silvestre o nativa. Las insulinas de acción rápida también incluyen análogos de insulina. En virtud de su velocidad de absorción rápida en comparación con insulinas de acción basal, las insulinas de acción rápida se usan predominantemente para fines de control postprandial. Se exponen insulinas de acción rápida ejemplares en la Tabla 3 posterior. Las insulinas de acción rápida también incluyen cualquiera conocida en la técnica, tal como, pero sin limitación, cualquier preparación de insulina y dispositivos desvelados en la Patente de Estados Unidos 7279457 y Publicaciones de Patente de Estados Unidos 20070235365, 20080039368, 20080039365, 20070086952, 20070244467 y 20070191757. Cualquier insulina de acción rápida puede hacerse de acción súper rápida por co-formulación y/o co-administración con una enzima degradante de hialuronano. Una formulación de composición de insulina de acción súper rápida también puede incluir además una mezcla de una insulina de acción rápida con una insulina intermedia o de acción larga, además de una enzima degradante de hialuronano.

| Nombre           | Especie        | Cadena A (SEC ID N°)    | Cadena B (SEC ID N°)   | Nombre Comercial                             |
|------------------|----------------|-------------------------|------------------------|--|
| Insulina Regular | Humana         | SEC ID N°:103           | SEC ID N°:104          | por ejemplo Humulin®; Novolin® R; Velosulin® |
| Insulina Regular | Porcina        | 88-108 de SEC ID N°:123 | 25-54 de SEC ID N°:123 | Iletin II®;                                  |
| Insulina Aspart  | Análogo Humano | SEC ID N°:103           | SEC ID N°:147          | Novolog®                                     |
| Insulina Lispro  | Análogo Humano | SEC ID N°:103           | SEC ID N°:148          | Humalog®                                     |

| TABLA: 3 – INSULINAS DE ACCIÓN RÁPIDA |                |                      |                      |                  |
|---------------------------------------|----------------|----------------------|----------------------|------------------|
| Nombre                                | Especie        | Cadena A (SEC ID N°) | Cadena B (SEC ID N°) | Nombre Comercial |
| Insulina Glulisina                    | Análogo Humano | SEC ID N°: 103       | SEC ID N°:149        | Apidra®          |

#### a. Insulina Regular

Las insulinas regulares incluyen formulaciones que incluyen el polipéptido de insulina nativo o de tipo silvestre. Estas incluyen insulina humana, así como insulinas de especie bovina, porcina y otras. Dichas insulinas pueden prepararse a un pH ácido (por ejemplo, 2,5 a 3,5) o pueden prepararse a un pH neutro (por ejemplo, 7,0-7,8). Las insulinas regulares también incluyen las que contienen cinc. Típicamente, el contenido de cinc en preparaciones de insulina regular varía desde exacta o aproximadamente 0,01-0,04 mg/100 Unidades. Las insulinas humanas regulares se comercializan como Humulin® R, Novolin® R y Velosulin®. La insulina porcina se comercializó como Iletin II®. En general, la insulina regular tiene un inicio de acción de 30 minutos después de la administración subcutánea. Los niveles máximos en plasma se ven en 1-3 horas y la duración de intensidad aumenta con la dosificación. La semivida en plasma después de la administración subcutánea es de aproximadamente 1,5 horas.

#### b. Análogos de Acción Rápida

Los análogos de insulina de acción rápida son formas modificadas de insulina que típicamente contienen uno o más cambios de aminoácidos. Los análogos se diseñan para reducir la auto-asociación de la molécula de insulina con el fin de aumentar la velocidad de absorción e inicio de la acción en comparación con la insulina regular. En general, dichos análogos se formulan en presencia de cinc, y por lo tanto existen como hexámeros de cinc estables. Debido a la modificación, sin embargo, tienen una disociación más rápida del estado hexamérico después de administración subcutánea en comparación con la insulina regular.

#### i. Insulina Lispro

La insulina humana Lispro es una formulación de polipéptido de insulina que contiene cambios de aminoácidos en la posición 28 y 29 de la cadena B de modo que la Pro-Lys en esta posición en la cadena B de insulina de tipo silvestre expuesta en SEC ID N°: 104 se invierte a Lys-Pro. La secuencia de insulina lispro se expone en SEC ID N°: 103 (cadena A) y SEC ID N°: 148 (cadena B). Se comercializa con el nombre de Humalog®. El resultado de la inversión de estos dos aminoácidos es un polipéptido con una propensión reducida a auto-asociarse, lo que permite un inicio de acción más rápido. Específicamente, la inversión de secuencia en la cadena B da como resultado la eliminación de dos interacciones hidrófobas y debilitamiento de dos enlaces de hidrógeno de lámina beta plegada que estabilizan el dímero (véase, por ejemplo DeFelippis *et al.* (2002) *Insulin Chemistry and Pharmacokinetics*. En Ellenberg and Rifkin's *Diabetes Mellitus* (pp. 481-500) McGraw-Hill Professional). El polipéptido se auto-asocia y formas hexámeros como resultado de excipientes proporcionados en la formulación, tales como agentes antimicrobianos (por ejemplo m-cresol) y cinc para estabilización. No obstante, debido a la modificación de aminoácidos, la insulina lispro actúa más rápidamente que la insulina regular.

#### ii. Insulina Aspart

La insulina aspart humana es una formulación de polipéptido de insulina que contiene una sustitución de aminoácido en la posición 28 de la cadena B de insulina humana expuesta en SEC ID N°: 104 de una prolina a un ácido aspártico. La secuencia de insulina aspart se expone en SEC ID N°: 103 (cadena A) y SEC ID N°: 147 (cadena B). Se comercializa con el nombre Novolog®. La modificación en insulina aspart confiere un grupo carboxilo de cadena lateral con carga negativa para crear repulsión de carga y desestabilizar la interacción monómero-monómero. Además, la retirada de la prolina elimina una interacción hidrófoba clave entre monómeros (véase por ejemplo, DeFelippis *et al.* (2002) *Insulin Chemistry and Pharmacokinetics*. En Ellenberg and Rifkin's *Diabetes Mellitus* (pp. 481-500) McGraw-Hill Professional). El análogo existe en gran medida como un monómero, y es menos propenso a agregarse en comparación con otros análogos de acción rápida tales como lispro. En general, la insulina aspart e insulina lispro son similares en sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas respectivas.

#### iii. Insulina Glulisina

La insulina glulisina humana es una formulación de polipéptido de insulina que contiene una sustitución de aminoácidos en la cadena B en la posición B3 de asparagina a lisina y en el ácido amino B29 de lisina a ácido glutámico en comparación con la secuencia de la cadena B de insulina humana expuesta en SEC ID N°: 104. La secuencia de insulina glulisina se expone en SEC ID N°: 103 (cadena A) y SEC ID N°: 149 (cadena B). Se comercializa con el nombre Apidra®. Las modificaciones hacen a la molécula polipeptídica menos propensa a la auto-asociación en comparación con insulina humana. A diferencia de otros análogos de insulina, el polipéptido se



formula comercialmente en ausencia del cinc promotor de hexámero (Becker *et al.* (2008) Clinical Pharmacokinetics, 47:7-20). Por lo tanto, la insulina glulisina tiene una velocidad de inicio más rápida que la insulina lispro y que la insulina aspart.

## 5 D. Enzimas Degradantes de Hialuronano

Se proporcionan en el presente documento composiciones de insulina de acción súper rápida y combinaciones resultantes de la combinación de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano (ácido hialurónico), y métodos para usar dichas composiciones y combinaciones para el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por insulina. Las enzimas de degradación de hialuronano incluyen cualquier enzima que degrade hialuronano. Las enzimas degradantes de hialuronano ejemplares incluyen, pero sin limitación, hialuronidasas y condroitinasas y liasas particulares que tienen la capacidad de escindir al hialuronano. Cuando los métodos y usos proporcionados en el presente documento describen el uso de una hialuronidasa con insulina, en consecuencia puede usarse cualquier enzima degradante de hialuronano. Son enzimas degradantes de hialuronano ejemplares en las composiciones, combinaciones y métodos proporcionados en el presente documento las enzimas degradantes de hialuronano solubles. En virtud de la capacidad de las enzimas degradantes de hialuronano, tales como una hialuronidasa, para degradar el ácido hialurónico en la matriz extracelular, dichas enzimas facilitan la administración de agentes terapéuticos. Por ejemplo, la absorción y dispersión de productos terapéuticos que se co-administran con una enzima degradante de hialuronano tales como por administración subcutánea, aumentan.

El hialuronano, denominado también ácido hialurónico o hialuronato, es un glucosaminoglucano no sulfatado que se distribuye ampliamente por los tejidos conectivos, epiteliales y neurales. El hialuronano es un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente importante de la barrera intersticial. Catalizando la hidrólisis del hialuronano, las enzimas degradantes de hialuronano reducen la viscosidad del hialuronano, aumentando de este modo la permeabilidad tisular y aumentando la velocidad de absorción de fluidos administrados por vía parenteral. Como tales, las enzimas degradantes de hialuronano, tales como hialuronidasas, se han usado, por ejemplo, como agentes de dispersión o propagación junto con otros agentes, fármacos y proteínas para potenciar su dispersión y suministro.

Las enzimas degradantes de hialuronano actúan para degradar hialuronano escindiendo polímeros de hialuronano, que están compuestos de unidades de disacáridos repetidas, ácido D-glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), unidos entre sí mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 y  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3 alternantes. Las cadenas de hialuronano pueden alcanzar aproximadamente 25.000 repeticiones de disacáridos o más de longitud y los polímeros de hialuronano pueden variar en tamaño de aproximadamente 5.000 a 20.000.000 Da *in vivo*. En consecuencia, las enzimas degradantes de hialuronano para los usos y métodos proporcionados incluyen cualquier enzima que tenga la capacidad de catalizar la escisión de una cadena o polímero de disacáridos de hialuronano. En algunos ejemplos la enzima degradante de hialuronano escinde el enlace glucosídico  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 en la cadena o polímero de hialuronano. En otros ejemplos, la enzima degradante de hialuronano cataliza la escisión del enlace glucosídico  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3 en la cadena o polímero de hialuronano.

Como se describe posteriormente, las enzimas degradantes de hialuronano existen en forma unida a membrana o soluble. Para los fines del presente documento, se proporcionan enzimas degradantes de hialuronano solubles para su uso en los métodos, usos, composiciones o combinaciones en el presente documento. Por lo tanto, cuando las enzimas degradantes de hialuronano incluyen un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) y/o están de otra manera ancladas a membrana o son insolubles, se proporcionan en el presente documento enzimas degradantes de hialuronano en forma soluble. Por lo tanto, las enzimas degradantes de hialuronano incluyen variantes truncadas, por ejemplo, truncadas para retirar todo o una parte de un anclaje de GPI. Las enzimas degradantes de hialuronano proporcionadas en el presente documento también incluyen variantes alélicas o de especie u otras variantes, de una enzima degradante de hialuronano soluble. Por ejemplo, las enzimas degradantes de hialuronano pueden contener uno o más variaciones en su secuencia primaria, tales como sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos. Una variante de una enzima degradante de hialuronano muestra en general al menos o aproximadamente un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia en comparación con la enzima degradante de hialuronano que no contiene la variación. Puede incluirse cualquier variación en la enzima degradante de hialuronano para los fines del presente documento siempre que la enzima conserve actividad hialuronidasa, tal como al menos o aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de la actividad de una enzima degradante de hialuronano que no contiene la variación (según se mide mediante ensayos *in vitro* y/o *in vivo* bien conocidos en la técnica y descritos en el presente documento).

### 60 1. Hialuronidasas

Las hialuronidasas son miembros de una familia grande de enzimas degradantes de hialuronano. Hay tres clases generales de hialuronidasas: hialuronidasas de tipo mamífero, hialuronidasas bacterianas e hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Dichas enzimas pueden usarse en las composiciones y métodos proporcionados.

**a. Hialuronidasas de tipo de mamífero**

Las hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35) son endo- $\beta$ -N-acetil-hexosaminidasas que hidrolizan el enlace glucosídico  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 de hialuronano en diversas longitudes de oligosacárido tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. Estas enzimas tienen actividades tanto hidrolíticas como de transglucosidasa, y pueden degradar al hialuronano y a condroitín sulfatos (CS), generalmente, C4-S y C6-S. Las hialuronidasas de este tipo incluyen, pero sin limitación, hialuronidasas de vacas (bovinas) (SEC ID N°: 10, 11 y 64 y BH55 (Patente de Estados Unidos N° 5.747.027 y 5.827.721)), ovejas (*ovis aries*) (SEC ID N°: 26, 27, 63 y 65), avispa amarilla (SEC ID N°: 12 y 13) abeja melífera (SEC ID N°: 14), *Dolichovespula maculata* (SEC ID N°: 15), avispa cartonera (SEC ID N°: 16), ratón (SEC ID N°: 17-19, 31), cerdo (SEC ID N°: 20-21), rata (SEC ID N°: 22-24, 30), conejo (SEC ID N°: 25), orangután (SEC ID N°: 28), mono cynomolgus (SEC ID N°: 29), cobaya (SEC ID N°: 32), y hialuronidasas humanas. Son ejemplos de hialuronidasas en las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento las hialuronidasas solubles.

Las hialuronidasas de mamífero pueden subdividirse adicionalmente en las que son activas neutras, predominantemente halladas en extractos de testículo, y activas ácidas, predominantemente halladas en órganos tales como el hígado. Las hialuronidasas activas neutras ejemplares incluyen PH20, incluyendo pero sin limitación, PH20 derivada de diferentes especies tales como ovina (SEC ID N°: 27), bovina (SEC ID N°: 11) y humana (SEC ID N°: 1). La PH20 humana (también conocida como SPAM1 o PH20 de proteína de superficie de espermatozoide) se une en general a la membrana plasmática mediante un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI). Está implicada de forma natural en la adhesión de espermatozoide-ovocito y ayuda a la penetración por el espermatozoide de la capa de células del cúmulus digiriendo ácido hialurónico.

Además de la PH20 humana (también denominada SPAM1), se han identificado cinco genes de tipo hialuronidasa en el genoma humano, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 y HYALP1. HYALP1 es un pseudogén y no se ha mostrado que HYAL3 (SEC ID N°: 38) posea actividad enzimática hacia ningún sustrato conocido. HYAL4 (polipéptido precursor expuesto en SEC ID N°: 39) es una condroitinasa y muestra poca actividad hacia hialuronano. HYAL1 (polipéptido precursor expuesto en SEC ID N°: 36) es la enzima activa ácida prototípica y PH20 (polipéptido precursor expuesto en SEC ID N°: 1) es la enzima activa neutra prototípica. Las hialuronidasas activas ácidas, tales como HYAL1 y HYAL2 (polipéptido precursor expuesto en SEC ID N°: 37) generalmente carecen de actividad catalítica a pH neutro (es decir pH 7). Por ejemplo, HYAL1 tiene poca actividad catalítica *in vitro* sobre pH 4,5 (Frost *et al.* (1997) Anal. Biochem. 251: 263-269). HYAL2 es una enzima activa ácida con una actividad específica muy baja *in vitro*. Las enzimas de tipo hialuronidasa también pueden caracterizarse por las que se unen en general a la membrana plasmática mediante un anclaje glucosilfosfatidilinositol (GPI) tales como HYAL2 humana y PH20 humana (Danilkovitch-Miagkova, *et al.* (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100(8): 4580-5), y las que son en general solubles tales como HYAL1 humana (Frost *et al.* (1997) Biochem Biophys Res Commun. 236(1): 10-5).

**PH20**

PH20, como otras hialuronidasas de mamífero, es una endo- $\beta$ -N-acetil-hexosaminidasa que hidroliza el enlace glucosídico  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 de ácido hialurónico en diversas longitudes de oligosacáridos tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. Tienen actividades tanto hidrolítica como transglucosidasa y pueden degradar el ácido hialurónico y condroitín sulfatos, tales como C4-S y C6-S. La PH20 está implicada de forma natural en la adhesión de espermatozoide-ovocito y ayuda en la penetración por el espermatozoide de la capa de células del cúmulus digiriendo el ácido hialurónico. La PH20 se localiza en la superficie del espermatozoide y en el acrosoma derivado de lisosoma, donde se une con la membrana acrosómica interna. La PH20 de la membrana plasmática tiene actividad hialuronidasa solamente a pH neutro, mientras que la PH20 de membrana acrosómica interna tiene actividad a pH tanto neutro como ácido. Además de ser una hialuronidasa, la PH20 también parece ser un receptor para señalización celular inducida por HA, y un receptor para a zona pelúcida que rodea al oocito.

Las proteínas PH20 ejemplares incluyen, pero sin limitación, PH20 humana (polipéptido precursor expuesto en SEC ID N°: 1, polipéptido maduro expuesto en SEC ID N°: 2), chimpancé (SEC ID N°: 185), mono Rhesus (SEC ID N°: 186) bovina (SEC ID N°: 11 y 64), de conejo (SEC ID N°: 25), PH20 ovina (SEC ID N°: 27,63 y 65), de mono Cynomolgus (SEC ID N°: 29), de cobaya (SEC ID N°: 30), de rata (SEC ID N°: 31) y de ratón (SEC ID N°: 32).

La PH20 bovina es un polipéptido precursor de 553 aminoácidos (SEC ID N°: 11). El alineamiento de la PH20 bovina con la PH20 humana muestra solamente homología débil, con múltiples huecos existentes del aminoácido 470 hasta el extremo carboxilo terminal respectivo debido a la ausencia de un anclaje de GPI en el polipéptido bovino (véase por ejemplo, Frost GI (2007) Expert Opin. Drug. Deliv. 4: 427-440). De hecho, no se predicen anclajes de GPI claros en muchas otras especies de PH20 además de la humana. Por lo tanto, los polipéptidos de PH20 producidos de ovinos y bovinos existen de forma natural como formas solubles. Aunque la PH20 bovina existe unida muy débilmente a la membrana plasmática, no se ancla mediante un anclaje sensible a fosfolipasa (Lalancette *et al.* (2001) Biol Reprod. 65(2): 628-36). Esta característica única de la hialuronidasa bovina ha permitido el uso de la enzima hialuronidasa de testículo bovino soluble como un extracto para uso clínico (Wydase®, Hyalase®).

El transcrito de ARNm de PH20 humana se traduce normalmente para generar un polipéptido precursor de 509 aminoácidos (SEC ID N°: 1; y replicado posteriormente) que contiene una secuencia señal de 35 aminoácidos en el extremo N terminal (posiciones de restos de aminoácidos 1-35) y una secuencia señal de unión a anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) de 19 aminoácidos en el extremo C terminal (posiciones de restos de aminoácidos 491-509). La PH20 madura es, por lo tanto, un polipéptido de 474 aminoácidos expuesto en SEC ID N°: 2. Después del transporte del polipéptido precursor al RE y la retirada del péptido señal, el péptido señal de unión a GPI C terminal se escinde para facilitar la unión covalente de un anclaje de GPI al aminoácido C terminal de nueva formación en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 490 del polipéptido precursor expuesto en SEC ID N°: 1. Por lo tanto, se produce un polipéptido maduro anclado a GPI de 474 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 2.

Secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor de PH20 humano (SEC ID N°: 1; 509 aminoácidos):

**MGVLKFKHIFFRSFKSSGVSQIVFTFLLI PCCLTLNFRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLD  
MSLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDR LGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVD  
NLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLG**

**KLRLPNHLWGYLFPDCYNH HYKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATL  
YVRNRVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVINGTLSIM  
RSMKSCLLLDNYMETILNPYI INVTLAAKMCSQVL CQEQGV CIRKNWNSSDY LHLNPDNFATIQLEKGGK  
FTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAF LKPPMETEEPQIFYN  
ASPSTLSATMFIVSILFLIISVASL**

La PH20 humana muestra actividad hialuronidasa a pH tanto neutro como ácido. En un aspecto, la PH20 humana es la hialuronidasa activa neutra prototípica que se genera fijada a la membrana plasmática mediante un anclaje de GPI. En otro aspecto, la PH20 se expresa en la membrana acrosómica interna donde tiene actividad hialuronidasa a pH tanto neutro como ácido. Parece que la PH20 contiene dos sitios catalíticos en regiones distintas del polipéptido: las regiones de Péptido 1 y Péptido 3 (Cherr *et al.*, (2001) *Matrix Biology* 20: 515-525). Las pruebas sugieren que la región del Péptido 1 de PH20, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 107-137 del polipéptido maduro expuesto en SEC ID N°: 2 y las posiciones 142-172 del polipéptido precursor expuesto en SEC ID N°: 1, se requiere para la actividad enzimática a pH neutro. Los aminoácidos en las posiciones 111 y 113 (correspondientes al polipéptido de PH20 maduro expuesto en SEC ID N°: 2) dentro de esta región parece ser importante para la actividad, ya que la mutagénesis por reemplazo de aminoácidos da como resultado polipéptidos de PH20 con actividad hialuronidasa al 3 % o actividad hialuronidasa indetectable, respectivamente, en comparación con la PH20 de tipo silvestre (Arming *et al.*, (1997) *Eur. J. Biochem.* 247: 810-814).

La región del Péptido 3, que corresponde a las posiciones de aminoácido 242-262 del polipéptido maduro expuesto en SEC ID N°: 2, y las posiciones 277-297 del polipéptido precursor expuesto en SEC ID N°: 1, parecen ser importantes para la actividad enzimática a pH ácido. Dentro de esta región, los aminoácidos en las posiciones 249 y 252 del polipéptido de PH20 maduro parecen ser esenciales para la actividad, y la mutagénesis de una de las dos da como resultado un polipéptido esencialmente desprovisto de actividad (Arming *et al.*, (1997) *Eur. J. Biochem.* 247: 810-814).

Además de los sitios catalíticos, la PH20 también contiene un sitio de unión a hialuronano. Las pruebas experimentales sugieren que este sitio está localizado en la región de Péptido 2, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 205-235 del polipéptido precursor expuesto en SEC ID N°: 1 y las posiciones 170-200 del polipéptido maduro expuesto en SEC ID N°: 2. Esta región está altamente conservada entre hialuronidasas y es similar al motivo de unión a heparina. La mutación del resto de arginina en la posición 176 (correspondiente al polipéptido de PH20 maduro expuesto en SEC ID N°: 2) a una glicina da como resultado un polipéptido con solamente aproximadamente 1 % de la actividad hialuronidasa del polipéptido de tipo silvestre (Arming *et al.*, (1997) *Eur. J. Biochem.* 247: 810-814).

Hay siete sitios de glucosilación ligados a N potenciales en PH20 humana en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 del polipéptido ejemplificado en SEC ID N°: 1. Debido a que los aminoácidos 36 a 464 de SEC ID N°: 1 parecen contener el dominio de hialuronidasa de PH20 humana mínimamente activo, el sitio de glucosilación ligado a N N-490 no se requiere para actividad hialuronidasa apropiada. Hay seis enlaces disulfuro en PH20. Se forman dos enlaces disulfuro entre los restos de cisteína C60 y C351 y entre C224 y C238 del polipéptido ejemplificado en SEC ID N°: 1 (correspondiente a los restos C25 y C316, y C189 y C203 del polipéptido maduro expuesto en SEC ID N°: 2, respectivamente). Se forman cuatro enlaces disulfuro adicionales entre los restos de cisteína C376 y C387; entre C381 y C435; entre C437 y C443; y entre C458 y C464 del polipéptido ejemplificado en SEC ID N°: 1

(correspondiente a los restos C341 y C352; entre C346 y C400; entre C402 y C408; y entre C423 y C429 del polipéptido maduro expuesto en SEC ID N°: 2, respectivamente).

#### b. Hialuronidasas bacterianas

5 Las hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.2.1 o EC 4.2.99.1) degradan el hialuronano y, en diversos grados, condroitín sulfatos y dermatán sulfatos. Las hialuronano liasas aisladas de bacterias difieren de las hialuronidasas (de otras fuentes, por ejemplo, hialuronoglucosaminidasas, EC 3.2.1.35) por su modo de acción. Son endo- $\beta$ -N-acetilhexosaminidasas que catalizan una reacción de eliminación, en lugar de hidrólisis, del enlace  $\beta$ 1-4-glucosídico  
10 entre restos de N-acetil-beta-D-glucosamina y ácido D-glucurónico en hialuronano, produciendo productos finales de 3-(4-desoxi- $\beta$ -D-gluc-4-enuronosil)-N-acetil-D-glucosamina tetra y hexasacáridos y disacáridos. La reacción da como resultado la formación de oligosacáridos con restos de ácido hexurónico insaturados en sus extremos no reductores.

15 Las hialuronidasas ejemplares de bacterias para su uso en las composiciones, combinaciones y métodos proporcionados incluyen, pero sin limitación, enzimas degradantes de hialuronano en microorganismos, incluyendo cepas de *Arthrobacter*, *Bdellovibrio*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Peptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, y *Streptomyces*. Los ejemplos particulares de dichas enzimas incluyen, pero sin limitación *Arthrobacter* sp. (cepa FB24) (SEC ID N°: 67), *Bdellovibrio bacteriovorus* (SEC ID N°: 68), *Propionibacterium acnes* (SEC ID N°: 69), *Streptococcus agalactiae* ((SEC ID N°: 70); 18RS21 (SEC ID N°: 71); serotipo Ia (SEC ID N°: 72); serotipo III (SEC ID N°: 73)), *Staphylococcus aureus* (cepa COL) (SEC ID N°: 74); cepa MRSA252 (SEC ID N°: 75 y 76); cepa MSSA476 (SEC ID N°: 77); cepa NCTC 8325 (SEC ID N°: 78); cepa bovina RF122 (SEC ID N°: 79 y 80); cepa USA300 (SEC ID N°: 81), *Streptococcus pneumoniae* ((SEC ID N°: 82); cepa ATCC BAA-255 / R6 (SEC ID N°: 83); serotipo 2, cepa D39 / NCTC 7466 (SEC ID N°: 84)), *Streptococcus pyogenes* (serotipo M1) (SEC ID N°: 85); serotipo M2, cepa MGAS10270 (SEC ID N°: 86); serotipo M4, cepa MGAS10750 (SEC ID N°: 87); serotipo M6 (SEC ID N°: 88); serotipo M12, cepa MGAS2096 (SEC ID N°: 89 y 90); serotipo M12, cepa MGAS9429 (SEC ID N°: 91); serotipo M28 (SEC ID N°: 92); *Streptococcus suis* (SEC ID N°: 93-95); *Vibrio fischeri* (cepa ATCC 700601/ ES114 (SEC ID N°: 96)), y la enzima hialuronidasa de *Streptomyces hyaluronolyticus*, que es específica para ácido hialurónico y no escinde condroitina o condroitín sulfato (Ohya, T. y Kaneko, Y. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 198: 607).

#### c. Hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos

35 Las hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos (EC 3.2.1.36) son endo- $\beta$ -glucuronidasas que generan productos finales tetra y hexasacáridos. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces 1 $\rightarrow$ 3 entre restos de  $\beta$ -D-glucuronato y N-acetil-D-glucosamina en hialuronato. Las hialuronidasas ejemplares de sanguijuelas incluyen, pero sin limitación, hialuronidasa de Hirudinidae (por ejemplo, *Hirudo medicinalis*), Erpobdellidae (por ejemplo, *Nepheleopsis obscura* y *Erpobdella punctata*), Glossiphoniidae (por ejemplo, *Desserobdella picta*, *Helobdella stagnalis*, *Glossiphonia complanata*, *Placobdella ornata* y *Theromyzon* sp.) y Haemopidae (*Haemopsis marmorata*) (Hovingh *et al.* (1999) *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 124(3): 319-26). Una hialuronidasa ejemplar de bacterias que tienen el mismo mecanismo de acción que la hialuronidasa de sanguijuela es la de la cianobacteria, *Synechococcus* sp. (cepa RCC307, SEC ID N°: 97).

## 2. Otras enzimas degradantes de hialuronano

45 Además de la familia de hialuronidasa, pueden usarse otras enzimas degradantes de hialuronano junto con la insulina de acción rápida en las composiciones y métodos proporcionados. Por ejemplo, pueden emplearse enzimas, incluyendo condroitinasas y liasas particulares, que tienen la capacidad para escindir hialuronano. Las condroitinasas ejemplares que pueden degradar hialuronano incluyen, pero sin limitación, condroitín ABC liasa (también conocida como condroitinasa ABC), condroitín AC liasa (también conocida como condroitín sulfato liasa o condroitín sulfato eliminasa) y condroitín C liasa. Se conocen en la técnica métodos para producción y purificación de dichas enzimas para uso en las composiciones y métodos proporcionados (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.054.569; Yamagata, *et al.* (1968) *J. Biol. Chem.* 243(7): 1523-1535; Yang *et al.* (1985) *J. Biol. Chem.* 160(30): 1849-1857).

55 La condroitín ABC liasa contiene dos enzimas, condroitín-sulfato-ABC endoliasa (EC 4.2.2.20) y condroitín-sulfato-ABC exoliasa (EC 4.2.2.21) (Hamai *et al.* (1997) *J Biol Chem.* 272(14): 9123-30), que degradan una diversidad de glucosaminoglucanos del tipo condroitín sulfato y dermatán sulfato. El condroitín sulfato, proteoglucano de condroitín sulfato y dermatán sulfato son los sustratos preferidos para la condroitín-sulfato-ABC endoliasa, pero la enzima también puede actuar en hialuronano a una menor velocidad. La condroitín-sulfato-ABC endoliasa degrada una  
60 diversidad de glucosaminoglucanos del tipo condroitín sulfato y dermatán sulfato, produciendo una mezcla de oligosacáridos insaturados  $\Delta$ 4 de diferentes tamaños que en última instancia se degradan a tetra y disacáridos insaturados  $\Delta$ 4. La condroitín sulfato-ABC exoliasa tiene la misma especificidad de sustrato pero elimina restos disacáridos de los extremos no reductores tanto de condroitín sulfatos poliméricos como de sus fragmentos oligosacáridos producidos por condroitín-sulfato-ABC endoliasa (Hamai, A. *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 9123-9130). Unas condroitín-sulfato-ABC endoliasas y condroitín-sulfato-ABC exoliasas ejemplares incluyen, pero sin  
65

limitación, las de *Proteus vulgaris* y *Flavobacterium heparinum* (la condroitín sulfato-ABC endoliasa de *Proteus vulgaris* se expone en SEC ID N°: 98 (Sato *et al.* (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol. 41(1): 39-46).

5 La condroitín AC liasa (EC 4.2.2.5) está activa en condroitín sulfatos A y C, condroitina y ácido hialurónico, pero no está activa en dermatán sulfato (condroitín sulfato B). Las enzimas condroitinasa AC ejemplares de las bacterias incluyen, pero sin limitación, las de *Flavobacterium heparinum* y *Victivallis vadensis*, expuestas en SEC ID N°: 99 y 100, respectivamente, y *Arthrobacter aurescens* (Tkalec *et al.* (2000) Applied and Environmental Microbiology 66(1): 29-35; Ernst *et al.* (1995) Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30(5): 387-444).

10 La condroitinasa C escinde condroitín sulfato C produciendo tetrasacárido más un disacárido 6 sulfatado insaturado (delta Di-6S). También escinde el ácido hialurónico produciendo un disacárido no sulfatado insaturado (delta Di-OS). Las enzimas condroitinasa C ejemplares de las bacterias incluyen, pero sin limitación, las de *Streptococcus* y *Flavobacterium* (Hibi *et al.* (1989) FEMS-Microbiol-Lett. 48(2): 121-4; Michelacci *et al.* (1976) J. Biol. Chem. 251: 1154-8; Tsuda *et al.* (1999) Eur. J. Biochem. 262: 127-133)

15

### 3. Enzimas degradantes de hialuronano solubles

Se proporcionan en las composiciones y métodos del presente documento enzimas degradantes de hialuronano solubles, incluyendo hialuronidasas solubles. Las enzimas degradantes de hialuronano soluble incluyen cualquier enzima degradante de hialuronano que exista en forma soluble, incluyendo, pero sin limitación, hialuronidasas solubles, incluyendo hialuronidasas solubles no humanas, incluyendo hialuronidasas solubles de animales no humanos, hialuronidasas solubles bacterianas y hialuronidasas humanas, Hyal1, PH20 bovina y PH20 ovina, variantes alélicas de las mismas y otras variantes de las mismas. Por ejemplo, se incluyen entre las enzimas degradantes de hialuronano solubles cualquier enzima degradante de hialuronano que se haya modificado para ser soluble, incluyendo cualquiera descrita en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° de Serie 61/201.384. Por ejemplo, las enzimas degradantes de hialuronano que contienen un anclaje de GPI pueden hacerse solubles por truncamiento de y retirada de todo o una parte del anclaje de GPI. En una ejemplo, la hialuronidasa humana PH20, que normalmente se ancla a membrana mediante un anclaje de GPI, puede hacerse soluble por truncamiento de y retirada de todo o una parte del anclaje de GPI en el extremo C terminal.

30

Las enzimas degradantes de hialuronano solubles también incluyen hialuronidasas activas ácidas y activas neutras. Dependiendo de factores tales como, pero sin limitación, el nivel deseado de actividad de la enzima después de la administración y/o sitio de administración, pueden seleccionarse hialuronidasas activas neutras y activas ácidas. En un ejemplo particular, la enzima degradante de hialuronano para uso en las composiciones, combinaciones y métodos en el presente documento es una hialuronidasa activa neutra soluble.

35

Es una hialuronidasa soluble ejemplar PH20 de cualquier especie, tal como cualquier expuesta en cualquiera de SEC ID N°: 1, 2, 11, 25, 27, 30, 31, 63-65 y 185-186, o formas truncadas de las mismas que carecen de todo o una parte del anclaje de GPI C terminal, siempre que la hialuronidasa sea soluble y conserve la actividad hialuronidasa. También se incluyen entre las hialuronidasas solubles variantes alélicas u otras variantes de cualquiera de SEC ID N°: 1, 2, 11, 25, 27, 30 31, 63-65 y 185-186, o formas truncadas de las mismas. Se conocen por los expertos en la materia variantes alélicas y otras variantes, e incluyen polipéptidos que tienen 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o más identidad de secuencia con cualquiera de SEC ID N°: 1, 2, 11, 25, 27, 30, 31, 63-65 y 185-186, o formas truncadas de las mismas. Las variantes de aminoácidos incluyen mutaciones conservativas y no conservativas. Debe entenderse que los restos que son importantes o se requieren de otro modo para la actividad de una hialuronidasa, tal como cualquiera descrito anteriormente o conocido por los expertos en la materia, son generalmente invariantes. Estos incluyen, por ejemplo, restos de sitio activo. Por lo tanto, por ejemplo, los restos de aminoácidos 111, 113 y 176 (correspondientes a los restos en el polipéptido de PH20 maduro expuesto en SEC ID N°: 2) de un polipéptido de PH20 humano, o forma soluble del mismo, son generalmente invariantes y no se alteran. Otros restos que confieren glucosilación y formación de enlaces disulfuro requeridos para el plegamiento apropiado también pueden ser invariantes.

50

En algunos casos, la enzima degradante de hialuronano soluble está normalmente anclada a GPI (tal como, por ejemplo, PH20 humana) y se hace soluble por truncamiento en el extremo C terminal. Dicho truncamiento puede retirar toda la secuencia señal de unión a anclaje de GPI, o puede retirar solamente parte de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI. El polipéptido resultante, sin embargo, es soluble. En casos en los que la enzima degradante de hialuronano soluble conserve una parte de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI, pueden conservarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más restos de aminoácidos en la secuencia señal de unión a anclaje de GPI, siempre que el polipéptido sea soluble. Los polipéptidos que contienen uno o más aminoácidos del anclaje de GPI se denominan enzimas degradantes de hialuronano solubles extendidas. Un experto en la materia puede determinar si un polipéptido está anclado a GPI usando métodos bien conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, usar algoritmos conocidos para predecir la presencia y localización de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI y sitio  $\omega$ , y realizar análisis de solubilidad antes y después de digestión con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) o D (PI-PLD).

65

Pueden producirse enzimas degradantes de hialuronanos solubles extendidas realizando truncamientos C terminales a cualquier enzima degradante de hialuronano anclada a GPI de forma natural de modo que el polipéptido resultante sea soluble y contenga uno o más restos de aminoácidos de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI. Las enzimas degradantes de hialuronano solubles extendidas ejemplares que están truncadas en el extremo C terminal pero conservan una parte de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI incluyen, pero sin limitación, polipéptidos de PH20 soluble extendida (esPH20) de origen de primate, tal como, por ejemplo, polipéptidos de esPH20 humanos y de chimpancé. Por ejemplo, los polipéptidos de esPH20 pueden realizarse por truncamiento C terminal de cualquiera de los polipéptidos maduros o precursores expuestos en SEC ID N°: 1, 2 o 185, o variantes alélicas u otras de los mismos, incluyendo fragmento activo de los mismos, donde el polipéptido resultante es soluble y conserva uno o más restos de aminoácidos de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI. Se conocen por expertos en la materia variantes alélicas y otras variantes, e incluyen polipéptidos que tienen 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más identidad de secuencia con cualquiera de SEC ID N°: 1 o 2. Los polipéptidos de esPH20 proporcionados en el presente documento pueden estar truncados en el extremo C terminal en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos en comparación con el polipéptido de tipo silvestre, tal como un polipéptido con una secuencia expuesta en SEC ID N°: 1, 2 o 185, siempre que el polipéptido de esPH20 resultante sea soluble y conserve 1 o más restos de aminoácidos de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI.

Típicamente, para uso en las composiciones, combinaciones y métodos en el presente documento, se usa una enzima degradante de hialuronano humana soluble, tal como una PH20 humana soluble. Aunque pueden utilizarse enzimas degradantes de hialuronano, tales como PH20, de otros animales, dichas preparaciones son potencialmente inmunogénicas, ya que son proteínas animales. Por ejemplo, una proporción significativa de pacientes demuestran sensibilización previa secundaria a alimentos ingeridos, y ya que estas son proteínas animales, todos los pacientes tienen un riesgo de sensibilización posterior. Por lo tanto, las preparaciones no humanas pueden no ser adecuadas para su uso crónico. Si se desean preparaciones no humanas, se contempla en el presente documento que dichos polipéptidos pueden prepararse para tener inmunogenicidad reducida. Dichas modificaciones están dentro del nivel de un experto en la materia y pueden incluir, por ejemplo, retirada y/o reemplazo de uno o más epítopos antígenicos en la molécula.

Las enzimas degradantes de hialuronano, incluyendo hialuronidasas (por ejemplo, PH20), usadas en los métodos del presente documento pueden producirse de forma recombinante o pueden purificarse o parcialmente purificarse de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, de extractos de testículo. Se proporcionan métodos para producción de proteínas recombinantes, incluyendo enzimas degradantes de hialuronano recombinantes en otra parte en el presente documento y se conocen bien en la técnica.

#### 35 a. PH20 humana soluble

La PH20 humana soluble es una hialuronidasa soluble ejemplar. Se han producido formas solubles de PH20 humana recombinante y pueden usarse en las composiciones, combinaciones y métodos descritos en el presente documento. La producción de dichas formas solubles de PH20 se describe en la Solicitudes de Patentes Publicadas de Estados Unidos N° US20040268425; US 20050260186 y US20060104968, y en los Ejemplos posteriores. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 solubles, incluyen polipéptidos variantes truncados en el extremo C terminal que incluyen una secuencia de aminoácidos en SEC ID N°: 1, o tiene al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95 %, 97 %, 98 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos incluida en SEC ID N°: 1, conservan la actividad hialuronidasa y son solubles. Se incluyen entre estos polipéptidos los polipéptidos de PH20 solubles que carecen completamente de toda o una parte de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI. También se incluyen polipéptidos de PH20 soluble extendida (esPH20) que contienen al menos un aminoácido del anclaje de GPI.

Por lo tanto, en lugar de tener un anclaje de GPI unido covalentemente con el extremo C terminal de la proteína en el RE y anclarse a la lámina extracelular de la membrana plasmática, estos polipéptidos se secretan y son solubles. Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C terminal pueden estar truncados en el extremo C terminal por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más aminoácidos en comparación con el polipéptido de tipo silvestre de longitud completa, tal como un polipéptido de tipo silvestre de longitud completa con una secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o 2, o variantes alélicas o de especie u otras variantes de los mismos.

Los polipéptidos de PH20 humana truncada en el extremo C terminal ejemplares proporcionados en el presente documento incluyen cualquiera que tenga truncamientos C terminales para generar polipéptidos que contengan del aminoácido 1 al aminoácido 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1, o posiciones correspondientes en una variante alélica o de especie de los mismos. Cuando se expresa en células de mamífero, la secuencia señal N terminal de 35 aminoácidos se escinde durante el procesamiento, y se secreta la forma madura de la proteína. Por lo tanto, los polipéptidos de PH20 soluble truncada en el extremo C terminal maduros ejemplares pueden contener los aminoácidos 36 a 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 o posiciones correspondientes en una variante alélica o de especie de la misma. La tabla 4 proporciona ejemplos no limitantes de polipéptidos de PH20 truncada en el extremo C terminal ejemplares, incluyendo polipéptidos de PH20 soluble truncada en el extremo C

terminal. En la Tabla 4 a continuación, se proporcionan la longitud (en aminoácidos) de los polipéptidos precursores y maduros, y el identificador de secuencia (SEC ID N°) en el que se exponen las secuencias de aminoácidos ejemplares de los polipéptidos precursores y maduros de las proteínas PH20 truncadas en el extremo C terminal. El polipéptido de PH20 de tipo silvestre también se incluye en la Tabla 4 para comparación.

5

**Tabla 4. Polipéptidos de PH20 truncada en el extremo C terminal ejemplares**

| <b>Polipéptido</b> | <b>Precursor (aminoácidos)</b> | <b>Precursor SEC ID N°</b> | <b>Maduro (aminoácidos)</b> | <b>Maduro SEC ID N°</b> |
|--------------------|--------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| tipo silvestre     | 509                            | 1                          | 474                         | 2                       |
| SPAM1-FIVS         | 497                            | 191                        | 462                         | 235                     |
| SPAM1-MFIV         | 496                            | 225                        | 461                         | 269                     |
| SPAM1-TMFI         | 495                            | 192                        | 460                         | 236                     |
| SPAM1-ATMF         | 494                            | 226                        | 459                         | 270                     |
| SPAM1-SATM         | 493                            | 193                        | 458                         | 237                     |
| SPAM1-LSAT         | 492                            | 227                        | 457                         | 271                     |
| SPAM1-TLSA         | 491                            | 194                        | 456                         | 238                     |
| SPAM1-PSTL         | 489                            | 195                        | 454                         | 239                     |
| SPAM1-SPST         | 488                            | 228                        | 453                         | 272                     |
| SPAM1-STLS         | 490                            | 196                        | 455                         | 240                     |
| SPAM1-ASPS         | 487                            | 197                        | 452                         | 241                     |
| SPAM1-NASP         | 486                            | 229                        | 451                         | 273                     |
| SPAM1-YNAS         | 485                            | 198                        | 450                         | 242                     |
| SPAM1-FYNA         | 484                            | 199                        | 449                         | 243                     |
| SPAM1-IFYN         | 483                            | 46                         | 448                         | 48                      |
| SPAM1-QIFY         | 482                            | 3                          | 447                         | 4                       |
| SPAM1-PQIF         | 481                            | 45                         | 446                         | 5                       |
| SPAM1-EPQI         | 480                            | 44                         | 445                         | 6                       |
| SPAM1-EEPQ         | 479                            | 43                         | 444                         | 7                       |
| SPAM1-TEEP         | 478                            | 42                         | 443                         | 8                       |
| SPAM1-ETEE         | 477                            | 41                         | 442                         | 9                       |
| SPAM1-METE         | 476                            | 200                        | 441                         | 244                     |
| SPAM1-PMET         | 475                            | 201                        | 440                         | 245                     |
| SPAM1-PPME         | 474                            | 202                        | 439                         | 246                     |
| SPAM1-KPPM         | 473                            | 203                        | 438                         | 247                     |
| SPAM1-LKPP         | 472                            | 204                        | 437                         | 248                     |
| SPAM1-FLKP         | 471                            | 205                        | 436                         | 249                     |
| SPAM1-AFLK         | 470                            | 206                        | 435                         | 250                     |
| SPAM1-DAFL         | 469                            | 207                        | 434                         | 251                     |
| SPAM1-IDAF         | 468                            | 208                        | 433                         | 252                     |
| SPAM1-CIDA         | 467                            | 40                         | 432                         | 47                      |
| SPAM1-VCID         | 466                            | 209                        | 431                         | 253                     |

| Polipéptido | Precursor (aminoácidos) | Precursor SEC ID N° | Maduro (aminoácidos) | Maduro SEC ID N° |
|-------------|-------------------------|---------------------|----------------------|------------------|
| SPAM1-GVCI  | 465                     | 210                 | 430                  | 254              |

Las formas solubles incluyen, pero sin limitación, cualquiera que tenga truncamientos C terminales para generar polipéptidos que contengan los aminoácidos 1 al aminoácido 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1. Cuando se expresa en células de mamífero, la secuencia señal N terminal de 35 aminoácidos se escinde durante el procesamiento, y se secreta la forma madura de la proteína. Por lo tanto, los polipéptidos solubles maduros contienen los aminoácidos 36 a 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 de SEC ID N°: 1. Los mutantes de delección que terminan en la posición de aminoácido 477 a 483 (correspondiente al polipéptido precursor expuesto en SEC ID N°: 1) muestran mayor actividad hialuronidasa secretada que la forma anclada a GPI de longitud completa. Por lo tanto, son hialuronidasas solubles ejemplares los polipéptidos de PH20 humana soluble que son de 442, 443, 444, 445, 446 o 447 aminoácidos de longitud, tal como se expone en cualquiera de SEC ID N°: 4-9, o variantes alélicas o de especie u otras variantes de los mismos.

Se producen formas generalmente solubles de PH20 usando sistemas de expresión de proteínas que facilitan la glucosilación N correcta para asegurar que el polipéptido conserve la actividad, ya que la glucosilación es importante para la actividad catalítica y la estabilidad de las hialuronidasas. Dichas células incluyen, por ejemplo, células de Ovario de Hámster Chino (CHO) (por ejemplo células CHO DG44).

#### b. rHuPH20

Se han generado formas solubles recombinantes de PH20 humana y pueden usarse en las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento. La generación de dichas formas solubles de PH20 humana recombinante se describen en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° US20040268425; US 20050260186 y US20060104968, y en los Ejemplos 2-6, posteriores. Son ejemplos de dichos polipéptidos los generados a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica los aminoácidos 1-482 (expuesta en SEC ID N°: 3). Dicha molécula de ácido nucleico ejemplar se expone en SEC ID N°: 49. El procesamiento postraduccional retira la secuencia señal de 35 aminoácidos, dejando una PH20 humana recombinante soluble de 447 aminoácidos (SEC ID N°: 4). Como se produce en el medio de cultivo hay heterogeneidad en el extremo C terminal de modo que el producto, designado rHuPH20, incluye una mezcla de especies que pueden incluir una cualquiera o más de SEC ID N° 4-9 en diversa abundancia. Típicamente, rHuPH20 se produce en células que facilitan la N-glucosilación correcta para conservar la actividad, tal como células CHO (por ejemplo células CHO DG44).

#### 4. Glucosilación de enzimas degradantes de hialuronano

La glucosilación, incluyendo glucosilación ligada a N y O, de algunas enzimas degradantes de hialuronano, incluyendo hialuronidasas, puede ser importante para su actividad catalítica y estabilidad. Aunque la alteración del tipo de glucano que modifica una glucoproteína puede tener efectos drásticos en la antigenicidad, plegamiento estructural, solubilidad y estabilidad de una proteína, se cree que la mayoría de las enzimas no requieren glucosilación para una actividad enzimática óptima. Para algunas hialuronidasas, la retirada de la glucosilación ligada a N puede dar como resultado una inactivación casi completa de la actividad hialuronidasa. Por lo tanto, para dichas hialuronidasas, la presencia de glucanos ligados a N es crítica para generar una enzima activa.

Los oligosacáridos ligados a N quedan en varios tipos principales (oligomanosa, complejo, híbrido, sulfatado) todos los cuales tienen núcleos de (Man) 3-GlcNAc-GlcNAc unidos mediante el nitrógeno de amida de restos de Asn que quedan dentro de secuencias Asn-Xaa-Thr/Ser (donde Xaa no es Pro). Se ha indicado glucosilación en un sitio Asn-Xaa-Cys para proteína C de coagulación. En algunos casos, una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, puede contener enlaces tanto N glucosídicos como O glucosídicos. Por ejemplo, la PH20 tiene oligosacáridos ligados a O así como oligosacáridos ligados a N. Hay siete sitios de glucosilación ligados a N potenciales en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de PH20 humana ejemplificados en SEC ID N°: 1. Como se ha indicado anteriormente, la glucosilación ligada a N en N490 no se requiere para actividad hialuronidasa.

En algunos ejemplos, las enzimas degradantes de hialuronano para uso en las composiciones y/o métodos proporcionados se glucosilan en uno o todos los sitios de glucosilación. Por ejemplo, para PH20 humana, o una forma soluble de la misma, 2, 3, 4, 5 o 6 de los sitios de N glucosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEC ID N°: 1 están glucosilados. En algunos ejemplos las enzimas degradantes de hialuronano se glucosilan en uno o más sitios de glucosilación nativos. En otros ejemplos, las enzimas degradantes de hialuronano se modifican en uno o más sitios de glucosilación no nativos para conferir glucosilación del polipéptido en uno o más sitios adicionales. En dichos ejemplos, la adición de restos de azúcares adicionales puede potenciar las propiedades farmacocinéticas de la molécula, tales como actividad mejorada y/o semivida mejorada.

En otros ejemplos, las enzimas degradantes de hialuronano para uso en las composiciones y/o métodos proporcionados en el presente documento se desglucosilan parcialmente (o son polipéptidos N glucosilados



parcialmente). Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 soluble parcialmente desglucosilados que conservan toda o una parte de la actividad hialuronidasa de una hialuronidasa glucosilada completamente pueden usarse en las composiciones y/o métodos proporcionados en el presente documento. Las hialuronidasas parcialmente desglucosiladas ejemplares incluyen formas solubles de polipéptidos de PH20 parcialmente desglucosilados de cualquier especie, tales como cualquiera expuesto en cualquiera de SEC ID N°: 1, 2, 11, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 63, 65, 185 y 186, o variantes alélicas, variantes truncadas, u otras variantes de los mismos. Dichas variantes se conocen por los expertos en la materia, e incluyen polipéptidos que tienen 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más identidad de secuencia con cualquiera de SEC ID N°: 1, 2, 11, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 63, 65, 185 y 186, o formas truncadas de los mismos. Las hialuronidasas parcialmente desglucosiladas proporcionadas en el presente documento también incluyen hialuronidasas parcialmente desglucosiladas híbridas, de fusión y quiméricas, y conjugados de hialuronidasa parcialmente desglucosilados.

Las glucosidasas, o glucósido hidrolasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico para generar dos azúcares más pequeños. Los tipos principales de N-glicanos en vertebrados incluyen glicanos de alta manosa, glicanos híbridos y glicanos complejos. Hay varias glucosidasas que dan como resultado solamente desglucosilación proteica parcial, incluyendo: EndoF1, que escinde los glicanos de alta manosa y de tipo híbrido; EndoF2, que escinde glicanos de tipo complejo biantenarios; EndoF3, que escinde glicanos complejos bicatenarios y más ramificados; y EndoH, que escinde glicanos de alta manosa y de tipo híbrido. El tratamiento de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble, tal como una PH20 soluble, con una o todas estas glucosidasas puede dar como resultado desglucosilación solamente parcial y, por lo tanto, conservación de la actividad hialuronidasa.

Las enzimas degradantes de hialuronano parcialmente desglucosiladas, tales como hialuronidasas solubles parcialmente desglucosiladas, pueden producirse por digestión con una o más glucosidasas, generalmente una glucosidasa que no retira todos los N-glicanos sino que desglucosila solo parcialmente la proteína. Por ejemplo, el tratamiento de PH20 (por ejemplo, una PH20 recombinante designada rHuPH20) con una o todas las glucosidasas anteriores (por ejemplo EndoF1, EndoF2 y/o EndoF3) da como resultado desglucosilación parcial. Estos polipéptidos de PH20 parcialmente desglucosilados pueden mostrar actividad enzimática hialuronidasa que es comparable con los polipéptidos completamente glucosilados. Por el contrario, el tratamiento de PH20 con PNGasaF, una glucosidasa que escinde todos los N-glicanos, da como resultado la retirada completa de todos los N-glicanos y por lo tanto hace a la PH20 enzimáticamente inactiva. Por lo tanto, aunque todos los sitios de glucosilación ligados a N (tales como, por ejemplo, los de los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de PH20 humana, ejemplificados en SEC ID N°: 1) pueden glucosilarse, el tratamiento con una o más glucosidasas puede hacer al alcance de glucosilación reducida en comparación con una hialuronidasa que no se digiere con una o más glucosidasas.

Las enzimas degradantes de hialuronano parcialmente desglucosidasas, incluyendo los polipéptidos de PH20 soluble parcialmente desglucosilada, pueden tener 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % o 80 % del nivel de glucosilación de un polipéptido completamente glucosilado. Típicamente, las enzimas degradantes de hialuronano parcialmente desglucosiladas, incluyendo polipéptidos de PH20 solubles parcialmente desglucosilados, muestran la actividad hialuronidasa que es 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 1000 % o más de la actividad hialuronidasa mostrada por el polipéptido completamente glucosilado.

## 5. Modificaciones de enzimas degradantes de hialuronano para mejorar sus propiedades farmacocinéticas

Las enzimas degradantes de hialuronano pueden modificarse para mejorar sus propiedades farmacocinéticas, tal como aumentar su semivida *in vivo* y/o actividades. La modificación de las enzimas degradantes de hialuronano para su uso en las composiciones y/o métodos proporcionados puede incluir unión, directa o indirectamente mediante un enlazador, tal como covalentemente o por otro enlace estable, de un polímero, tal como dextrano, un polietilenglicol (pegilación (PEG)) o resto de sialilo, u otros polímeros tales, tales como polímeros naturales o de azúcares.

Se sabe que la pegilación de productos terapéuticos aumenta la resistencia a proteólisis, aumenta la semivida en plasma, y reduce la antigenicidad e inmunogenicidad. La unión covalente u otra estable (conjugación) de moléculas poliméricas, tales como restos de polietilenglicol (PEG), con la enzima degradante de hialuronano puede proporcionar por lo tanto propiedades beneficiosas a la composición de polímero de enzima resultante. Dichas propiedades incluyen biocompatibilidad mejorada, extensión de semivida de la proteína (y actividad enzimática) en sangre, células y/o en otros tejidos dentro de un sujeto, protección eficaz de la proteína de proteasas e hidrólisis, biodistribución mejorada, farmacocinética y/o farmacodinámica potenciada, y aumento de la solubilidad en agua.

Los polímeros ejemplares que pueden conjugarse con la enzima degradante de hialuronano, incluyen homopolímeros naturales y sintéticos, tales como polioles (es decir poli-OH), poliaminas (es decir poli-NH<sub>2</sub>) 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 de entre óxidos de polialquileno (PAO), tales

como polialquilenglicoles (PAG), incluyendo polipropilenglicoles (PEG), metoxipolietilenglicoles (mPEG) y polipropilenglicoles, PEG-glicidil éteres (Epoxy-PEG), polietilenglicoles (PEG) ramificados con PEG-oxycarbonilimidazol (CDI-PEG), alcohol polivinílico (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, poli-D,L-aminoácidos, polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico, dextranos incluyendo carboximetil dextranos, heparina, albúmina homóloga, celulosas, incluyendo metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa, hidrolizados de quitosano, almidones tales como hidroxietil almidones e hidroxipropil almidones, glucógeno, agarosas y derivados de los mismos, goma guar, pululano, inulina, goma de xantano, carragenina, pectina, hidrolizados de ácido alginico y biopolímeros.

10 Típicamente, los polímeros son polialquilen óxidos (PAE), tales como polietilen óxidos, tales como PEG, típicamente mPEG, que, en comparación con polisacáridos tales como dextrano, pululano y similares, tienen pocos grupos reactivos capaces de reticular. Típicamente, los polímeros son moléculas poliméricas no tóxicas tales como (m)polietilenglicol (mPEG) que puede conjugarse covalentemente con la enzima degradante de hialuronano (por ejemplo, con grupos de unión en la superficie proteica) usando una química relativamente simple.

15 Las moléculas poliméricas adecuadas para unión con la enzima degradante de hialuronano incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG) y derivados de PEG tales como metoxi-polietilenglicoles (mPEG), PEG-glicidil éteres (Epoxy-PEG), PEG-oxycarbonilimidazol (CDI-PEG), PEG ramificados y polietilen óxido (PEO) (véase por ejemplo Roberts *et al.*, *Advanced Drug Delivery Review* 2002, 54: 459-476; Harris y Zalipsky, S (eds.) "Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications" ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar *et al.*, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3(1): 125-136, 2000; Harris, *Nature Reviews* 2: 215 y siguientes (2003); y Tsubery, *J Biol. Chem* 279(37): 38118-24, 2004). La molécula polimérica puede ser de un peso molecular que varía típicamente de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 60 kDa. En algunas realizaciones la molécula polimérica que se conjuga con una proteína, tal como rHuPH20, tiene un peso molecular de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más de 60 kDa.

Se conocen en la técnica diversos métodos para modificar polipéptidos por unión covalente (conjugación) de un PEG o derivado de PEG (es decir "PEGilación") (véase por ejemplo documentos U.S. 2006/0104968; U.S. 5.672.662; U.S. 6.737.505; y U.S. 2004/0235734). Las técnicas para PEGilación incluyen, pero sin limitación, enlazadores especializados y químicas de acoplamiento (véase por ejemplo, Harris, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 459-476, 2002), unión de múltiples restos de PEG con un único sitio de conjugación (tal como mediante el uso de PEG ramificados; véase por ejemplo, Veronese *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 177-180, 2002), PEGilación específica de sitio y/o mono PEGilación (véase por ejemplo, Chapman *et al.*, *Nature Biotech.* 17: 780-783, 1999), y PEGilación enzimática dirigida a sitio (véase por ejemplo, Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54: 487-504, 2002) (véase, también, por ejemplo, Lu y Felix (1994) *Int. J. Peptide Protein Res.* 43: 127-138; Lu y Felix (1993) *Peptide Res.* 6: 142-6, 1993; Felix *et al.* (1995) *Int. J. Peptide Res.* 46: 253-64; Benhar *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 13398-404; Brumeanu *et al.* (1995) *J Immunol.* 154: 3088-95; véase también, Caliceti *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10): 261-77 y Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2): 3S-8S). Los métodos y técnicas descritos en la materia pueden producir proteínas que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 PEG o derivados de PEG unidos con una única molécula proteica (véase por ejemplo, documento U.S. 2006/0104968).

Se han descrito en la técnica numerosos reactivos para PEGilación. Dichos reactivos incluyen, pero sin limitación, PEG activado por N-hidroxisuccinimidilo (NHS), succinimidil mPEG, mPEG2-N-hidroxisuccinimida, mPEG succinimidil alfa-metilbutanoato, mPEG succinimidil propionato, mPEG succinimidil butanoato, mPEG ácido carboximetil 3-hidroxi-butanoico succinimidil éster, PEG-succinimidil propionato homobifuncional, PEG propionaldehído homobifuncional, PEG butiraldehído homobifuncional, PEG maleimida, PEG hidracida, *p*-nitrofenil-carbonato PEG, carbonato de mPEG-benzotriazol, propionaldehído PEG, mPEG butiraldehído, mPEG2 butiraldehído ramificado, mPEG acetilo, mPEG piperidona, mPEG metilcetona, mPEG maleimida "sin enlazador", mPEG vinil sulfona, mPEG tiol, mPEG ortopiridilíioéster, mPEG ortopiridil disulfuro, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsulfona PEG-NHS, acrilato PEG-NHS, fluoresceína PEG-NHS y biotina PEG-NHS (véase por ejemplo, Monfardini *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 6: 62-69, 1995; Veronese *et al.*, *J. Bioactive Compatible Polymers* 12: 197-207, 1997; documentos U.S. 5.672.662; U.S. 5.932.462; U.S. 6.495.659; U.S. 6.737.505; U.S. 4.002.531; U.S. 4.179.337; U.S. 5.122.614; U.S. 5.183.550; U.S. 5.324.844; U.S. 5.446.090; U.S. 5.612.460; U.S. 5.643.575; U.S. 5.766.581; U.S. 5.795.569; U.S. 5.808.096; U.S. 5.900.461; U.S. 5.919.455; U.S. 5.985.263; U.S. 5.990.237; U.S. 6.113.906; U.S. 6.214.966; U.S. 6.258.351; U.S. 6.340.742; U.S. 6.413.507; U.S. 6.420.339; U.S. 6.437.025; U.S. 6.448.369; U.S. 6.461.802; U.S. 6.828.401; U.S. 6.858.736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; U.S. 2005/000360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 00176640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; y WO 0187925).

En un ejemplo, la enzima degradante de hialuronano para uso en los métodos, composiciones y combinaciones proporcionados es una hialuronidasa soluble que está PEGilada. En un ejemplo particular, la hialuronidasa soluble es una hialuronidasa PH20 PEGilada. En otro ejemplo particular, la hialuronidasa soluble es rHuPH20 PEGilada, tal como la descrita en el Ejemplo 10.

### **E. Métodos para producir ácidos nucleicos que codifican una insulina o enzima degradante de hialuronano y polipéptidos de los mismos**

5 Pueden obtenerse polipéptidos de una insulina y enzima degradante de hialuronano expuesta en el presente documento, por métodos bien conocidos en la técnica para purificación proteica y expresión de proteínas recombinantes. Los polipéptidos también pueden sintetizarse de forma química. Por ejemplo, la cadena A y cadena B de la insulina pueden sintetizarse químicamente y después reticularse por enlaces disulfuro mediante, por ejemplo, una reacción de reducción-reoxidación. Cuando los polipéptidos se producen por medios recombinantes, puede usarse cualquier método conocido por los expertos en la materia para la identificación de ácidos nucleicos que codifican genes deseados. Puede usarse cualquier método disponible en la técnica para obtener un ADNc de longitud completa (es decir, que abarque la región codificante completa) o clon de ADN genómico que codifica una hialuronidasa, tal como de una fuente celular o tisular. Puede obtenerse por ingeniería genética insulinas modificadas o variantes o enzimas degradantes de hialuronano a partir de un polipéptido de tipo silvestre, tal como por mutagénesis dirigida.

15 Los polipéptidos pueden clonarse o aislarse usando cualquier método disponible conocido en la técnica para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Dichos métodos incluyen amplificación por PCR de ácidos nucleicos y exploración de bibliotecas, incluyendo exploración de hibridación de ácido nucleico, exploración basada en anticuerpos y exploración basada en actividad.

20 Pueden usarse métodos para amplificación de ácidos nucleicos para aislar moléculas de ácido nucleico que codifiquen un polipéptido deseado, incluyendo por ejemplo, métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Un material que contiene ácido nucleico puede usarse como un material de partida del que puede aislarse una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido deseado. Por ejemplo, pueden usarse preparaciones de ADN y ARNm, extractos celulares, extractos tisulares, muestras de fluido (por ejemplo sangre, suero, saliva), muestras de sujetos sanos y/o enfermos en métodos de amplificación. También pueden usarse bibliotecas de ácido nucleico como una fuente de material de partida. Pueden diseñarse cebadores para amplificar un polipéptido deseado. Por ejemplo, pueden diseñarse cebadores basándose en secuencias expresadas de las que se genera un polipéptido deseado. Pueden diseñarse cebadores basándose en la retrotraducción de una secuencia de aminoácidos polipeptídica. Pueden secuenciarse moléculas de ácido nucleico generadas por amplificación y confirmarse que codifican un polipéptido deseado.

30 Puede unirse secuencias de nucleótidos adicionales con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, incluyendo secuencias enlazadoras que contienen sitios de endonucleasa de restricción para el fin de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión proteica o un vector diseñado para la amplificación de las secuencias de ADN codificantes de proteínas del núcleo. Además, las secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcionales pueden unirse operativamente con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido. Los ejemplos de dichas secuencias incluyen, pero sin limitación, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión proteica intracelular y secuencias de secreción, por ejemplo secuencias señal heterólogas, diseñadas para facilitar la secreción proteica. Dichas secuencias se conocen por los expertos en la materia. Secuencias de restos de nucleótidos adicionales tales como secuencias de bases que especifican regiones de unión a proteína también pueden ligarse a moléculas de ácido nucleico que codifican enzimas. Dichas regiones incluyen, pero sin limitación, secuencias de restos que facilitan o codifican proteínas que facilitan la captación de una enzima en células diana específicas, o alteran de otro modo la farmacocinética de un producto de un gen sintético. Por ejemplo, las enzimas pueden ligarse a restos de PEG.

45 Además, pueden añadirse marcadores u otros restos, por ejemplo, para ayudar en la detección o purificación de afinidad del polipéptido. Por ejemplo, secuencias de restos de nucleótidos adicionales tales como secuencias de bases que especifican un marcador epitópico u otro marcador detectable también pueden ligarse a moléculas de ácido nucleico codificantes de enzimas. Los ejemplos de dichas secuencias incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican un marcador His (por ejemplo, His6x, HHHHHH; SEC ID N°: 54) o un marcador Flag (DYKDDDDK; SEC ID N°: 55).

50 Los ácidos nucleicos identificados y aislados pueden insertarse después en un vector de clonación apropiado. Puede 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 de 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 pCMV4, pBR322 o derivados de plásmido pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Otros vectores de expresión incluyen el vector de expresión HZ24 ejemplificado en el presente documento. La inserción en un vector de clonación puede conseguirse, por ejemplo, ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tiene extremos terminales complementarios cohesivos. La inserción puede efectuarse usando vectores de clonación TOPO (INVITROGEN, Carlsbad, CA). 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 de forma enzimática. Como alternativa, puede producirse cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (enlazadores) en los extremos de ADN; estos enlazadores ligados pueden contener oligonucleótidos sintetizados químicamente específicos que codifican secuencias de reconocimiento de

endonucleasas de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen de proteína pueden modificarse por colas homopoliméricas. Pueden introducirse moléculas recombinantes en células hospedadoras mediante, por ejemplo, transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que se generen muchas copias de la secuencia génica.

5 Puede producirse insulina usando una diversidad de técnicas (véase por ejemplo Ladisch *et al* (1992) *Biotechnol. Prog.* 8: 469-478). En algunos ejemplos, el ácido nucleico que codifica un polipéptido de preproinsulina o proinsulina se inserta en un vector de expresión. Tras la expresión, el polipéptido de preproinsulina o proinsulina se convierte en insulina por métodos enzimáticos o químicos que escinden la secuencia señal y/o el péptido C, dando como resultado las cadenas A y B que se entrecruzan por enlaces disulfuro mediante, por ejemplo, una reacción de reducción-reoxidación (véase por ejemplo Cousens *et al.*, (1987) *Gene* 61: 265-275, Chance *et al.*, (1993) *Diabetes Care* 4: 147-154). En otro ejemplo, el ácido nucleico que codifica la cadena A y cadena B de una insulina se inserta en uno o dos vectores de expresión para coexpresión como un único polipéptido de un vector de expresión o expresión como dos polipéptidos de uno o dos vectores de expresión. Por lo tanto, los polipéptidos de cadena A y B pueden expresarse por separado y después combinarse para generar una insulina, o pueden coexpresarse, en ausencia de una cadena C. En casos en los que las cadenas A y B se coexpresen como un único polipéptido, el ácido nucleico que codifica las subunidades también puede codificar un enlazador o espaciador entre la cadena B y cadena A, tal como un enlazador o espaciador descrito posteriormente. El ácido nucleico insertado en el vector de expresión puede contener, por ejemplo, ácido nucleico que codifica la cadena B de insulina, un enlazador, tal como por ejemplo, un enlazador de alanina-alanina-lisina, y la cadena A, dando como resultado la expresión de, por ejemplo, "cadena de insulina B-Ala-Ala-Lys-cadena A de insulina".

En realizaciones específicas, la transformación de células hospedadoras con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen proteico aislado, ADNc, o secuencia de ADN sintetizada permite la generación de múltiples copias del gen. Por lo tanto, el gen puede obtenerse en grandes cantidades cultivando transformantes, aislando las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperando el gen insertado del ADN recombinante aislado.

#### 1. Vectores y células

30 Para expresión recombinante de una o más de las proteínas deseadas, tales como cualquiera descrita en el presente documento, el ácido nucleico que contiene toda o una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de proteína insertada. Las señales de transcripción y traducción necesarias también pueden proporcionarse por el promotor nativo para genes enzimáticos y/o sus regiones flanqueantes.

También se proporcionan vectores que contienen un ácido nucleico que codifica la enzima. También se proporcionan células que contienen los vectores. Las células incluyen células eucariotas y procariotas, y los vectores son cualquiera adecuado para su uso en las mismas.

Se proporcionan células procariotas y eucariotas, incluyendo células endoteliales, que contienen los vectores. Dichas células incluyen células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, arqueas, células vegetales, células de insecto y células animales. Las células se usan para producir una proteína de las mismas cultivando las células anteriormente descritas en condiciones por las que la proteína codificada se expresa por la célula, y recuperando la proteína expresada. Para fines del presente documento, por ejemplo, la enzima puede secretarse al medio.

Se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de hialuronidasa soluble acoplado con la secuencia señal nativa o heteróloga, así como múltiples copias de los mismos. Los vectores pueden seleccionarse para expresión de la proteína enzimática en la célula o de modo que la proteína enzimática se exprese como una proteína secretada.

Puede usarse una diversidad de sistemas de hospedador-vector para expresar la secuencia codificante de proteína. Estos incluyen, pero sin limitación, sistemas de células de mamífero infectadas con virus (por ejemplo virus vaccinia, adenovirus y otros virus); sistemas de células de insecto infectadas con virus (por ejemplo baculovirus); microorganismos tales como levadura que contiene vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico, o ADN cosmídico. Los elementos de expresión de vectores varían en sus fuerzas y especificidades. Dependiendo del sistema de hospedador-vector usado, puede usarse cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados.

Puede usarse cualquier método conocido por los expertos en la materia para la inserción de fragmentos de ADN en vectores de expresión de construcción que contienen un gen quimérico que contiene señales de control de la transcripción/traducción apropiados y secuencias codificantes de proteínas. 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 proteína, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de la misma,

puede regularse por 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 las moléculas de ADN recombinantes. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede controlarse por cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. En una realización específica, el promotor no es nativo de los genes para una proteína deseada. 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  $\beta$ -lactamasa (Jay *et al.*, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5543) 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 de plantas que contienen el promotor de nopalina sintetasa (Herrera-Estrella *et al.*, *Nature* 303:209-213 (1984)) o el promotor de 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 bifsosfato carboxilasa (Herrera-Estrella *et al.*, *Nature* 310:115-120 (1984)); elementos promotores de levadura y otros hongos tales como el promotor de Gal4, el promotor de alcohol deshidrogenasa, el promotor de fosfoglicerol quinasa, el promotor de alcalina fosfatasa y las siguientes regiones de control de la transcripción de animales que muestran especificidad tisular y se han usado en animales transgénicos: región de control del gen de elastasa I que está activa en células acinares pancreáticas (Swift *et al.*, *Cell* 38:639-646 (1984); Ornitz *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 50:399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology* 7:425-515 (1987)); región de control del gen de insulina que está activa en células beta pancreáticas (Hanahan *et al.*, *Nature* 315:115-122 (1985)), región de control del gen de la inmunoglobulina que está activa 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 del ratón que está activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, *Cell.* 45:485-495 (1986)), región de control del gen de la albúmina que está activa en el hígado (Pinckert *et al.*, *Genes and Devel* 1:268-276 (1987)), región de control del gen de la alfa-fetoproteína que está activa en el 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 alfa-1 antitripsina que está activa en el hígado (Kelsey *et al.*, *Genes and Devel* 1:161-171 (1987)), región de control del gen de la beta globina que está activa en células mieloides (Magram *et al.*, *Nature*. 315:338-340 (1985); Kollias *et al.*, *Cell* 46:89-94 (1986)), región de control del gen de proteína de mielina básica que está activa en células oligodendrocíticas del cerebro (Readhead *et al.*, *Cell* 48:703-712 (1987)), región de control del gen de la cadena ligera de miosina-2 que está activa en el músculo esquelético (Shani, *Nature* 314:283-286 (1985)), y región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica que está activa en gonadotropos del hipotálamo (Mason *et al.*, *Science* 234:1372-1378 (1986)).

En una realización específica, se usa un vector que contiene un promotor unido operativamente con ácidos nucleicos que codifican una proteína deseada, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo de la misma, uno o más orígenes de replicación y opcionalmente uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos). Los vectores plasmídicos ejemplares para transformación de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA; véase también la bibliografía publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor de fago T5 (reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*) y un módulo de represión de operador lac doble para proporcionar expresión de alto nivel, estrechamente regulada, de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión ribosómico sintético (RBS II) para traducción eficaz, una secuencia codificante de marcador His6X, terminadores de la transcripción  $t_0$  y T1, origen de replicación ColE1, y un gen de beta-lactamasa para conferir resistencia a ampicilina. Los vectores pQE permiten la colocación de un marcador His6X en el extremo N- o C-terminal de la proteína recombinante. Dichos plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30, y pQE 31 que proporcionan sitios de clonación múltiples para las tres fases de lectura y posibilitan la expresión de proteínas marcadas con His6X en el extremo N-terminal. Otros vectores plasmídicos ejemplares para transformación de células *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, la Patente de Estados Unidos 4.952.496; disponible de NOVAGEN, Madison, WI; véase, también la bibliografía publicada por Novagen que describe el sistema). Dichos plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T7lac, terminador T7, el operador lac de *E. coli* inducible y el gen represor de lac; pET 12a-c, que contiene el promotor T7, terminador T7 y la señal de secreción de ompT de *E. coli*; y pET 15B y pET19b (NOVAGEN, Madison, WI), que contiene una secuencia líder de His-Tag™ para su uso en purificación con una columna de His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión después de purificación sobre la columna, la región promotora de T7-lac y el terminador de T7.

Es un vector ejemplar para expresión de células de mamífero el vector de expresión HZ24. El vector de expresión HZ24 derivó de la cadena principal del vector pCI (Promega). Contiene ADN que codifica el gen de resistencia a Beta-lactamasa (AmpR), un origen de F1 de replicación, una región promotora/potenciadora temprana inmediata de citomegalovirus (CMV), y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El vector de expresión también tiene un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) del virus ECMV (Clontech) y el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón.

## 2. Restos Enlazadores

En algunos ejemplos, se prepara la insulina generando los polipéptidos de cadena A y cadena B con un enlazador, de modo que, por ejemplo, el extremo C-terminal de la cadena B se une con el extremo N-terminal de la cadena A por un enlazador corto. La cadena A y cadena B pueden expresarse a partir de un único polipéptido que contiene un enlazador, o pueden expresarse por separado y después unirse por un enlazador. El resto enlazador se selecciona dependiendo de las propiedades deseadas. El resto enlazador debería ser suficientemente largo y suficientemente flexible para permitir que la cadena A y la cadena B imiten la conformación natural de la insulina. Los enlazadores pueden ser cualquier resto adecuado para la cadena A y cadena B de la insulina. Dichos restos incluyen, pero sin limitación, enlaces peptídicos; enlaces de aminoácidos y peptídicos, que contiene típicamente entre uno y aproximadamente 60 aminoácidos; enlazadores químicos, tales como agentes de reticulación escindibles heterobifuncionales, enlazadores fotoescindibles y enlazadores escindibles por ácido.

Los restos enlazadores pueden ser péptidos. El péptido típicamente tiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 60 restos de aminoácidos, por ejemplo de aproximadamente 5 a aproximadamente 40, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 restos de aminoácidos. Los enlazadores peptídicos pueden codificarse convenientemente por ácido nucleico e incorporarse en proteínas de fusión tras su expresión en una célula hospedadora, tal como *E. coli*. En un ejemplo, un enlazador de alanina-alanina-lisina (AAK) (SEC ID N°: 178) se codifica en un ácido nucleico entre ácido nucleico que codifica la cadena B de la insulina y ácido nucleico que codifica la cadena A, de modo que tras la expresión, se produce un polipéptido de "cadena B de insulina-AAK-cadena A de insulina". Los enlazadores peptídicos pueden ser una secuencia de aminoácidos espaciadora flexible, tal como las conocidas en investigación de anticuerpos monocatenarios. Los ejemplos de dichos restos enlazadores conocidos incluyen, pero sin limitación, RPPPPC (SEC ID N°: 166) o SSPPPPC (SEC ID N°: 167), GGGGS (SEC ID N°: 168), (GGGGS)<sub>n</sub> (SEC ID N°: 169), GKSSGSGSESKS (SEC ID NO: 170), GSTSGSGKSSEGKG (SEC ID N°: 171), GSTSGSGKSSEGSGSTKG (SEC ID N°: 172), GSTSGSGKSSEGKG (SEC ID N°: 173), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEC ID N°: 174), EGKSSGSGSESKEF (SEC ID N°: 175), SRSSG (SEC ID N°: 176) y SGSSC (SEC ID N°: 177).

Como alternativa, el resto enlazador peptídico puede ser VM (SEC ID N°: 179) o AM (SEC ID N°: 180), o tener la estructura descrita por la fórmula: AM(G<sub>2 a 4</sub>S)<sub>X</sub>AM en la que X es un número entero de 1 a 11 (SEC ID N°: 181). Se describen restos enlazadores adicionales, por ejemplo, en Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883; Whitlow, M., *et al.* (1993) Protein Engineering 6:989-995; Newton *et al.* (1996) Biochemistry 35:545-553; A. J. Cumber *et al.* (1992) Bioconj. Chem. 3:397-401; Ladurner *et al.* (1997) J. Mol. Biol. 273:330-337; y Patente de Estados Unidos N° 4.894.443.

En algunos ejemplos, se codifican enlazadores peptídicos por ácido nucleico y se incorporan entre la cadena B y la cadena A tras la expresión en una célula hospedadora, tal como *E. coli* o *S. cerevisiae*. En otros ejemplos, se sintetiza un enlazador peptídico por métodos químicos. Esto puede realizarse en un protocolo separado de la síntesis de uno o más de la cadena A y B, después de lo cual los componentes se unen, tal como con el uso de enlazadores heterobifuncionales. Como alternativa, puede sintetizarse un enlazador peptídico en el extremo N o C-terminal de una de las cadenas de insulina, que después se liga a la otra cadena mediante el enlazador peptídico, tal como con un enlazador heterobifuncional.

Puede usarse cualquier enlazador conocido por los expertos en la materia en el presente documento para unir la cadena A y la cadena B de insulina. Los enlazadores y enlaces que son adecuados para unir químicamente las cadenas incluyen, pero sin limitación, enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces disulfuro con impedimentos estéricos, y enlaces covalentes entre grupos reactivos libres, tales como grupos amina y tiol. Estos enlaces se producen usando reactivos heterobifuncionales para producir grupos de tiol reactivos en uno o ambos de los polipéptidos y haciendo reaccionar después los grupos tiol en un polipéptido con grupos tiol reactivos o grupos amina con los que pueden unirse grupos maleimido reactivos o grupos tiol en el otro. Otros enlazadores incluyen enlazadores escindibles por ácido, tales como bismaleimidoetoxi propano, conjugados de transferrina lábiles por ácido y dihidrazida de ácido adípico, que se escindirían en compartimientos intracelulares más ácidos; agentes de reticulación que se escinden tras su exposición a UV o luz visible y enlazadores, tales como los diversos dominios, tales como CH1, CH2, y CH3, de la región constante de IgG1 humana (véase, Batra *et al.* (1993) Molecular Immunol. 30:379-386). En algunas realizaciones, pueden incluirse varios enlazadores para aprovechar las propiedades deseadas de cada enlazador. Pueden insertarse enlazadores químicos y enlazadores peptídicos acoplando covalentemente el enlazador a la cadena A y cadena B de insulina. Los agentes heterobifuncionales, descritos posteriormente, pueden usarse para efectuar dicho acoplamiento covalente. Los enlazadores peptídicos también pueden unirse expresando ADN que codifique el enlazador entre la cadena B y la cadena A.

Otros enlazadores que pueden usarse para unir la cadena A y cadena B de insulina incluyen: sustratos enzimáticos, tales como sustrato de catepsina B, sustrato de catepsina D, sustrato de tripsina, sustrato de trombina, sustrato de subtilisina, sustrato de Factor Xa y sustrato de enteroquinasa; los enlazadores que aumentan la solubilidad, flexibilidad y/o capacidad de escisión intracelular incluyen enlazadores tales como (gly<sub>m</sub>ser)<sub>n</sub> y (ser<sub>m</sub>gly)<sub>n</sub>, en los que m es 1 a 6, preferentemente 1 a 4, más preferentemente 2 a 4, y n es 1 a 30, preferentemente 1 a 10, más preferentemente 1 a 4 (véase, por ejemplo, la Solicitud de PCT Internacional N° WO 96/06641, que proporciona

enlazadores ejemplares). En algunas realizaciones, pueden incluirse varios enlazadores para aprovechar las propiedades deseadas de cada enlazador.

### 3. Expresión

5 Pueden producirse polipéptidos de enzimas degradantes de hialuronano e insulina por cualquier método conocido por los expertos en la materia incluyendo métodos *in vivo* e *in vitro*. Las proteínas deseadas pueden expresarse en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades requeridas y formas de las proteínas, tales como por ejemplo, necesarias para administración y tratamiento. Los hospedadores de expresión incluyen organismos procariotas y eucariotas tales como *E. coli*, levadura, plantas, células de insecto, células de mamífero, incluyendo las líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los hospedadores de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas así como los tipos de modificaciones post-traduccionales que están presentes en las proteínas expresadas. La elección del hospedador de expresión puede realizarse basándose en estos y otros factores, tales como consideraciones reguladoras y de seguridad, costes de producción y la necesidad y los métodos de purificación.

20 Están disponibles muchos vectores de expresión y se conocen por los expertos en la materia y pueden usarse para expresión de proteínas. La elección del vector de expresión se verá influida por la elección del sistema de expresión del hospedador. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores transcripcionales y opcionalmente potenciadores, señales de traducción y señales de terminación de la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión que se usan para transformación estable típicamente tienen un marcador seleccionable que permite la selección y el mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, puede usarse un origen de replicación para amplificar el número de copias del vector.

25 Los polipéptidos de hialuronidasa solubles también pueden utilizarse o expresarse como fusiones de proteínas. Por ejemplo, puede generarse una fusión enzimática para añadir funcionalidad adicional a una enzima. Los ejemplos de proteínas de fusión enzimática incluyen, pero sin limitación, fusiones de una secuencia señal, un marcador tal como para localización, por ejemplo un marcador His<sub>6</sub> o un marcador myc o un marcador para purificación, por ejemplo, una fusión de GST y una secuencia para dirigir la secreción de proteínas y/o asociación a membrana.

#### 30 a. Células Procariotas

Los procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema para producir grandes cantidades de proteínas. La transformación de *E. coli* es una técnica sencilla y rápida bien conocida por los expertos en la materia. Los vectores de expresión para *E. coli* pueden contener promotores inducibles, dichos promotores son útiles para inducir altos niveles de expresión de proteínas y para expresar proteínas que muestran alguna toxicidad para las células hospedadoras. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen el promotor lac, el promotor trp, el promotor tac híbrido, los promotores de ARN T7 y SP6 y el promotor λPL regulado por temperatura.

40 Las proteínas, tales como cualquiera proporcionada en el presente documento, pueden expresarse en el ambiente citoplasmático de *E. coli*. El citoplasma es un ambiente reductor y, para algunas moléculas, esto puede dar como resultado la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Pueden usarse agentes reductores tales como ditioneitol y β-mercaptoetanol y desnaturalizantes, tales como guanidina-HCl y urea para resolubilizar las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de bacterias que proporciona un ambiente oxidante y disulfuro isomerasas y de tipo chaperonina y puede conducir a la producción de proteína soluble. Típicamente, una secuencia líder se fusiona con la proteína para expresar que dirige la proteína al periplasma. El líder se retira después por peptidasas señal dentro del periplasma. Los ejemplos de secuencias líderes que se dirigen a la periplasma incluyen el líder de pelB del gen de pectato liasa y el líder derivado del gen de la fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la fuga de la proteína expresada al medio de cultivo. La secreción de proteínas permite purificación rápida y sencilla del sobrenadante de cultivo. Pueden obtenerse proteínas que no se secretan del periplasma por lisis osmótica. De forma similar a la expresión citoplasmática, en algunos casos las proteínas pueden volverse insolubles y pueden usarse desnaturalizantes y agentes reductores para facilitar la solubilización y el repliegamiento. La temperatura de inducción y crecimiento también puede influir en los niveles de expresión y solubilidad, típicamente se usan temperaturas de entre 25 °C y 37 °C. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglucosiladas. Por lo tanto, si las proteínas requieren glucosilación para actuar, puede añadirse glucosilación *in vitro* después de la purificación de las células hospedadoras.

#### b. Células de Levadura

60 Levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son hospedadores de expresión de levadura bien conocidos que pueden usarse para producción de proteínas, tal como cualquiera descrita en el presente documento. La levadura puede transformarse con vectores de replicación episómicos o por integración cromosómica estable por recombinación homóloga. Típicamente, se usan promotores inducibles para regular la expresión génica. Los ejemplos de dichos promotores incluyen GAL1, GAL7 y GAL5 y promotores de metalotioneína, tales como CUP1, AOX1 u otro promotor de *Pichia* u otra levadura. Los vectores de expresión incluyen con frecuencia un marcador seleccionable tal como LEU2, TRP1,

HIS3 y URA3 para selección y mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en levadura son con frecuencia solubles. La co-expresión con chaperoninas tales como Bip y proteína disulfuro isomerasa puede mejorar los niveles de expresión y solubilidad. Adicionalmente, las proteínas expresadas en levadura pueden dirigirse para secreción usando fusiones de péptido señal de secreción tales como la señal de secreción del factor alfa de tipo

5 apareamiento de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de superficie de células de levadura tales como el receptor de adhesión de apareamiento Aga2p o la glucoamilasa de *Arxula adenivorans*. Un sitio de escisión de proteasa tal como para la proteasa KEX-2, puede introducirse por ingeniería genética para retirar las secuencias fusionadas de los polipéptidos de expresión a medida que salen de la vía de secreción. La levadura también tiene capacidad de glucosilación en motivos Asn-X-Ser/Thr.

### 10 c. Células de Insecto

Las células de insecto, particularmente las que usan expresión de baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos tales como polipéptidos de hialuronidasa. Las células de insecto expresan altos niveles de proteína y tienen capacidad para la mayoría de las modificaciones post-traduccionales usadas por eucariotas superiores. Los baculovirus tienen un intervalo de hospedadores restrictivo que mejora la seguridad y reduce las preocupaciones reguladoras de la expresión eucariota. Los vectores de expresión típicos usan un promotor para expresión de alto nivel tal como el promotor de polihedrina de baculovirus. Los sistemas de baculovirus usados habitualmente incluyen los baculovirus tales como virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) y el virus de la polihedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV) y una línea celular de insecto tal como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula para expresar se fusiona inmediatamente cadena abajo del codón de inicio de polihedrina del virus. Las señales de secreción de mamíferos se procesan con precisión en células de insecto y pueden usarse para secretar la proteína expresada al medio de cultivo. Además, las líneas celulares *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con patrones de glucosilación similares a los sistemas de células de mamífero.

Un sistema de expresión alternativo en células de insecto es el uso de células transformadas de forma estable. Pueden usarse para expresión líneas celulares tales como las células Schneider 2 (S2) y Kc (*Drosophila melanogaster*) y células C7 (*Aedes albopictus*). El promotor de metalotioneína de *Drosophila* puede usarse para inducir altos niveles de expresión en presencia de inducción de metales pesados con cadmio o cobre. Los vectores de expresión se mantienen típicamente mediante el uso de marcadores seleccionables tales como neomicina e higromicina.

### 35 d. Células de Mamífero

Pueden usarse sistemas de expresión de mamíferos para expresar proteínas incluyendo polipéptidos de hialuronidasa solubles. Las construcciones de expresión pueden transferirse a células de mamífero por infección viral tal como adenovirus o por transferencia de ADN directa tal como liposomas, fosfato cálcico, DEAE-dextrano y por medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamífero incluyen típicamente un sitio final ARNm, una caja TATA, una secuencia de inicio de la traducción (secuencia de consenso de Kozak) y elementos de poliadenilación. También pueden añadirse elementos IRES para permitir la expresión bicistónica con otro gen, tal como un marcador seleccionable. Dichos vectores incluyen con frecuencia promotores-potenciadores de la transcripción para expresión a alto nivel, por ejemplo, el promotor-potenciador de SV40, el promotor de citomegalovirus humano (CMV) y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (VSR). Estos promotores-potenciadores son activos en muchos tipos celulares. Los promotores de tipo tisular y celular y las regiones potenciadoras también pueden usarse para expresión. Las regiones promotoras/potenciadoras ejemplares incluyen, pero sin limitación, las de genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus de tumor mamario de ratón, albúmina, alfa fetoproteína, alfa 1 antitripsina, beta globina, proteína básica de mielina, cadena ligera de miosina 2 y control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica. Pueden usarse marcadores seleccionables para seleccionar y mantener células con la construcción de expresión. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero sin limitación, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, aminoglucósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa. Por ejemplo, puede realizarse expresión en presencia de metotrexato para seleccionar solamente las células que expresan el gen de DHFR. La fusión con moléculas de señalización de superficie celular tales como TCR- $\zeta$  y Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$  puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo en la superficie celular.

Están disponibles muchas líneas celulares para expresión de mamíferos incluyendo células de ratón, de rata, humanas, de mono, de pollo y de hámster. Las líneas celulares ejemplares incluyen pero sin limitación líneas celulares de CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (no secretora) y otras de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8 y células HKB. También están disponibles líneas celulares adaptadas a medios sin suero que facilitan la purificación de proteínas secretadas del medio de cultivo celular. Los ejemplos incluyen células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, cat N° 11619-012) y la línea celular sin suero EBNA-1 (Pham *et al.*, (2003) *Biotechnol Bioeng* 84:332-42.). También están disponibles líneas celulares que se adaptan para crecer en medios especiales optimizados para expresión máxima. Por ejemplo, se adaptan células CHO DG44 para crecer en cultivo en suspensión en un medio sin productos



animales, definido químicamente.

#### e. Plantas

5 Pueden usarse plantas y células vegetales transgénicas para expresar proteínas tales como cualquiera descrita en el presente documento. Se transfieren típicamente construcciones de expresión a plantas usando transferencia de ADN directa tal como bombardeo de microproyectiles y transferencia mediada por PEG en protoplastos, y con transformación mediada por agrobacterium. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias promotoras y potenciadoras, elementos de terminación de la transcripción y elementos de control de la traducción. Los vectores de expresión y técnicas de transformación se dividen habitualmente entre hospedadores dicotiledóneos, tales como *Arabidopsis* y tabaco, y hospedadores monocotiledóneos, tales como el maíz y arroz. Los ejemplos de promotores vegetales usados para expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de ribosa bisfosfato carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBQ3. Se usan con frecuencia marcadores seleccionables tales como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa para facilitar la selección y el mantenimiento de células transformadas. Las células vegetales transformadas pueden mantenerse en cultivo como células, agregados (tejido calloso) o regenerarse en plantas completas. Las células vegetales transgénicas también pueden incluir algas modificadas por ingeniería genética para producir polipéptidos de hialuronidasa. Debido a que las plantas tienen patrones de glucosilación diferentes que las células de mamífero, esto puede influir en la elección de la proteína producida en estos hospedadores.

#### 4. Técnicas de Purificación

El método para la purificación de polipéptidos, incluyendo insulina y polipéptidos de enzimas degradantes de hialuronano u otras proteínas, de partir de células hospedadoras dependerá de las células hospedadoras seleccionadas y los sistemas de expresión. Para las moléculas secretadas, las proteínas se purifican en general de los medios de cultivo después de retirar las células. Para expresión intracelular, las células pueden lisarse y las proteínas purificarse del extracto. Cuando se usan organismos transgénicos tales como plantas y animales transgénicos para expresión, pueden usarse tejidos u órganos como material de partida para realizar un extracto de células lisadas. Adicionalmente, la producción de animales transgénicos puede incluir la producción de polipéptidos en leche o huevos, que pueden recogerse, y, si es necesario, las proteínas pueden extraerse y purificarse adicionalmente usando métodos convencionales en la técnica.

Las proteínas, tales como polipéptidos de insulina o polipéptidos de enzimas degradantes de hialuronano, pueden purificarse usando técnicas de purificación de proteínas convencionales conocidas en este campo incluyendo pero sin limitación, SDS-PAGE, fraccionamiento de tamaño y cromatografía de exclusión por tamaño, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, tal como intercambio aniónico. También pueden utilizarse técnicas de purificación por afinidad para mejorar la eficacia y pureza de las preparaciones. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos, receptores y otras moléculas que se unen con enzimas de hialuronidasa en purificación de afinidad. Las construcciones de expresión también pueden modificarse por ingeniería genética para añadir un marcador de afinidad a una proteína tal como un epitopo myc, fusión de GST o His<sub>6</sub> y purificarse por afinidad con el anticuerpo de myc, resina de glutatión y resina Ni, respectivamente. La pureza puede evaluarse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo electroforesis en gel, métodos de HPLC ortogonales, tinción y técnicas espectrofotométricas.

#### 45 F. Preparación, Formulación y Administración de insulina y Polipéptidos de Enzimas Degradantes de Hialuronano

Se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas de insulina de acción rápida y enzimas degradantes de hialuronano para administración. Las enzimas degradantes de hialuronano se co-formulan o co-administran con formulaciones farmacéuticas de insulina de acción rápida para potenciar el suministro de insulina de acción rápida a la sangre aumentando la tasa de absorción y aumentando la biodisponibilidad de la insulina. Puede conseguirse mayor tasa de absorción y biodisponibilidad, por ejemplo, por despolimerización reversible de hialuronano por la enzima degradante de hialuronano, que aumenta temporalmente (típicamente durante un periodo de menos de 24 horas) la conductividad hidráulica del espacio subcutáneo. Por lo tanto, pueden usarse enzimas degradantes de hialuronano para conseguir concentraciones elevadas y/o más rápidamente obtenidas de la insulina después de la administración parenteral, tal como, por ejemplo, subcutánea, en comparación con métodos convencionales de administración subcutánea para proporcionar, por ejemplo, una respuesta más potente y/o más rápida para una dosis dada. La coadministración de una enzima degradante de hialuronano con una insulina de acción rápida, por lo tanto, puede hacer a la insulina de acción rápida una insulina de acción súper rápida. Las enzimas degradantes de hialuronano pueden usarse para conseguir control glucémico con una menor dosis de insulina administrada. La capacidad de las enzimas degradantes de hialuronano para potenciar el flujo del fluido a granel en y cerca de un sitio de inyección o infusión también puede mejorar otros aspectos del suministro farmacológico asociado. Por ejemplo, el aumento del flujo de fluido a granel puede ayudar a permitir que el volumen de fluido inyectado se disperse más fácilmente del sitio de inyección (reduciendo consecuencias potencialmente dolorosas y otras adversas de la inyección). Esto es particularmente importante para infusiones subcutáneas para permitir que se administren mayores dosis.

Por lo tanto, en virtud de la velocidad de absorción aumentada, las insulinas de acción rápida administradas por vía parenteral, pueden hacerse insulinas de acción súper rápida cuando se administran con una enzima degradante de hialuronano. Las ventajas sobre la administración de insulina sin un enzima degradante de hialuronano es que la enzima degradante de hialuronano/insulina co-administradas o co-formuladas pueden dar como resultado regímenes de dosificación más favorables, por ejemplo, dosis de insulina menores y/o el uso de sistemas de bucle cerrado más eficaces, y efectos terapéuticos mejorados, por ejemplo, control glucémico más eficaz y/o insulina en exceso reducida. Por ejemplo, reduciendo la dosis, pueden reducirse los efectos secundarios asociados con el exceso de insulina en circulación, tal como se observa con mayores dosis de insulina. Dichos efectos secundarios incluyen, pero sin limitación, hipoglucemia y obesidad.

Las composiciones pueden formularse en forma liofilizada o líquida. Cuando las composiciones se proporcionan en forma liofilizada pueden reconstituirse justo antes de su uso por una solución apropiada, por ejemplo, una solución salina estéril o agua estéril para inyección. Las composiciones pueden proporcionarse juntas o por separado. Por ejemplo, la insulina de acción rápida y la enzima degradante de hialuronano pueden co-formularse en una composición única o pueden proporcionarse como composiciones separadas. Cuando se proporciona como composiciones separadas, la enzima degradante de hialuronano y la insulina pueden envasarse para administración juntas, secuencialmente o de forma intermitente. Las combinaciones pueden envasarse como un kit.

### 1. Formulaciones

Los compuestos pueden formularse en cualquier preparación farmacéutica adecuada para administración parenteral, tal como soluciones, suspensiones, formulaciones de liberación sostenida o polvos. Típicamente, los compuestos se formulan en composiciones farmacéuticas usando técnicas y procedimientos bien conocidos en este campo (véase, por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Cuarta Edición, 1985, 126). Se preparan composiciones farmacéuticamente aceptables a la vista de las aprobaciones de una agencia reguladora u otra agencia preparada de acuerdo con la farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y en seres humanos. La formulación debería ajustarse al modo de administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos tales como un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra una enzima degradante de hialuronano e insulina. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington Pharmaceutical Sciences" por EW Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, generalmente en forma purificada o forma parcialmente purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para administración apropiada al paciente. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. El agua es un vehículo típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener, junto con un ingrediente activo: un agente de masificación tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato cálcico y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales, tales como goma arábica, gelatina, glucosa, melaza, polivinilpirrolidona, celulosas y derivados de los mismos, povidona, crosopovidonas y otros aglutinantes tales conocidos por los expertos en la materia. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, glicerina, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, y etanol. Una composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes de pH, por ejemplo, acetato, citrato sódico, glicerina, derivados de ciclodextrina, sorbitán monolaurato, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina y otros agentes tales.

Se formulan típicamente compuestos terapéuticamente activos farmacéuticos y derivados de los mismos y se administran en formas de dosificación unitaria o formas de dosificación múltiple. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada del compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el transportador, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Los ejemplos de formas de dosis unitaria incluyen ampollas y jeringas y comprimidos o cápsulas envasados individualmente. Pueden administrarse formas de dosis unitaria en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitaria idénticas envasadas en un único recipiente para administrar en forma de dosis unitaria segregada. Los ejemplos de formas de dosis múltiple incluyen frascos, cartuchos, frascos de comprimidos o cápsulas o frascos de pintas o galones. Por lo tanto, la forma de dosis múltiple es una multiplicidad de dosis unitarias que no se segregan en el envasado. En general, pueden prepararse formas de dosificación o composiciones que contienen principio activo en el intervalo del 0,005 % al 100 % con el equilibrio compuesto de un vehículo no tóxico.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento se formulan típicamente para administración por vía subcutánea, aunque se contemplan otras vías de administración, tales como cualquier vía conocida por los expertos en la materia incluyendo inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intralesional, intraperitoneal, administración epidural, vaginal, rectal, local, ótica, transdérmica o cualquier vía. Las formulaciones

adecuadas para dichas vías se conocen por los expertos en la materia. La administración puede ser local, tópica o sistémica, dependiendo del lugar de tratamiento. La administración local a un área que necesite tratamiento puede conseguirse, por ejemplo, pero sin limitación, por infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito de herida después de cirugía, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante. Las composiciones también pueden administrarse con otros agentes biológicamente activos, bien secuencialmente, intermitentemente o en la misma composición.

La vía más adecuada en cualquier caso dado depende de una diversidad de factores, tales como la naturaleza de la enfermedad, la tolerancia del sujeto a una vía de administración particular, la gravedad de la enfermedad, y la composición particular que se use. Típicamente, las composiciones proporcionadas en el presente documento se administran por vía parenteral. En algunos ejemplos, las enzimas degradantes de hialuronano se administran de modo que alcancen el intersticio de la piel o tejidos, degradando de este modo el espacio intersticial para suministro posterior de insulina. Por lo tanto, en algunos ejemplos, se contempla la administración directa bajo la piel, tal como por métodos de administración subcutánea. Por lo tanto, en un ejemplo, puede conseguirse administración local por inyección, tal como de una jeringa o bolígrafo de insulina u otro artículo de fabricación que contenga un dispositivo de inyección tal como una aguja. En otro ejemplo, puede conseguirse administración local por la infusión, que puede facilitarse mediante el uso de una bomba u otro dispositivo similar. También se contemplan otros modos de administración. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

La administración subcutánea, caracterizada en general por inyección o infusión, se contempla en el presente documento. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, bien como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Las composiciones farmacéuticas pueden contener otras cantidades menores de sustancias adyuvantes no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes de pH, estabilizadores, potenciadores de la solubilidad, y otros agentes tales, tales como por ejemplo, acetato sódico, fosfato sódico, sorbitán monolaurato, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. En algunos ejemplos, se incluyen en las composiciones cinc, calcio, albúmina de suero, EDTA, cloruro cálcico y/o conservantes fenólicos. El porcentaje de compuesto activo contenido en dichas composiciones depende en gran medida de la naturaleza específica del mismo, así como la actividad del compuesto y las necesidades del sujeto.

Se diseñan inyectables para administración local y sistémica. Para fines del presente documento, se desea administración local para administración directa al intersticio afectado. 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 justo antes de su 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. 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 polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables 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. Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, dextrosa e inyección de Ringer con lactato. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Pueden añadirse agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a preparaciones parenterales envasadas en recipientes de dosis múltiple, que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres del ácido metil y propil p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. 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 dispersión incluyen carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropil metilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen polisorbato 80 (TWEEN 80). Un agente de secuestro o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los vehículos farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua e hidróxido sódico, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajuste de pH.

La concentración del compuesto farmacéuticamente activo se ajusta de modo que una inyección o infusión proporciona una cantidad eficaz para producir el efecto farmacológico deseado, tal como control glucémico. La dosis exacta depende de la edad, peso y condición del paciente o animal como se conoce en la técnica. Las preparaciones parenterales de dosis unitaria pueden envasarse, por ejemplo, en una ampolla, un cartucho, un frasco o una jeringa con una aguja. El volumen de solución líquida o preparación en polvo reconstituida, que contiene el compuesto farmacéuticamente activo, está en función de la enfermedad para tratar y el artículo particular de fabricación elegido para envasado. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles,

como se conoce y se practica en la técnica.

En un ejemplo, la preparación farmacéutica puede estar en forma líquida, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones. Si se proporciona en forma líquida, las preparaciones farmacéuticas pueden proporcionarse como una preparación concentrada para diluir a una concentración terapéuticamente eficaz antes de su 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 arábiga); 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 otro ejemplo, las preparaciones farmacéuticas pueden presentarse en forma liofilizada para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso.

La insulina de acción rápida y las composiciones de enzimas degradantes de hialuronano pueden co-formularse como una composición individual, o pueden proporcionarse como dos composiciones separadas. Cuando se proporcionan como dos composiciones, las composiciones pueden mezclarse antes de la administración para co-administrar, o pueden mantenerse separadas y después co-administrarse juntas, secuencial o intermitentemente. En algunos ejemplos, la insulina de acción rápida y la enzima degradante de hialuronano se co-formulan como composiciones de insulina de acción súper rápida. Como se analiza posteriormente, las composiciones pueden formularse para dosificación individual o múltiple, donde las dosificaciones pueden proporcionarse como una relación de la cantidad de una enzima degradante de hialuronano e insulina administrada. Por ejemplo, puede administrarse una enzima degradante de hialuronano a 1 U de hialuronidasa/U de insulina (1:1) a 50:1 o más, por ejemplo, a exacta o aproximadamente 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1 o más. En otros ejemplos, se administran relaciones menores de enzima degradante de hialuronano e insulina, incluyendo, por ejemplo, 1 U de hialuronidasa/2 U de insulina (1:2), 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:1 o 1:20. La insulina de acción rápida puede estar presente en las composiciones co-formuladas o separadas en concentraciones de o aproximadamente 10 U/ml, 20 U/ml, 30 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 60 U/ml, 70 U/ml, 80 U/ml, 90 U/ml, 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 250 U/ml, 300 U/ml, 350 U/ml, 400 U/ml, 450 U/ml o 500 U/ml. Típicamente, la cantidad de enzima degradante de hialuronano en las composiciones co-formuladas o separadas es funcionalmente equivalente a o al menos 1 U/ml, 2 U/ml, 3 U/ml, 4 U/ml, 5 U/ml, 6 U/ml, 7 U/ml, 8 U/ml, 9 U/ml, 10 U/ml, 15 U/ml, 20 U/ml o 25 U/ml de la actividad hialuronidasa. En algunos ejemplos, la cantidad de enzima degradante de hialuronano en las composiciones co-formuladas o separadas es funcionalmente equivalente a o al menos 30 o 35 U/ml de actividad hialuronidasa, tal como o 30 U/ml, 35 U/ml, 37,5 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 60 U/ml, 70 U/ml, 80 U/ml, 90 U/ml, 100 U/ml, 200 U/ml, 300 U/ml, 400 U/ml, 500 U/ml, 600 U/ml, 700 U/ml, 800 U/ml, 900 U/ml, 1.000 U/ml, 2.000 U/ml, 3.000 U/ml o 5.000 U/ml de actividad hialuronidasa.

Las composiciones de insulina de acción súper rápida proporcionadas en el presente documento pueden contener uno o más tampones de pH (tales como, por ejemplo, histidina, fosfato, Tris u otros tampones), o tampón ácido (tal como acetato, citrato, piruvato, Gly-HCl, succinato, lactato, maleato u otros tampones), modificador de la tonicidad (tal como, por ejemplo, un aminoácido, polialcohol, glicerol, NaCl, trehalosa, otras sales y/o azúcares), estabilizador (tal como benzoato sódico para estabilizar la insulina), agente quelante, tal como ácido etilendiaminotetraacético, etilendiaminotetraacetato o EDTA de calcio, eliminador de oxígeno, tales como metionina, ácido ascórbico/ascorbato, ácido cítrico/citrato o albúmina, y/o un conservante, tal como un conservante que contiene un anillo aromático (por ejemplo fenol o cresol). Los conservantes ejemplares que son útiles en las composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, m-cresol, fenol y parabeno o cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, se añade m-cresol a exacta o aproximadamente 0,05 % a 0,2 %, tal como 0,1 % a 0,15 % (por ejemplo a exacta o aproximadamente 0,1 %, 0,11 %, 0,12 %, 0,13 %, 0,14 % o 0,15 %). Las concentraciones adecuadas de fenol o parabeno incluyen 0,05-0,25 %, tal como 0,1 % a 0,2 % (por ejemplo a exacta o aproximadamente 0,1 %, 0,12 %, 0,13 %, 0,14 %, 0,15 %, 0,16 %, 0,17 %, 0,18 %, 0,19 % y 0,2 %). Típicamente, se proporciona NaCl u otra sal en composiciones que contengan una enzima degradante de hialuronano. Las concentraciones ejemplares de NaCl incluyen 50 mM a 200 mM, tales como 50 mM a 150 mM, incluyendo 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM y 150 mM. En algunos ejemplos, para conservar la estabilidad de las composiciones proporcionadas en el presente documento, a medida que aumenta la concentración salina en la composición, también lo hace el pH. Puede incluirse también glicerol como un modificador de la tonicidad y/o para aumentar la viscosidad de las composiciones.

Los estabilizadores ejemplares que son útiles para composiciones que contienen una enzima degradante de hialuronano incluyen detergentes o tensioactivos, tales como polisorbatos y proteínas tales como albúmina de suero humano. En algunos ejemplos, se incluyen uno o más tensioactivos (por ejemplo tales como Pluronic F68) en las composiciones, tal como a exacta o aproximadamente 0,001 % a 0,1 %, típicamente a exacta o aproximadamente 0,005 % a 0,03 % (por ejemplo 0,005 %, 0,006 %, 0,007 %, 0,008 %, 0,009 %, 0,01 %, 0,012 %, 0,014 %, 0,016 %, 0,018 %, 0,02 % o 0,03). Las concentraciones ejemplares de albúmina de suero que son útiles en las composiciones del presente documento incluyen 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml o 1 mg/ml, pero pueden ser mayores o menores. También pueden estar presente polisorbatos en las composiciones a, por ejemplo, concentraciones de exacta o aproximadamente 0,001 %, 0,002 %, 0,003 %, 0,004 %, 0,005 %, 0,006 %, 0,007 %, 0,008 %, 0,009 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 % o 0,1 %. Los estabilizadores ejemplares que son útiles para composiciones que contienen una insulina

incluyen cinc y m-cresol. Por ejemplo, el cinc puede actuar para estabilizar el hexámero de insulina. Puede proporcionarse cinc, por ejemplo, como óxido de cinc, acetato de cinc o cloruro de cinc. El cinc puede estar presente en una composición proporcionada en el presente documento a entre exacta o aproximadamente 0,001 y 0,1 mg por 100 Unidades de insulina, tal como 0,002 miligramos por 100 Unidades de insulina (mg/100 U), 0,005 mg/100 U, 0,01 mg/100 U, 0,012 mg/100 U, 0,014 mg/100 U, 0,016 mg/100 U, 0,017 mg/100 U, 0,018 mg/100 U, 0,02 mg/100 U, 0,022 mg/100 U, 0,024 mg/100 U, 0,026 mg/100 U, 0,28 mg/100 U, 0,03 mg/100 U, 0,04 mg/100 U, 0,05 mg/100 U, 0,06 mg/100 U, 0,07 mg/100 U, 0,08 mg/100 U o 0,1 mg/100 U. En un ejemplo, el cinc está presente a 0,017 mg por 100 U de insulina. También puede estar presente un agente quelante metálico, tal como EDTA de calcio (CaEDTA), tal como por ejemplo, a concentraciones de entre aproximadamente 0,02 mM y 20 mM, tal como 0,02 mM, 0,04 mM, 0,06 mM, 0,08 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM o más. En algunos ejemplos, cuando están presentes tanto un agente quelante como cinc en una composición proporcionada en el presente documento, el agente quelante está presente en cantidades aproximadamente iguales (es decir relación molar de 0,6 a 1,4) o exceso molar para cinc, tal como, por ejemplo, a una relación de exacta o aproximadamente 2:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1 o más de agente quelante:cinc. El cloruro cálcico también puede incluirse en las composiciones en, por ejemplo, entre aproximadamente 0,2 mM y 20 mM.

En algunos casos, están presentes uno cualquiera o más de los componentes descritos anteriormente solamente en la composición de insulina de acción rápida o la composición degradante de hialuronano, hasta que las dos composiciones se co-formulan o se suministran al sujeto como una composición de insulina de acción súper rápida. Por ejemplo, la composición de insulina de acción rápida puede contener cinc a entre exacta o aproximadamente 0,001 a 0,1 mg por 100 Unidades de insulina, tal como 0,002 miligramos por 100 Unidades de insulina (mg/100 U), 0,005 mg/100 U, 0,01 mg/100 U, 0,012 mg/100 U, 0,014 mg/100 U, 0,016 mg/100 U, 0,017 mg/100 U, 0,018 mg/100 U, 0,02 mg/100 U, 0,022 mg/100 U, 0,024 mg/100 U, 0,026 mg/100 U, 0,28 mg/100 U, 0,03 mg/100 U, 0,04 mg/100 U, 0,05 mg/100 U, 0,06 mg/100 U, 0,07 mg/100 U, 0,08 mg/100 U o 0,1 mg/100 U y sin agente quelante, tal como EDTA, mientras que la composición degradante de hialuronano puede contener un agente quelante, tal como EDTA, a exacta o aproximadamente 0,02 mM a 20 mM, tal como 0,02 mM, 0,04 mM, 0,06 mM, 0,08 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM o más, y sin cinc. Por lo tanto, solamente cuando las dos composiciones se mezclan, tal como cuando se co-formulan o co-administran, la composición que contiene insulina también contiene EDTA, y la composición que contiene un enzima degradante de hialuronano también contiene cinc. En algunos casos, la composición de insulina de acción rápida inicial y la composición de enzima degradante de hialuronano contienen suficientes cantidades de cinc o agente quelante, respectivamente, que cuando se mezclan para co-formulación o co-administración, el agente quelante está presente en cantidades aproximadamente equimolares (es decir relación molar del 0,6 al 1,4) o exceso molar para cinc, tal como por ejemplo, a una relación de o aproximadamente 2:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1 o más agente quelante:cinc.

El pH y la osmolaridad de las composiciones pueden ajustarse por un experto en la materia para optimizar las condiciones para la actividad y estabilidad deseadas de la composición. Por ejemplo, como se ha indicado anteriormente, en algunos casos, si se aumenta la concentración salina, el pH también puede aumentarse para conservar la estabilidad de la composición. Además, un experto en la materia puede cambiar el pH para aumentar la solubilidad de la insulina de acción rápida particular usada en las insulinas de acción súper rápida proporcionadas en el presente documento. En algunos ejemplos, las composiciones proporcionadas en el presente documento que contienen uno o ambos de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano tienen una osmolaridad de exacta o aproximadamente 100 mOsm/kg, 120 mOsm/kg, 140 mOsm/kg, 160 mOsm/kg, 180 mOsm/kg, 200 mOsm/kg, 220 mOsm/kg, 240 mOsm/kg, 260 mOsm/kg, 280 mOsm/kg, 300 mOsm/kg, 320 mOsm/kg, 340 mOsm/kg, 360 mOsm/kg, 380 mOsm/kg, 400 mOsm/kg, 420 mOsm/kg, 440 mOsm/kg, 460 mOsm/kg, 500 o más mOsm/kg, y un pH de exacta o a aproximadamente 6, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8 u 8. En algunos ejemplos, el pH de exactamente o de aproximadamente 6,5 a o a aproximadamente 7,5, tal como 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 o 7,5.

Pueden emplearse métodos de administración para reducir la exposición de compuestos seleccionados a procesos degradantes, tales como degradación proteolítica e intervención inmunológica mediante respuestas antigénicas e inmunogénicas. Los ejemplos de dichos métodos incluyen la administración local en el sitio de tratamiento. Se ha indicado que la pegilación de productos terapéuticos aumenta la resistencia a la proteólisis, aumenta la semivida en plasma, y reduce la antigenicidad e inmunogénicidad. Se conocen en la técnica ejemplos de metodologías de pegilación (véase, por ejemplo, Lu y Felix, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 43:127-138, 1994; Lu y Felix, *Peptide Res.*, 6:142-6, 1993; Felix *et al*, *Int. J. Peptide Res.*, 46:253-64, 1995; Benhar *et al*, *J. Biol. Chem.*, 269:13398-404, 1994; Brumeau *et al*, *J Immunol* 154:3088-95, 1995; véase también, Caliceti *et al* (2003) *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55 (10): 1261-1277 y Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S). También puede usarse pegilación en el suministro de moléculas de ácido nucleico *in vivo*. Por ejemplo, la pegilación de adenovirus puede aumentar la estabilidad y la transferencia génica (véase, por ejemplo, Cheng *et al* (2003) *Pharm. Res.* 20 (9):1444-1451).

## Polvos Liofilizados

Son de interés en el presente documento polvos liofilizados, que pueden reconstituirse para administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. También pueden reconstituirse y formularse como sólidos o geles.

5 El polvo liofilizado, estéril se prepara disolviendo un compuesto activo en una solución de tampón. La solución de tampón puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituida, preparada a partir del polvo. La filtración estéril posterior de la solución seguida de liofilización en condiciones convencionales conocidas por los expertos en la materia proporciona la formulación deseada.

10 Brevemente, el polvo liofilizado se prepara disolviendo un excipiente, tal como dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado, en un tampón adecuado, tal como citrato, Tris, histidina, fosfato sódico o potásico u otro tampón tal conocido por los expertos en la materia. Después, se añade una enzima seleccionada a la mezcla resultante, y se agita hasta que se disuelve. La mezcla resultante se esteriliza por filtración o se trata para retirar partículas y para asegurar la esterilidad, y se separa en frascos para liofilización.

15 Cada frasco contendrá una dosificación individual o múltiples dosificaciones del compuesto. El polvo liofilizado puede almacenarse en condiciones apropiadas, tal como a aproximadamente 4 °C hasta temperatura ambiente. La reconstitución de este polvo liofilizado con una solución de tampón proporciona una formulación para su uso en la administración parenteral.

## 20 2. Dosificación y administración

La enzima degradante de hialuronano proporcionada en el presente documento puede formularse como composiciones farmacéuticas para administración de dosificación individual o dosificación múltiple. Por ejemplo, las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden contener enzima degradante de hialuronano a 1 U de hialuronidasa/U de insulina (1:1) hasta 50:1 o más, por ejemplo, a exacta o aproximadamente 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1 o más. En otros ejemplos, se proporcionan relaciones menores de enzima degradante de hialuronano e insulina en las composiciones, incluyendo, por ejemplo 1 U de hialuronidasa/2 U de insulina (1:2), 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15 o 1:20. La enzima degradante de hialuronano seleccionada se incluye en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos laterales indeseables en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse de forma empírica ensayando los polipéptidos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos tales como usando los ensayos proporcionados en el presente documento o conocidos en la técnica (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; Steinkuhler *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. Virol. Meth.* 65: 201-207) y después extrapolarse a partir de los mismos las dosificaciones para seres humanos.

Las dosificaciones terapéuticamente eficaces para las composiciones de insulina de acción súper rápida que contienen una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano pueden determinarse basándose, por ejemplo, en los datos farmacocinéticos (PK) y datos farmacodinámicos (PD), tal como se describe posteriormente en el Ejemplo 1, y las dosis terapéuticas conocidas de la insulina de acción rápida cuando se suministra sin una enzima degradante de hialuronano. Los cambios en la concentración de insulina en sangre o plasma o suero con el tiempo proporcionan información sobre (1) absorción para administración parenteral; (2) distribución y (3) eliminación de insulina *in vivo*. Un modelo farmacocinético define estos cambios fisiológicos en la

50 concentración de insulina en función del tiempo (es decir,  $\frac{dX}{dt}$ ) y los caracteriza matemáticamente usando tasas

y volúmenes. Los parámetros modelo derivados de este modo para insulina permanecerán relativamente constantes hasta que se produzca una perturbación. Un modelo de PK bien establecido para insulina puede proporcionar predicciones razonables de exposición (que se relaciona estrechamente con la eficacia y para seguridad farmacológica que resulta de farmacología exagerada). Las decisiones clínicas sobre selección de dosis y programa de dosis de insulina pueden facilitarse y justificarse usando modelos de PK y simulaciones. Un modelo farmacodinámico cumple un fin similar para la predicción del resultado clínico.

Típicamente, una dosis terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano es de exacta o aproximadamente 0,3 Unidades (U) hasta 5.000 U de una enzima degradante de hialuronano. Por ejemplo, una enzima degradante de hialuronano puede administrarse por vía subcutánea a exacta o aproximadamente 0,3 U, 0,5 U, 1 U, 2 U, 3 U, 5 U, 10 U, 20 U, 30 U, 40 U, 50 U, 100 U, 150 U, 200 U, 250 U, 300 U, 350 U, 400 U, 450 U, 500 U, 600 U, 700 U, 800 U, 900 U, 1000 U, 2.000 U, 3.000 U, 4.000 Unidades 5.000 U o más. En algunos ejemplos, pueden proporcionarse dosificaciones como una relación de la cantidad de una enzima degradante de hialuronano e

insulina administrada. Por ejemplo, una enzima degradante de hialuronano puede administrarse a 1 U de hialuronidasa/U de insulina (1:1) hasta 50:1 o más, por ejemplo, a exacta o aproximadamente 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1 o más. En otros ejemplos, se administran relaciones más bajas de enzima degradante de hialuronano e insulina, incluyendo, por ejemplo, 1 U de hialuronidasa/2 U de insulina (1:2), 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15 o 1:20. Típicamente, los volúmenes de inyecciones o infusiones de enzima degradante de hialuronano contemplados en el presente documento son de exacta o aproximadamente 0,01 ml, 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml o más. La enzima degradante de hialuronano puede proporcionarse como una solución de reserva a exacta o aproximadamente 1 U/ml, 2 U/ml, 3 U/ml, 4 U/ml, 5 U/ml, 6 U/ml, 7 U/ml, 8 U/ml, 9 U/ml, 10 U/ml, 15 U/ml, 20 U/ml, 25 U/ml, 30 U/ml, 35 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 60 U/ml, 70 U/ml, 80 U/ml, 90 U/ml 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 300 U/ml, 400 U/ml, 500 U/ml, 600 U/ml, 800 U/ml o 1000 U/ml, o puede proporcionarse en una forma más concentrada, por ejemplo a exacta o aproximadamente 2000 U/ml, 3000 Unidades/ml, 4000 U/ml, 5000 U/ml, 8000 U/ml, 10.000 U/ml o 20.000 U/ml para uso directamente o para dilución a la concentración eficaz antes de su uso. La enzima degradante de hialuronano puede proporcionarse como una formulación líquida o liofilizada.

Las preparaciones de insulina proporcionadas en el presente documento pueden formularse como composiciones farmacéuticas para uso de dosis individual o múltiple. Por ejemplo, en algunos casos, se formulan preparaciones de insulina para administración de dosis individual en una cantidad suficiente para proporcionar control glucémico postprandial. En otros ejemplos, se formulan preparaciones de insulina para administración de dosis múltiple o frascos multiusos, tales como para uso en un bolígrafo de insulina, bomba de insulina u otro dispositivo de suministro de insulina continuo, o sistema de bucle cerrado. Las preparaciones de insulina pueden proporcionarse en forma liofilizada o líquida como se analiza en otra parte en el presente documento.

La insulina puede proporcionarse en una dosis terapéuticamente eficaz. Las dosis terapéuticamente eficaces pueden determinarse de forma empírica ensayando los compuestos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos, tales como los ensayos proporcionados en el presente documento, y también pueden individualizarse para cada sujeto basándose en factores tales como el metabolismo, el consumo de alimentos y la gravedad de la enfermedad. La concentración de una insulina seleccionada en la composición depende de, por ejemplo, las velocidades de absorción, inactivación y excreción del complejo, las características fisicoquímicas del complejo, el programa de dosificación y la cantidad administrada así como otros factores conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se entiende que la dosificación precisa del tratamiento está en función de los niveles de glucosa en sangre en un sujeto, y pueden determinarse de forma empírica usando algoritmos conocidos o por extrapolación de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*, la experiencia pasada del sujeto, el recuento de carbohidratos para determinar el contenido de carbohidratos en una comida y, por lo tanto, el aumento de glucosa en sangre prandial estimada y posterior requisito de insulina. Debe observarse que las concentraciones y valores de dosificación pueden variar con cada sujeto tratado. Debe entenderse que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deberían ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración expuestos en el presente documento son solamente ejemplares y no debe pretenderse que limiten el alcance de los mismos. La cantidad de una preparación de insulina seleccionada para administrar para el tratamiento de una afección diabética puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse ensayos *in vitro* y modelos animales para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos.

Por lo tanto, la dosificación precisa, que puede determinarse de forma empírica, puede depender de la preparación de insulina particular, el régimen y programa de dosificación con enzima degradante de hialuronano, la vía de administración, el tipo de diabetes para tratar, la gravedad de la enfermedad y el sujeto que se trate. En general, se proporciona insulina en una cantidad que consigue el control glucémico. Por ejemplo, para conseguir control glucémico postprandial, se administra típicamente a sujetos diabéticos una inyección de embolada de o aproximadamente 0,05 U de insulina de acción rápida por kg de peso corporal (U/kg) hasta 1,0 U/kg 30 minutos a 5 minutos antes de una comida, cuando la insulina se suministra sin una enzima degradante de hialuronano. Se entiende que esta dosis puede aumentarse o reducirse según sea apropiado basándose en, por ejemplo, el metabolismo de un sujeto particular, el contenido de la comida, y los niveles de glucosa en sangre. Se entiende además que el momento en el que se suministra la insulina para control glucémico postprandial puede cambiarse para que sea más cercano o más lejano del momento de ingestión de una comida y, en algunos casos, puede cambiarse de modo que la insulina se suministre en el momento de la comida o después de la comida. Puede administrarse un sujeto, por lo tanto, una composición de insulina de acción súper rápida proporcionada en el presente documento administrando una insulina, tal como una insulina de acción rápida, en combinación con una enzima degradante de hialuronano, a una dosis menor que la administrada cuando la insulina se administra sola y/o en un momento más cercano a la ingestión de una comida en comparación con el momento en el que la dosis de solamente insulina se administra típicamente.

Las insulinas de acción rápida típicamente se administran a dosis de entre 0,05 Unidades/kg y 0,25 Unidades/kg, tal como, por ejemplo, 0,10 Unidades/kg, aunque la dosis particular varía. Pueden administrarse composiciones de insulina de acción súper rápida a dosis menores en comparación con la insulina de acción rápida administrada en ausencia de una enzima degradante de hialuronano. Como se analiza en otra parte en el presente documento, el grado en que la cantidad de una insulina de acción rápida puede reducirse administrándola como una composición

de insulina de acción súper rápida varía, dependiendo de, por ejemplo, el tipo de diabetes que tenga el paciente. Típicamente, la reducción de la cantidad de insulina de acción rápida administrada a pacientes diabéticos de Tipo 2 cuando se administra como una composición de insulina de acción súper rápida es mayor que la reducción en la cantidad de insulina de acción rápida administrada a pacientes diabéticos de Tipo 1 cuando se administra como una composición de insulina de acción súper rápida. Por ejemplo, en casos en los que se administra tanto a un paciente diabético de Tipo 1 como a un paciente diabético de Tipo 2 0,20 U/kg de insulina de acción rápida para controlar los niveles de glucosa postprandial, puede administrarse al paciente diabético de Tipo 1 0,15 U/kg de insulina de acción rápida en una composición de insulina de acción súper rápida para conseguir el mismo o mejor control glucémico, y puede administrarse al paciente diabético de Tipo 2 0,10 U/kg de insulina de acción rápida en una composición de insulina de acción súper rápida para conseguir el mismo o mejor control glucémico. Por lo tanto, en algunos ejemplos, se contempla en el presente documento que la cantidad de una insulina de acción rápida que se administra con una enzima degradante de hialuronano como una insulina de acción súper rápida a un paciente diabético de Tipo 2 para conseguir el control glucémico puede reducirse, por ejemplo, en 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o más en comparación con la cantidad requerida para control glucémico cuando se administra sin una enzima degradante de hialuronano, y la cantidad de insulina de acción rápida que se administra con una enzima degradante de hialuronano como una composición de insulina de acción súper rápida a un paciente diabético de Tipo 1 para conseguir el control glucémico puede reducirse, por ejemplo, en 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o más en comparación con la cantidad requerida para el control glucémico cuando se administra sin una enzima degradante de hialuronano.

Los intervalos de dosificación ejemplares para administración parenteral, tal como subcutánea, de insulina usando los métodos y composiciones proporcionados en el presente documento para controlar los niveles de glucosa en sangre postprandial son de exacta o aproximadamente 0,05 U/kg a 0,50 U/kg, tal como 0,05 U/kg, 0,06 U/kg, 0,07 U/kg, 0,08 U/kg, 0,09 U/kg, 0,10 U/kg, 0,11 U/kg, 0,12 U/kg, 0,13 U/kg, 0,14 U/kg, 0,15 U/kg, 0,20 U/kg, 0,25 U/kg, 0,30 U/kg, 0,40 U/kg, 0,50 U/kg o 1,0 U/kg. La dosificación particular y formulación de la misma depende de la enfermedad y el individuo. Si es necesario la dosificación puede determinarse de forma empírica. Para conseguir dichas dosificaciones, los volúmenes de preparaciones de insulina administrados por vía subcutánea para controlar los niveles de glucosa postprandial pueden ser de exacta o aproximadamente 10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl, 50 µl, 75 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 250 µl, 300 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 700 µl, 800 µl, 900 µl, 1000 µl o más. Por ejemplo, puede administrarse por vía subcutánea una formulación de insulina de 100 U/ml para indicaciones descritas en el presente documento a un sujeto de 70 kg en un volumen de 35 µl a 350 µl para conseguir una dosificación de 0,05 U/kg a 0,50 U/kg de insulina. Las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento también pueden administrarse a sujetos diabéticos para efectuar control glucémico durante todo el día y la noche, además de control glucémico postprandial. Típicamente, las dosificaciones de insulina administrada para proporcionar control glucémico continuo son menores que las requeridas para conseguir control glucémico postprandial. Las dosificaciones pueden, sin embargo, aumentarse o reducirse basándose en los niveles de glucosa en sangre. Los intervalos de dosificación ejemplares para administración parenteral, tales como subcutánea, de insulina usando los métodos y composiciones proporcionados en el presente documento para proporcionar control glucémico continuo son de exacta o aproximadamente 0,001 U/kg a 0,30 U/kg, tal como 0,001 U/kg, 0,005 U/kg, 0,01 U/kg, 0,02 U/kg, 0,05 U/kg a 0,30 U/kg, tal como 0,05 U/kg, 0,06 U/kg, 0,07 U/kg, 0,08 U/kg, 0,09 U/kg, 0,10 U/kg, 0,11 U/kg, 0,12 U/kg, 0,13 U/kg, 0,14 U/kg, 0,15 U/kg, 0,20 U/kg, 0,25 U/kg, 0,30 U/kg, 0,40 U/kg, 0,50 U/kg o 1,0 U/kg. La dosificación particular y formulación de la misma depende de la enfermedad, el momento de administración y el individuo. Si es necesario, la dosificación puede determinarse de forma empírica. La dosificación para un individuo se valora típicamente hasta la dosificación mínima requerida para conseguir un efecto terapéutico, tal como la dosificación mínima requerida para conseguir el control glucémico. La cantidad de insulina suficiente para conseguir el control glucémico puede determinarse de forma empírica, tal como por exposición a glucosa.

La enzima degradante de hialuronano puede administrarse antes de, posteriormente a, intermitentemente o simultáneamente con la preparación de insulina. En general, la enzima degradante de hialuronano se administra antes de o simultáneamente con la administración de la preparación de insulina para permitir que la enzima de degradación de hialuronano degrade el ácido hialurónico en el espacio intersticial. En un ejemplo, la composición de insulina y composición de enzima degradante de hialuronano se coformulan y, por lo tanto, se administran simultáneamente. En otro ejemplo, la composición de enzima degradante de hialuronano se administra antes de la composición de insulina, tal como 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos o más antes de la administración de la preparación de insulina. En algunos ejemplos, la hialuronidasa se administra junto con la preparación de insulina. Como se apreciará por los expertos en la materia, la proximidad deseada de coadministración puede optimizarse fácilmente ensayando los efectos de la administración de los agentes en diversos tiempos en modelos adecuados, tal como en modelos animales adecuados.

Tanto la preparación de insulina como la preparación de enzima degradante de hialuronano pueden administrarse a la vez, o pueden dividirse en un número de dosis más pequeñas para administrar a intervalos de tiempo. Las preparaciones de insulina seleccionadas pueden administrarse en una o más dosis durante el transcurso de un tiempo de tratamiento por ejemplo durante varios minutos, horas, días, se manas o meses. En algunos casos, es útil la administración continua. Se entiende que la dosificación precisa y el ciclo de administración dependen de la indicación y la tolerancia del paciente.



También se entiende que la dosificación precisa y duración del tratamiento está en función de la diabetes que se trata y puede determinarse de forma empírica usando protocolos de ensayo conocidos o por extrapolación de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Debe observarse que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la diabetes y otros factores, tales como el metabolismo, el consumo de alimentos y el peso corporal del sujeto. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deberían ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración expuestos en el presente documento son solamente ejemplares y no se pretende que limiten el alcance o uso de composiciones y combinaciones que las contienen. Las composiciones pueden administrarse cada minuto, cada varios minutos, cada hora, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o una vez, dependiendo del sujeto y el estado diabético. En general, los regímenes de dosificación se seleccionan para limitar la toxicidad y/u otros efectos negativos, tales como la insulina en exceso. Debería observarse que el médico a cargo conocerá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia a menor dosificación. Por el contrario, el médico a cargo también conocerá cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no es apropiada (evitando efectos secundarios tóxicos).

## Modo de administración

### a. Jeringas

Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden administrarse por vía parenteral a un sujeto usando uno o más de varios modos de administración, incluyendo, pero sin limitación, jeringas, bolígrafos de insulina, bombas de insulina o en el contexto de un sistema de bucle cerrado o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, pueden usarse jeringas de uso individual, incluyendo jeringas de insulina para administrar inyecciones de embolada discreta de las composiciones. Las composiciones pueden administrarse usando la misma jeringa, tal como cuando las preparaciones de insulina y enzima degradante de hialuronano se coformulan, o pueden administrarse secuencialmente usando diferentes jeringas. Las jeringas útiles para administraciones de las composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen jeringas de insulina, que pueden diseñarse para contener concentraciones convencionales de preparaciones de insulina, incluyendo concentraciones de 100 U/ml de preparaciones de insulina, y tienen marcas en unidades de insulina para facilitar la administración. En otros ejemplos, se usa una cualquiera o más de una jeringa de insulina o bomba de insulina o dispositivo similar para administrar una o ambas de la preparación de insulina y la preparación de enzima degradante de hialuronano.

### b. Bolígrafo de insulina

Un bolígrafo de insulina es un sistema de suministro que puede usarse para administrar las composiciones proporcionadas en el presente documento. Los bolígrafos de insulina incluyen los que tienen cartuchos reemplazables cargados con la composición para administrar y los que tienen cartuchos no reemplazables. Los bolígrafos de insulina con cartuchos no reemplazables se desechan típicamente cuando se ha vaciado el cartucho. Los bolígrafos de insulina permiten dosificación en, por ejemplo, incrementos de media unidad, una unidad o dos unidades, que se miden generalmente usando un disco de dosificación u otro mecanismo para ajustar la dosis (véase por ejemplo Patentes de Estados Unidos N° 5947934, 6074372, 6110149, 6524280, 6582404). La composición se suministra después por medio de una aguja fina unida al bolígrafo. Los bolígrafos de insulina se conocen bien en la técnica e incluyen los descritos en otra parte, incluyendo, pero sin limitación, los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5947934, 4973318, 5462535, 5599323, 5626566, 5984906, 6074372, 6110149, 6302869, 6379339 y 7241278). Otros dispositivos de dosificación similares, tales como por ejemplo, los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5947394, 6074372, 6110149 y 6379339, también pueden usarse para administrar las composiciones proporcionadas en el presente documento, bien como una coformulación de insulina y enzima degradante de hialuronano o por separado como una composición de insulina y una composición de enzima degradante de hialuronano. En algunos ejemplos, el bolígrafo de insulina o dispositivo similar también contiene un sensor o monitor que puede medir el nivel de glucosa en sangre del sujeto (véase por ejemplo documento WO2003047426).

Se conocen bien en la técnica bolígrafos de insulina y dispositivos de suministro similares que pueden usarse, o modificarse para usarse, para suministrar las composiciones de insulina proporcionadas en el presente documento e incluyen, pero sin limitación, los comercializados con las marcas comerciales Autopen® (Owen Mumford, Inc.), Disetronic Pen (Disetronic Medical Systems), Humalog® Pen (Eli Lilly and Company), Humalog® Mix 75/25 Pen (Eli Lilly and Company), Humulin® 70/30 Pen (Eli Lilly and Company), Humulin® N Pen (Eli Lilly and Company), Novolog® FlexPen (Novo Nordisk), NovoPen® 3 (Novo Nordisk), NovoPen® 4 (Novo Nordisk), NovoPen® Junior (Novo Nordisk), Novolog® Mix 70/30 FlexPen (Novo Nordisk), InDuo® (Novo Nordisk), Novolin® InnoLet® (Novo Nordisk), Innovo® (Novo Nordisk), OptiPen® (Sanofi-Aventis) OptiPen® Pro2 (Sanofi-Aventis), OptiSet® (Sanofi-Aventis) y SoloSTAR® (Sanofi-Aventis).

### c. Bombas de insulina y otros dispositivos de suministro de insulina

Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden administrarse a un sujeto diabético usando un dispositivo de suministro de insulina, tal como una bomba de insulina u otro dispositivo de infusión continua similar.

5 Los dispositivos de suministro de insulina típicamente contienen al menos un depósito desechable que contiene una composición de insulina, una bomba (incluyendo cualquier control, software, módulos de procesamiento y/o baterías) y un conjunto de infusión desechable, incluyendo una cánula o aguja para inyección subcutánea y un tubo que conecta la cánula o aguja al depósito de insulina. Para uso con una composición de insulina de acción súper rápida, el dispositivo de suministro de insulina puede contener un depósito que contiene una insulina coformulada y  
10 composiciones de enzimas degradantes de hialuronano, o puede contener uno o más depósitos, de modo que las composiciones de insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano están contenidas en el mismo depósito o depósitos separados. En dichos casos, el dispositivo de suministro de insulina puede suministrar cada composición simultáneamente o una detrás de la otra. Por lo tanto, dichos dispositivos pueden usarse para administrar las composiciones de insulina de acción súper rápida proporcionadas en el presente documento. Las  
15 composiciones pueden administrarse de forma continua o en inyecciones de embolada. Además, un usuario de dispositivo de suministro de insulina tiene la capacidad de influir en el perfil de la insulina moldeando la embolada. Por ejemplo, puede administrarse una embolada convencional, que es una infusión similar a una inyección discreta porque toda la dosis se bombea inmediatamente. Una embolada extendida es una infusión lenta a lo largo del tiempo que evita una dosis alta inicial y extiende la acción de la composición. Una embolada de combinación que  
20 contiene tanto una embolada convencional como una embolada extendida también puede administrarse usando una bomba de insulina u otro sistema de suministro continuo. Se conocen en la técnica dispositivos de suministro de insulina y se describen en otra parte, incluyendo, pero sin limitación, en las Patentes de Estados Unidos N° 6554798, 6641533, 6744350, 6852104, 6872200, 6936029, 6979326, 6999854, 7025713 y 7109878. También pueden conectarse dispositivos de suministro de insulina a un monitor o sensor de glucosa, y/o pueden contener un medio  
25 para calcular la dosis de insulina recomendada basándose en los niveles de glucosa en sangre, contenido de carbohidratos de una comida, u otro dato. Los dispositivos de suministro de insulina adicionales pueden ser implantables o pueden ser externos al sujeto.

### d. Sistemas de bucle cerrado

30 Los sistemas de bucle cerrado, denominados en ocasiones páncreas artificial, son de interés particular para uso con las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento. Los sistemas de bucle cerrado se refieren a sistemas con un monitor de glucosa continuo integrado, una bomba de insulina u otro sistema de suministro y controlador que incluya un algoritmo matemático que calcule constantemente la infusión de insulina requerida para  
35 el control glucémico basándose en mediciones en tiempo real de los niveles de glucosa en sangre. Dichos sistemas, cuando se optimizan, pueden facilitar el control glucémico constante y muy estrecho, similar a la respuesta de insulina natural y el control glucémico observado en un sujeto no diabético sano. Para ser eficaz, sin embargo, los sistemas de bucle cerrado requieren un monitor de glucosa tanto fiable como preciso continuo, y el suministro de una insulina con una acción muy rápida. Por ejemplo, los retardos en la absorción y acción de insulina asociados  
40 con suministro subcutáneo de insulinas de acción rápida pueden conducir a grandes excursiones glucémicas postprandiales (Hovorka *et al.* (2006) *Diabetic Med.* 23: 1-12). El retardo debido a la absorción de insulina, acción de insulina, cinética de glucosa intersticial, y el tiempo de transporte para sistemas de control basados *ex vivo*, tales como los basados en la técnica de microdiálisis, pueden dar como resultado un retardo temporal general de 100 minutos o más desde el momento del suministro de insulina hasta el máximo de su efecto reductor de glucosa  
45 detectable (Hovorka *et al.* (2006) *Diabetic Med.* 23: 1-12). Por lo tanto, una vez administrada, la insulina continuará aumentando su efecto medible durante casi 2 horas. Esto puede complicar la reducción eficaz de la concentración de glucosa después de la ingestión de una comida usando un sistema de bucle cerrado. En primer lugar, tiene que detectarse un aumento de glucosa. Sin embargo, esto sucede típicamente solamente después de un periodo de tiempo de aproximadamente 10-40 minutos. El sistema debe determinar que se ha digerido un alimento y  
50 administrar una dosis de insulina apropiada. La capacidad del sistema para compensar posteriormente una dosis de insulina "valorada erróneamente" está comprometida por largos retardos y la capacidad de "retirar" la insulina una vez administrada. Dichos problemas pueden superarse, al menos en parte, usando una composición de insulina de acción súper rápida, tal como las proporcionadas en el presente documento, que muestre una velocidad y nivel de absorción aumentados y una mejora asociada en la farmacodinámica (como se describe en el Ejemplo 1, posterior).  
55 Las composiciones de insulina de acción súper rápida proporcionadas en el presente documento tienen un  $t_{m\acute{a}x}$  reducido (es decir consiguen la concentración máxima más rápido) que las insulinas de acción rápida y comienzan controlando los niveles de glucosa en sangre más rápido que las insulinas de acción rápida. Esta velocidad aumentada de absorción e inicio de la acción reduce el retardo entre la acción de la insulina y el control de la glucosa y entrada, dando como resultado un sistema de bucle cerrado más eficaz que puede controlar más  
60 estrechamente los niveles de glucosa en sangre, reduciendo las excursiones glucémicas.

Se conocen bien en la técnica sistemas de bucle cerrado y se han descrito en otra parte, incluyendo, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos N° 5279543, 5569186, 6558351, 6558345, 6589229, 6669663, 6740072, 7267665 y 7354420. Estos y sistemas similares, fácilmente identificables por un experto en la materia, pueden  
65 usarse para suministrar las composiciones de insulina de acción súper rápida proporcionadas en el presente documento. Los sistemas de bucles cerrados incluyen un sistema sensor para medir los niveles de glucosa en

sangre, un controlador y un sistema de suministro. Este sistema integrado se diseña para modelar una célula beta pancreática (célula  $\beta$ ), de modo que controle un dispositivo de infusión para suministrar insulina a un sujeto en un perfil de concentración similar al que se crearía por células  $\beta$  humanas completamente funcionales, cuando se responde a cambios en las concentraciones de glucosa en sangre en el cuerpo. Por lo tanto, el sistema simula la respuesta de insulina natural del cuerpo a niveles de glucosa en sangre y no solamente hace un uso eficaz de la insulina, sino que también tiene en cuenta otras funciones corporales además ya que la insulina tiene efectos tanto metabólicos como mitógenos. Además, el control glucémico conseguido usando un sistema de bucle cerrado se consigue sin requerir ninguna información acerca del tamaño y momento de una comida, u otros factores. El sistema se puede basar solamente en mediciones de glucosa en sangre en tiempo real. El sensor de glucosa genera una señal sensora representativa de los niveles de glucosa en sangre en el cuerpo, y proporciona la señal sensora al controlador. El controlador recibe la señal sensora y genera órdenes que se comunican al sistema de suministro de insulina. El sistema de suministro de insulina recibe las órdenes e infunde insulina al cuerpo en respuesta a las órdenes. Se proporcionan posteriormente descripciones de componentes ejemplares de sistemas de bucles cerrados que puede usarse para suministrar las composiciones de insulina de acción súper rápida proporcionadas en el presente documento. Se entiende que un experto en la materia puede identificar fácilmente sistemas de bucle cerrado adecuados para su uso en el presente documento. Dichos sistemas se han descrito en la técnica, incluyendo pero sin limitación, los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5279543, 5569186, 6558351, 6558345, 6589229, 6669663, 6740072, 7267665 y 7354420. Los componentes individuales de los sistemas también se han descrito en la técnica, individualmente y en el contexto de un sistema de bucle cerrado para su uso en la consecución del control glucémico. Se entiende que los ejemplos proporcionados en el presente documento son solamente ejemplares, y que pueden usarse otros sistemas de bucle cerrado o componentes individuales para suministrar las composiciones de insulina de acción súper rápida proporcionadas en el presente documento.

Los sistemas de bucle cerrado contienen un sensor de glucosa o monitor que actúa continuamente. Dichos dispositivos pueden contener sensores de tipo aguja que se insertan bajo la piel y se unen a un pequeño transmisor que comunica los datos de glucosa de manera inalámbrica por telemetría de radiofrecuencia a un pequeño receptor. En algunos ejemplos, el sensor se inserta a través de la piel del sujeto usando una aguja de inserción, que se retira y se desecha una vez que el sensor está situado en el tejido subcutáneo. La aguja de inserción tiene una punta afilada y una ranura abierta para sostener el sensor durante la inserción en la piel (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.586.553 y 5.954.643). El sensor usado en el sistema de bucle cerrado puede contener opcionalmente tres electrodos que se exponen al fluido intersticial (ISF) en el tejido subcutáneo. Los tres electrodos incluyen un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un contra electrodo que se usan para formar un circuito. Cuando se proporciona una tensión apropiada a través del electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, el ISF proporciona impedancia entre los electrodos. Una señal de corriente análoga fluye del electrodo de trabajo a través del cuerpo y al contra electrodo. La tensión en el electrodo de trabajo generalmente se mantiene a tierra, y la tensión en el electrodo de referencia puede mantenerse a una tensión establecida  $V_{set}$ , tal como, por ejemplo, entre 300 y 700 mV. La reacción más prominente estimulada por la diferencia de tensión entre los electrodos es la reducción de glucosa a medida que reacciona en primer lugar con la enzima glucosa oxidasa (GOX) para generar ácido glucónico y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Después el  $H_2O_2$  se reduce a agua ( $H_2O$ ) y ( $O^-$ ) en la superficie del electrodo de trabajo. El  $O^-$  extrae una carga positiva de los componentes eléctricos sensores, repeliendo de este modo un electrón y provocando un flujo de corriente eléctrica. Esto da como resultado que la señal de corriente análoga sea proporcional a la concentración de glucosa en el ISF que está en contacto con los electrodos sensores (véase por ejemplo la Patente de Estados Unidos. N° 7.354.420).

En algunos ejemplos, se usa más de un sensor para medir la glucosa en sangre. Por ejemplo, pueden usarse sensores redundantes y se puede notificar al sujeto cuando un sensor falla por la electrónica de transmisor del monitor característica de telemetría. Un indicador también puede informar al sujeto de qué sensores aún funcionan y/o del número de sensores que aún funcionan. En otros ejemplos, se combinan señales sensoras mediante promediado u otros medios. Además, pueden usarse diferentes tipos de sensores. Por ejemplo, puede usarse un sensor de glucosa interno y un sensor de glucosa externo para medir la glucosa en sangre al mismo tiempo.

Los sensores de glucosa que pueden usarse en un sistema de bucle cerrado que suministra las composiciones de insulina de acción súper rápida proporcionados en el presente documento se conocen bien y pueden identificarse fácilmente y, opcionalmente, modificarse adicionalmente, por un experto en la materia. Los sensores de glucosa internos ejemplares incluyen, pero sin limitación, los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5.497.772, 5.660.163, 5.791.344, 5.569.186, 6.895.265. Es un sensor de glucosa ejemplar que usa la fluorescencia el descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.011.984. Los sistemas sensores de glucosa también pueden usar otras tecnologías sensoras, incluyendo haces de luz, conductividad, toma de muestras a chorro, micro diálisis, microporación, toma de muestras ultrasónica, iontoforesis inversa u otro método (por ejemplo Patentes de Estados Unidos N° 5.433.197 y 5.945.676 y la Publicación de Patente Internacional WO 199929230). En algunos ejemplos, se localiza solamente el electrodo de trabajo en el tejido subcutáneo y en contacto con el ISF, y el contra electrodo y el electrodo de referencia se localizan externos al cuerpo y en contacto con la piel. El contra electrodo y el electrodo de referencia pueden localizarse en la superficie de un alojamiento de monitor y puede mantenerse pegado a la piel como parte de un monitor de características de telemetría. En ejemplos adicionales, el contra electrodo y el electrodo de referencia se mantienen pegados a la piel usando otros dispositivos, tal como llevando un cable a los electrodos y pegando los electrodos a la piel, incorporando los electrodos en la parte inferior de un reloj que toque la

piel. Además, se puede colocar más de un electrodo de trabajo en el tejido subcutáneo para redundancia. También puede recogerse fluido intersticial del cuerpo de un sujeto y hacerse fluir sobre un sensor externo que no se implanta en el cuerpo.

5 El controlador recibe información del sensor de glucosa. El controlador se diseña para modelar una célula beta pancreática (célula  $\beta$ ) y proporciona órdenes al dispositivo de suministro de insulina para infundir la cantidad requerida de insulina para control glucémico. El controlador utiliza software con algoritmos para calcular la cantidad requerida de insulina basándose en los niveles de glucosa detectados por el sensor de glucosa. Los algoritmos  
10 ejemplares incluyen los que modelan las células  $\beta$  estrechamente, ya que los algoritmos que se diseñan para minimizar las excursiones de glucosa en el cuerpo, independientemente de cuánta insulina se suministre, puede provocar aumento de peso excesivo, hipertensión y aterosclerosis. Típicamente, se pretende que el sistema emule el patrón de secreción de insulina *in vivo* y ajuste este patrón de forma uniforme con la adaptación de células  $\beta$  *in vivo* experimentada por individuos sanos normales. Los algoritmos de control útiles para sistemas de bucle cerrado incluyen los utilizados por un controlador proporcional integral derivativo (PID). Los controladores proporcionales  
15 derivativos y algoritmos de control predictivos modelo (MPC) también pueden usarse en algunos sistemas (Hovorka *et al.* (2006) *Diabetic Med.* 23:1-12). Los algoritmos ejemplares incluyen, pero sin limitación, los descritos en Hovorka *et al.* (*Diabetic Med.* (2006) 23:1-12.), Shimoda *et al.* (*Front Med. Biol. Eng.* (1997) 8:197-211), Shichiri *et al.* (*Artif Órgans* (1998) 22:32-42), Steil *et al.* (*Diabetes Technol Ther* (2003) 5:953-964), Kaletz *et al.* (*Acta Diabetol* (1999) 36:215). Y Patentes de Estados Unidos N° 5279543, 5569186, 6558351, 6558345, 6.589.229, 6740042, 6669663, 20 6740072, 7267665, 7354420 y Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20070243567.

En un ejemplo, se utiliza un controlador PID en el sistema de bucle cerrado. Un controlador PID ajusta continuamente la infusión de insulina evaluando las excursiones de glucosa desde tres puntos de vista: el  
25 alejamiento desde la glucosa diana (el componente proporcional), el área bajo la curva entre la glucosa ambiental y diana (el componente integral) y el cambio en la glucosa ambiental (el componente derivativo). En general, la respuesta de células  $\beta$  *in vivo* a cambios en la glucosa se caracteriza por respuestas de insulina de "primera" y "segunda" fase. La respuesta de insulina bifásica de una célula  $\beta$  puede modelarse usando componentes de un controlador proporcional, más integral, más derivativo (PID) (véase por ejemplo Patente de Estados Unidos N° 7.354.420).

30 El controlador genera órdenes para el suministro de insulina deseado. Los sistemas de suministro de insulina, tales como bombas de insulina, se conocen en la técnica y pueden usarse en los sistemas de bucle cerrado. Los dispositivos de suministro de insulina ejemplares (tales como los descritos anteriormente) incluyen, pero sin limitación, los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 4562751, 467840, 4685903, 4373527, 4573994, 35 6554798, 6641533, 6744350, 6852104, 6872200, 6936029, 6979326, 6999854, 7025713 y 7109878. Los dispositivos de suministro de insulina contienen típicamente uno o más depósitos, que generalmente son desechables, que contienen una preparación de insulina, tal como una composición de insulina de acción súper rápida descrita en el presente documento. Los depósitos pueden contener más de una insulina, tal como, por ejemplo, una insulina de acción basal y una insulina de acción rápida, bien co-formulada y contenida en un único  
40 depósito o bien contenida por separado en dos o más depósitos. Para uso con una composición de insulina de acción súper rápida, el dispositivo de suministro de insulina puede contener una composición de insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano co-formulada, o puede contener dos o más depósitos, de modo que las composiciones de insulina de acción rápida y enzimas degradante de hialuronano estén contenidas por separado en depósitos separados. En dichos casos, el dispositivo de suministro de insulina puede suministrar cada composición  
45 simultáneamente o una después de la otra. En algunos ejemplos, las composiciones se suministran usando un tubo de infusión y una cánula o aguja. En otros ejemplos, el dispositivo de infusión se une directamente a la piel y las composiciones fluyen del dispositivo de infusión, a través de una cánula o aguja directamente al cuerpo sin el uso de un tubo. En ejemplos adicionales, el dispositivo de infusión es interno al cuerpo y puede usarse opcionalmente un tubo de infusión para suministrar las composiciones. Los sistemas de bucle cerrado también pueden contener  
50 componentes adicionales, incluyendo, pero sin limitación, filtros, calibradores y transmisores.

## G. Métodos para Evaluar la Actividad, Farmacocinética y Farmacodinámica

55 Pueden usarse ensayos para evaluar las actividades *in vitro* e *in vivo* de la insulina sola o en combinación con una enzima degradante de hialuronano. Se incluyen entre dichos ensayos los que evalúan las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de insulina administrada por vía subcutánea o por vía intraperitoneal, incluyendo biodisponibilidad y tolerabilidad. La actividad biológica tanto de insulina como de una enzima degradante de hialuronano también puede evaluarse usando ensayos bien conocidos en la técnica. Dichos ensayos pueden usarse, por ejemplo, para determinar dosificaciones apropiadas de una insulina, tal como una insulina de acción  
60 rápida, y una enzima degradante de hialuronano, y la frecuencia de dosificación, para el tratamiento.

### 1. Farmacocinética, Farmacodinámica y Tolerabilidad

65 Pueden realizarse estudios de farmacocinética (PK), farmacodinámica (PD) y tolerabilidad, tales como los descritos en el Ejemplo 1, posterior, usando modelos animales, incluyendo modelos de cerdo tales como los descritos en los

Ejemplos 11 y 12, o pueden realizarse durante estudios clínicos con pacientes. Los modelos animales incluyen, pero sin limitación, ratones, ratas, conejos, perros, cobayas y modelos de primates no humanos, tales como monos cynomolgus o macacos rhesus. En algunos casos, se realizan estudios farmacocinéticos y de tolerabilidad usando animales sanos o sujetos humanos. En otros ejemplos, los estudios se realizan usando modelos animales de diabetes, tales como los descritos posteriormente, o en sujetos humanos diabéticos. Los procedimientos ejemplares útiles para realizar estos estudios incluyen técnicas de pinza de glucosa (Brehm *et al* (2007) en Clin Diabetes Res: Methods and Techniques Ed Michael Rosen, pp 43-76, Ejemplo 1). En el procedimiento de pinza euglicémica hiperinsulinémica, se infunde insulina exógena para crear concentraciones de insulina en plasma hiperinsulinémicas, mientras que la concentración de glucosa en plasma se mantiene constante al nivel euglicémico por medio de una infusión de glucosa exógena variable. La velocidad de infusión de glucosa (GIR) requerida para mantener los niveles de glucosa constantes durante el periodo de hiperinsulinemia proporciona una medida del efecto de la insulina infundida en el metabolismo de glucosa. La GIR es un reflejo de la cantidad de glucosa que se usa por el cuerpo (es decir se necesita infundir más de glucosa exógena para mantener los niveles de glucosa en sangre normales, es decir, entre 90 y 110 mg/dl, cuando el cuerpo está usando más glucosa) y, por lo tanto, la actividad de la insulina administrada (es decir, la actividad de insulina aumentada da como resultado producción de glucosa endógena reducida y aumento de la utilización de glucosa en sangre, dando como resultado una reducción general de la glucosa en sangre). Por lo tanto, dicho procedimiento, además de usarse para evaluar la secreción de insulina y resistencia a insulina en un sujeto, también puede usarse para evaluar con seguridad las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de una insulina, tal como una insulina co-administrada con un enzima degradante de hialuronano.

La farmacocinética de insulina administrada por vía subcutánea o por vía intraperitoneal puede evaluarse midiendo el perfil de concentración en el tiempo de la insulina y calculando dichos parámetros como la concentración de insulina en suero máxima (pico) ( $C_{m\acute{a}x}$ ), el tiempo de pico (es decir cuando se produce la concentración de insulina en suero máxima;  $t_{m\acute{a}x}$ ), y el área bajo la curva (es decir el área bajo la curva generada representando el tiempo frente a la concentración de insulina en sangre; ABC), para cualquier intervalo temporal después de la administración. La biodisponibilidad absoluta de la insulina administrada por vía subcutánea se determina comparando el área bajo la curva de insulina después de suministro subcutáneo ( $ABC_{sc}$ ) con la ABC de insulina después de suministro intravenoso ( $ABC_{iv}$ ). La biodisponibilidad absoluta (F), puede calcularse usando la fórmula:  $F = [(ABC)_{sc} \times dosis_{sc}] / [(ABC)_{iv} \times dosis_{iv}] \times 100$ . La biodisponibilidad relativa ( $F_{rel}$ ) de dos tratamientos por la misma vía de administración, tal como, por ejemplo, una insulina con o sin co-administración con una enzima degradante de hialuronano, también puede calcularse, tal como en el Ejemplo 1. Por ejemplo, la biodisponibilidad relativa ( $F_{rel}$ ) de insulina lispro Humalog® administrada por vía subcutánea co-administrada con rHuPH20 e insulina lispro Humalog® administrada por vía subcutánea sola puede calcularse  $\{[ABC \text{ (insulina lispro Humalog® / rHuPH20)}] / [ABC \text{ (insulina lispro Humalog® sola)}]\} \times 100$ , donde cada dosis de insulina lispro Humalog® es igual, y la ABC se calcula sobre el mismo intervalo temporal. La concentración de insulina en plasma después de administración subcutánea puede medirse usando cualquier método conocido en la técnica adecuado para evaluar las concentraciones de insulina en muestras de sangre. Los métodos ejemplares incluyen, pero sin limitación, ELISA y RIA.

Las propiedades farmacodinámicas de insulina administrada por vía subcutánea o por vía intraperitoneal, puede evaluarse midiendo parámetros tales como la velocidad de infusión de glucosa (GIR) (mg/kg/min), tiempo hasta el efecto máximo ( $tGIR_{m\acute{a}x}$ ) (minutos); el tiempo hasta el efecto semi-máximo tardío ( $tGIR_{50\% \text{ tardío}}$ ) (minutos); el tiempo hasta el efecto semi-máximo temprano ( $tGIR_{50\% \text{ temprano}}$ ) (minutos); el efecto metabólico máximo ( $GIR_{m\acute{a}x}$ ) (mg/kg/minuto);  $ABC-GIR_{0-60 \text{ min}}$  (g/kg);  $ABC-GIR_{0-120 \text{ min}}$  (g/kg);  $ABC-GIR_{0-180 \text{ min}}$  (g/kg);  $ABC-GIR_{0-240 \text{ min}}$  (g/kg);  $ABC-GIR_{0-300 \text{ min}}$  (g/kg); y el  $ABC-GIR_{0-360 \text{ min}}$  (g/kg).

Puede administrarse un intervalo de dosis y diferente frecuencia de dosificación en los estudios farmacocinéticos para evaluar el efecto del aumento o la reducción de concentraciones de insulina y/o una enzima degradante de hialuronano en la dosis. Las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de insulina administrada por vía subcutánea o intraperitoneal tales como biodisponibilidad, también pueden evaluarse con o sin co-administración de una enzima degradante de hialuronano. Por ejemplo, puede administrarse a los animales o sujetos humanos insulina por vía subcutánea sola o en combinación con una enzima degradante de hialuronano durante un procedimiento de pinza euglicémica hiperinsulinémica. Pueden tomarse después muestras sanguíneas en diversos puntos temporales y determinarse la cantidad de insulina en el suero, tal como por radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). La velocidad de infusión de glucosa durante todo el procedimiento también puede calcularse. Las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de insulina administrada por vía subcutánea administradas con o sin una enzima degradante de hialuronano también puede determinarse para evaluar el efecto de la co-administración con una degradante de hialuronano en dichas propiedades de cualquier insulina.

También se conocen en la técnica estudios para evaluar la seguridad y tolerabilidad y pueden usarse en el presente documento. Después de la administración subcutánea de insulina, con o sin la co-administración de un enzima degradante de hialuronano, puede controlarse el desarrollo de cualquier reacción adversa. Las reacciones adversas pueden incluir, pero sin limitación, reacciones del sitio de inyección, tales como edema o hinchazón, cefalea, fiebre, fatiga, escalofríos, sofocos, mareos, urticaria, sibilación o presión en el pecho, náuseas, vómitos, rigores, dolores de espalda, dolores de pecho, calambres musculares, ataques o convulsiones, cambios en la presión sanguínea y

respuestas anafilácticas o de hipersensibilidad grave. Típicamente, se administra una serie de dosis y diferentes frecuencias de dosificación en los estudios de seguridad y tolerabilidad para evaluar el efecto del aumento o la reducción de concentraciones de insulina y/o una enzima degradante de hialuronano en la dosis.

## 5 2. Actividad Biológica

### a. Insulina

10 La capacidad de una insulina, tal como un análogo de insulina, para actuar como un agente terapéutico puede evaluarse *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos *in vitro* bien conocidos en la técnica para evaluar la capacidad de una insulina para unirse con un receptor de insulina. En un ejemplo, se realiza un ensayo de unión competitiva en el que se preparan membranas de células placentarias humanas como una fuente de receptores de insulina y se incuban con insulina humana radiomarcada con o sin el análogo de insulina no marcado. La cantidad de insulina radiomarcada unida se detecta después para determinar la capacidad del análogo de insulina para competir por la unión y se calcula la afinidad relativa del análogo de insulina por el receptor de insulina placentario (véase, por ejemplo Weiss *et al.*, (2001) J. Biol. Chem. 276:40.018-40.024). También pueden usarse otras fuentes de receptores de insulina, incluyendo otras células que expresan de forma natural o recombinante el receptor de insulina, en dichos ensayos de unión competitiva (Duttaroy *et al.*, (2005) Diabetes 54:251-258).

20 La capacidad de insulina para estimular la captación de glucosa o efectuar cualquier otro de sus resultados metabólicos típicos puede evaluarse *in vitro*. Para medir la captación de glucosa estimulada por insulina, se incuban adipocitos con glucosa marcada, tal como 2-desoxi-D-[2,6<sup>3</sup>-H] glucosa o D-[U-<sup>14</sup>C] glucosa con o sin insulina. La radiactividad incorporada se mide después para determinar la cantidad de captación de glucosa en presencia o ausencia de insulina (Louveau *et al.*, (2004) J Endocrin 181:271-280, Duttaroy *et al.*, (2005) Diabetes 54:251 -258).  
25 Cuando se evalúa la actividad de un análogo de insulina, también puede evaluarse la actividad de la insulina humana y usarse para comparación. También pueden realizarse ensayos *in vitro* para evaluar la producción de glucosa en células H4IIE en presencia de insulina (Wang *et al.*, (2000) J. Bioche., 275:14.717-14.721, Duttaroy *et al.*, (2005) Diabetes 54:251-258).

30 También pueden realizarse estudios *in vivo* usando modelos animales diabéticos o sanos o sujetos humanos para evaluar la actividad terapéutica de la insulina. Puede administrarse insulina a modelos animales de diabetes para evaluar los efectos en los niveles de glucosa en sangre, niveles de insulina en circulación y hemoglobina A1c (HbA1c), por ejemplo. La hemoglobina A1c se forma cuando la glucosa se une a hemoglobina, lo que sucede cuando los niveles de glucosa en sangre están elevados. Los niveles de HbA1c en una muestra sanguínea pueden evaluarse, por ejemplo, por HPLC, ELISA, RIA u otro inmunoensayo. Los valores de HbA1c normales para sujetos sanos son de aproximadamente el 4,0-6,2 por ciento. La Asociación de Diabetes Americana recomienda que debería estar por debajo del 7 % (o por debajo del 6 % en ciertas personas) para pacientes con diabetes para ayudar a prevenir las complicaciones de diabetes. Los niveles de insulina pueden medirse, por ejemplo, por ELISA o RIA. Los niveles de glucosa se miden típicamente usando un sensor de glucosa o analizador.

40 Los modelos animales para diabetes de Tipo 1 incluyen el ratón diabético no obeso (NOD) y la rata BioBreeding (BB) (Atkinson *et al.*, (1999) Nature Med. 5:601-604). Los modelos animales para diabetes de Tipo 2 incluyen, pero sin limitación, ratones ob/ob y ratones db/db, que tienen mutaciones en el gen de leptina o receptor de leptina, respectivamente, ratones KK, ratones Nagoya-Shibata-Yasuda (NSY), ratas obesas diabéticas Zucker (ZDF) y ratas Gato-Katazaki (GK) (Cefalu (2006) ILAR Journal 47:186-198). En otros ejemplos, se usan animales sanos para ensayar la actividad de una insulina, con o sin una enzima degradante de hialuronano.

### b. Enzimas degradantes de hialuronano

50 La actividad de una enzima degradante de hialuronano puede evaluarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ensayo USP XXII para hialuronidasa determina la actividad indirectamente midiendo la cantidad de sustrato de ácido hialurónico no degradado, o hialuronano, (HA) después de permitir que la enzima reaccione con el HA durante 30 min a 37 °C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Puede usarse un patrón de referencia de hialuronidasa (USP) o solución de hialuronidasa convencional del Formulario Nacional (NF) en un ensayo para determinar la actividad, en unidades, de cualquier hialuronidasa. En un ejemplo, la actividad se mide usando un ensayo de microturbidez. Esto se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une con albúmina de suero. La actividad se mide incubando la hialuronidasa con hialuronato sódico (ácido hialurónico) durante un periodo de tiempo determinado (por ejemplo 10 minutos) y después precipitando el hialuronato sódico no digerido con la adición de albúmina de suero acidificada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un periodo de desarrollo adicional. La reducción de la turbidez resultante de actividad hialuronidasa en el sustrato de hialuronato sódico es una medida de la actividad enzimática de hialuronidasa. En otro ejemplo, se mide la actividad hialuronidasa usando un ensayo de microtitulación en el que se mide el ácido hialurónico biotinilado residual después de incubación con hialuronidasa (véase por ejemplo Frost y Stem (1997) Anal. Biochem. 251:263-269, Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20050260186). Los grupos de carboxilo libre en los restos de ácido glucurónico del ácido hialurónico están biotinilados, y el sustrato de ácido hialurónico biotinilado está acoplado

covalentemente con una placa de microtitulación. Después de incubación con hialuronidasa, el sustrato de ácido hialurónico biotinilado residual se detecta usando una reacción de avidina-peroxidasa y se compara con el obtenido después de reacción con patrones de hialuronidasa de actividad conocida. Otros ensayos para medir la actividad hialuronidasa también se conocen en la técnica y pueden usarse en los métodos del presente documento (véase, por ejemplo Delpuch *et al.*, (1995) *Anal Biochem* 229:35-41; Takahashi *et al.*, (2003) *Anal. Biochem.* 322:257-263).

También puede evaluarse la capacidad de un enzima degradante de hialuronano para actuar como un agente de dispersión o difusión. Por ejemplo, puede inyectarse colorante azul de tripano por vía subcutánea con o sin una enzima degradante de hialuronano en la piel lateral de cada lado de los ratones desnudos. El área teñida se mide después, tal como con un microcalibrador, para determinar la capacidad de la enzima degradante de hialuronano para actuar como un agente de dispersión (Patente de Estados Unidos N° 20060104968). El efecto de la co-administración de hialuronidasa con otro agente, tal como una insulina, en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de ese agente también puede evaluarse *in vivo* usando un modelo animal y/o sujetos humanos, tal como en la situación de un ensayo clínico, como se ha analizado anteriormente y se demuestra en el Ejemplo 1, posterior. La actividad funcional de una enzima degradante de hialuronano que no es una hialuronidasa puede compararse con una hialuronidasa usando cualquiera de estos ensayos. Esto puede realizarse para determinar cuál es una cantidad funcionalmente equivalente de un enzima degradante de hialuronano. Por ejemplo, la capacidad de una enzima degradante de hialuronano para actuar como un agente de dispersión o difusión puede evaluarse inyectándola en la piel lateral de ratones con azul de tripano, y puede determinarse la cantidad requerida para conseguir la misma cantidad de difusión como, por ejemplo, 100 unidades de un patrón de referencia de hialuronidasa. La cantidad de enzima degradante de hialuronano requerida es, por lo tanto, funcionalmente equivalente a 100 unidades de hialuronidasa.

## H. Usos terapéuticos

Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para el tratamiento de cualquier afección para la que se emplee insulina de acción rápida. Puede administrarse insulina por vía subcutánea, en combinación con una enzima degradante de hialuronano, para tratar cualquier afección que sea susceptible del tratamiento con insulina. Típicamente, una enzima degradante de hialuronano se co-administra con una insulina de acción rápida. Esta sección proporciona usos terapéuticos ejemplares de insulina de acción rápida. Los usos terapéuticos descritos posteriormente son ejemplares y no limitan las aplicaciones de los métodos descritos en el presente documento. Los usos terapéuticos incluyen, pero sin limitación, el tratamiento para diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2, diabetes gestacional y para control glucémico en pacientes críticamente enfermos. Por ejemplo, puede administrarse insulina de acción rápida en combinación con una enzima degradante de hialuronano por vía subcutánea en dosis discretas, tal como mediante una jeringa o bolígrafo de insulina, antes de una comida como terapia de insulina prandial en sujetos con diabetes para conseguir el control glucémico. También puede administrarse insulina de acción rápida por vía subcutánea o por vía intraperitoneal en combinación con una enzima degradante de hialuronano usando una bomba de insulina o en el contexto de un sistema de bucle cerrado para controlar continuamente los niveles de glucosa en sangre durante el día y la noche y/o para controlar las excursiones glucémicas post-prandiales. Está dentro de la experiencia de un médico tratante identificar dichas enfermedades o afecciones.

Como se ha analizado anteriormente, se individualizan típicamente dosificaciones particulares y protocolos de tratamiento para cada sujeto. Si es necesario, una dosificación particular y duración y protocolo de tratamiento pueden determinarse de forma empírica o extrapolarse. Por ejemplo, pueden usarse dosis ejemplares de insulina de acción rápida sin un enzima degradante de hialuronano como un punto de partida para determinar las dosificaciones apropiadas para los métodos proporcionados en el presente documento. Los niveles de dosificación pueden determinarse basándose en una diversidad de factores, tales como el peso corporal del individuo, la salud general, la edad, la actividad del compuesto específico empleado, el sexo, la dieta, la actividad metabólica, las concentraciones de glucosa en sangre, el momento de administración, la tasa de excreción, la combinación farmacológica, la gravedad y la evolución de la enfermedad, y la disposición del paciente a la enfermedad y el criterio del médico tratante. En particular, los niveles de glucosa en la sangre, tales como se miden por un sensor de glucosa en sangre, pueden medirse y usarse para determinar la cantidad de insulina y una enzima degradante de hialuronano para administrar para conseguir el control glucémico. Se conocen en la técnica algoritmos que pueden usarse para determinar una dosis basada en la velocidad de absorción y nivel de absorción de las composiciones de acción súper rápida proporcionadas en el presente documento, y también basándose en los niveles de glucosa en sangre. Las dosificaciones de insulina para control glucémico post-prandial también pueden calcularse o ajustarse, por ejemplo, determinando el contenido de carbohidratos de una comida (Bergental *et al.*, (2008) *Diabetes Care*, Lowe *et al.*, (2008) *Diabetes Res. Clin. Pract.*, Chiesa *et al.*, (2005) *Acta Biomed* 76:44-48).

### 1. Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (o diabetes) se caracteriza por un metabolismo de la glucosa alterado: la glucosa en sangre deriva de carbohidratos absorbidos en el intestino y se produce en el hígado. El aumento de los niveles de glucosa en sangre estimula la liberación de insulina. El flujo de entrada de glucosa postprandial puede ser de 20 a 30 veces mayor que la producción hepática de glucosa observada entre comidas. La liberación de insulina de fase temprana,

que dura 10 minutos aproximadamente, suprime la producción de glucosa hepática y precede a una fase más larga (tardía) de liberación, que dura dos horas o más, y abarca el flujo de entrada de carbohidratos del momento de la comida. Entre comidas, un nivel de insulina continuo bajo, insulina basal, cubre los requisitos metabólicos continuos, en particular para regular la producción de glucosa hepática así como la utilización de glucosa por tejido adiposo, tejido muscular y otros sitios diana. Los pacientes con diabetes presentan niveles de glucosa en sangre elevados (hiperglucemia). La diabetes puede clasificarse en dos grupos principales: la diabetes de tipo 1 y diabetes de tipo 2. La diabetes del tipo 1, o diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM), se caracteriza por una pérdida de las células  $\beta$  productoras de insulina de los islotes de Langerhans en el páncreas, lo que conduce a una deficiencia de insulina. La causa principal de la deficiencia de células  $\beta$  es la autoinmunidad mediada por linfocitos T. Se produce diabetes del tipo 2, o diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM), en pacientes con una función de células  $\beta$  alterada. Estos pacientes tienen resistencia a la insulina o sensibilidad a insulina reducida, combinada con secreción de insulina reducida. La diabetes de tipo 2 puede desarrollarse con el tiempo a diabetes de tipo 1. También se incluye en la diabetes la diabetes gestacional. A los pacientes con diabetes se les pueda administrar insulina tanto para mantener los niveles de insulina basal como para prevenir las excursiones glucémicas, tales como después de la comida.

#### a. Diabetes de tipo 1

La diabetes de tipo 1 es una enfermedad autoinmunitaria dependiente de linfocitos T caracterizada por la infiltración de los islotes del Langerhans, la unidad endocrina del páncreas, y destrucción de células  $\beta$ , que conducen a una deficiencia en la producción de insulina e hiperglucemia. La diabetes del tipo 1 se diagnostica más habitualmente en niños y jóvenes adultos pero puede diagnosticarse a cualquier edad. Los pacientes con diabetes de tipo 1 pueden presentar, además de niveles de insulina bajos y niveles de glucosa en sangre altos, poliuria, polidipsia, polifagia, visión borrosa y fatiga. Puede diagnosticarse a los pacientes que presentan niveles de glucosa en plasma en ayunas en o por encima de 126 mg/dl (7,0 mmol/l), niveles de glucosa en plasma en o por encima de 200 mg/dl (11,1 mmol/l) dos horas después de una carga de glucosa oral de 75 g, tal como en un ensayo de tolerancia a la glucosa y/o niveles de glucosa en plasma aleatorios a o por encima de 200 mg/dl (11,1 mmol/l).

El tratamiento primario para pacientes con diabetes de tipo 1 es la administración de insulina como terapia de reemplazo, que se realiza típicamente junto con el control de la glucosa en sangre. Sin suficiente insulina de reemplazo, puede desarrollarse cetoacidosis diabética, que puede dar como resultado coma o muerte. Puede administrarse a los pacientes inyecciones subcutáneas de insulina de acción rápida usando, por ejemplo, una jeringa o bolígrafo de insulina, o una bomba de insulina para mantener los niveles de glucosa en sangre apropiados a lo largo del día y también para controlar los niveles de glucosa post-prandiales. En algunos casos, puede usarse una bomba de insulina incluyendo en el contexto de un sistema de bucle cerrado para suministrar insulina por vía intraperitoneal. Por lo tanto, puede administrarse a los pacientes con diabetes de tipo 1 la composición de insulina de acción súper rápida descrita en el presente documento por vía subcutánea o por vía intraperitoneal mediante jeringa, bolígrafo de insulina o bomba de insulina o cualquier otro medio útil para suministrar insulina, usando los métodos descritos en el presente documento para controlar más rápidamente los niveles de glucosa e insulina en sangre.

#### b. Diabetes de tipo 2

La diabetes de tipo 2 se asocia con resistencia a insulina y, en algunas poblaciones, también por insulinopenia (pérdida de función de las células  $\beta$ ). En diabetes de tipo 2, la liberación de fase 1 de la insulina está ausente y la liberación de fase 2 está retardada y es inadecuada. El aumento marcado de liberación de insulina que se produce en sujetos sanos durante y después de una comida se retarda, se prolonga y es de cantidad insuficiente en pacientes con diabetes de tipo 2, dando como resultado hiperglucemia. Puede administrarse a los pacientes con diabetes de tipo 2 insulina para controlar los niveles de glucosa en sangre (Mayfield *et al* (2004) *Am Fam Physican* 70: 489-500). Esto puede realizarse en combinación con otros tratamientos y regímenes de tratamiento, incluyendo dieta, ejercicio y otras terapias antidiabéticas (por ejemplo, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, tiazolidinedionas e inhibidores de alfa-glucosidasa). Por lo tanto, pueden administrarse a pacientes con diabetes de tipo 2 las composiciones de insulina de acción súper rápida descritas en el presente documento por vía subcutánea o por vía intraperitoneal mediante jeringa, bolígrafo de insulina o bomba de insulina o cualquier otro medio útil para suministrar insulina, usando los métodos descritos en el presente documento para controlar más rápidamente los niveles de glucosa e insulina en sangre. Como se analiza en otra parte en el presente documento, la administración de composiciones de insulina de acción súper rápida a pacientes diabéticos de tipo 2 puede, además de conseguir mejor control glucémico en comparación con la insulina de acción rápida correspondiente, reducir el riesgo de aumento de peso y obesidad que se asocia con frecuencia con la terapia de insulina en pacientes diabéticos de tipo 2.

#### c. Diabetes gestacional

Se diagnostica diabetes gestacional a mujeres embarazadas que nunca han tenido diabetes antes pero que tienen altos niveles de glucosa en sangre durante el embarazo. Este tipo de diabetes afecta aproximadamente al 1-14 % de



5 todas las mujeres embarazadas, dependiendo de la población estudiada (Carr *et al.*, (1998) Clinical Diabetes 16). Aunque sigue sin conocerse la causa subyacente, parece probable que las hormonas producidas durante el embarazo reduzcan la sensibilidad a la insulina de la mujer embarazada. El mecanismo de resistencia a insulina probablemente sea un defecto postreceptor, ya que se ha demostrado unión de insulina normal por células sensibles a insulina. El páncreas libera 1,5-2,5 veces más insulina para responder al aumento de resistencia a insulina resultante. Los pacientes con función pancreática normal son capaces de cumplir estas demandas. Los pacientes con función pancreática límite tienen dificultad para aumentar la secreción de insulina y en consecuencia producen niveles inadecuados de insulina. La diabetes gestacional resulta por lo tanto cuando hay una secreción de insulina retardada o insuficiente en presencia de resistencia a insulina periférica creciente.

10 Puede administrarse a pacientes con diabetes gestacional insulina para controlar el nivel de glucosa en sangre. Por lo tanto, pueden administrarse a los pacientes con diabetes gestacional las composiciones de insulina de acción súper rápida descritas en el presente documento por vía subcutánea mediante jeringa, bolígrafo de insulina, bomba de insulina o páncreas artificial, o cualquier otro medio, usando los métodos descritos en el presente documento para controlar más rápidamente los niveles de glucosa e insulina en sangre.

## 2. Terapia de insulina para pacientes críticamente enfermos

20 Se produce hiperglucemia y resistencia a insulina frecuentemente en pacientes médicamente y/o quirúrgicamente críticamente enfermos y se ha asociado con morbilidad y mortalidad aumentadas en pacientes tanto diabéticos como no diabéticos y en pacientes con lesión traumática, ictus, lesión de cerebro anóxico, infarto del miocardio agudo, cirugía postcardíaca y otras causas de enfermedad crítica (McCowen *et al.* (2001) Crit Clin. Care 17: 107-124). Se ha tratado a pacientes críticamente enfermos con hiperglucemia con insulina para controlar los niveles de glucosa en sangre. Dicho tratamiento puede reducir la morbilidad y la mortalidad entre este grupo (Van den Berghe *et al.* (2006) N. Eng. J. Med. 354: 449-461). La insulina se administra típicamente por vía intravenosa al paciente, tal como por inyección con una jeringa por un practicante médico o por una infusión usando una bomba de insulina. En algunos ejemplos, se usan algoritmos y software para calcular la dosis. Por lo tanto, puede administrarse a pacientes críticamente enfermos con hiperglucemia una composición de insulina de acción súper rápida descrita en el presente documento para controlar los niveles de glucosa en sangre, aliviando de este modo la hiperglucemia y reduciendo la morbilidad y la mortalidad.

### I. Terapias de combinación

35 Puede administrarse cualquiera de las composiciones de insulina de acción súper rápida descritas en el presente documento en combinación con, antes de, de forma intermitente con, o después de, otros agentes terapéuticos o procedimientos incluyendo, pero sin limitación, otros productos biológicos y compuestos de moléculas pequeñas. Para cualquier enfermedad o afección, incluyendo las ejemplificadas anteriormente, para las que se indique o se haya usado una insulina de acción rápida y para las que estén disponibles otros agentes y tratamientos, las composiciones de insulina de acción súper rápida pueden usarse en combinación con las mismas. Dependiendo de la enfermedad o afección para tratar, las combinaciones ejemplares incluyen, pero sin limitación, combinación con fármacos anti diabéticos, incluyendo, pero sin limitación, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, tiazolidinedionas, inhibidores de alfa-glucosidasa, análogos peptídicos, incluyendo análogos peptídicos de tipo glucagón (GLP) y análogos de péptido inhibidor gástrico (GIP) e inhibidores de DPP-4. En otro ejemplo, las composiciones de insulina de acción súper rápida descritas en el presente documento pueden administrarse en combinación con, antes de, intermitentemente con, o después de, con una o más insulinas adicionales, incluyendo insulina de acción rápida e insulinas de acción basal.

### J. Artículos de fabricación y kits

50 Los compuestos farmacéuticos de las composiciones de insulina de acción súper rápida, composiciones de insulina y/o de enzima degradante de hialuronano proporcionados en el presente documento pueden envasarse como artículos de fabricación que contienen material de envasado, una composición farmacéutica que es eficaz para controlar los niveles de glucosa en sangre, tal como en sujetos diabéticos o críticos y una etiqueta que indique que las composiciones de insulina de acción súper rápida, composiciones de insulina y/o enzima degradante de hialuronano deben usarse para controlar los niveles de glucosa en sangre.

60 Los artículos de fabricación descritos en el presente documento contienen materiales de envasado. Los materiales de envasado para uso en envasado de productos farmacéuticos se conocen bien por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.323.907, 5.052.558 y 5.033.352. Los ejemplos de materiales de envasado farmacéutico incluyen, pero sin limitación, envases de blíster, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, frascos, recipientes, jeringas, botellas y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y modo pretendido de administración y tratamiento. Se contempla una amplia serie de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionados en el presente documento así como una diversidad de tratamientos para cualquier enfermedad o trastorno hemostático.

Las composiciones de insulina de acción súper rápida, composiciones de insulina y/o enzima degradante de hialuronano también pueden proporcionarse como kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en el presente documento y un artículo para administración. Los kits también pueden incluir composiciones farmacéuticas adicionales. En un ejemplo, los kits pueden incluir una o más de las composiciones de insulina de acción súper rápida, composiciones de insulina y/o enzima degradante de hialuronano proporcionadas en el presente documento y una o más composiciones de insulina adicionales, tales como por ejemplo, insulina de acción lenta o de acción intermedia, incluyendo insulinas cristalinas o cualquier combinación de las mismas. Las composiciones de insulina de acción súper rápida, composiciones de insulina y/o enzima degradante de hialuronano y/u otras composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse con un dispositivo para administración, tal como una jeringa, un bolígrafo de insulina, una bomba, o un depósito que se inserta en un bolígrafo de insulina, una bomba u otro dispositivos de suministro. El kit puede incluir, opcionalmente, instrucciones para aplicación incluyendo dosificaciones, regímenes de dosificación e instrucciones para modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica descrita en el presente documento y un artículo para diagnóstico. Por ejemplo, dichos kits pueden incluir un monitor o sensor de glucosa.

Los kits por ejemplo también pueden contener una diversidad de composiciones de insulina de acción rápida, u otra composición de insulina, incluyendo una o más insulinas de acción basal, proporcionadas en recipientes separados y en diversas dosificaciones, por lo que se proporciona al usuario la oportunidad de seleccionar una dosificación de insulina dada, tal como una dosificación prandial, para las circunstancias específicas que implican una aparición real o anticipada de hiperglucemia.

## K. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen para fines ilustrativos solamente y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

### Ejemplo 1

#### La co-administración de PH20 Humana Recombinante (rHuPH20) e insulina de acción rápida facilita la farmacocinética y farmacodinámica mejoradas

Se administra insulina, incluyendo análogos de insulina, a sujetos con diabetes mellitus para el control de la hiperglucemia. En un intento de replicar más eficazmente la liberación de insulina prandial fisiológica normal observada en sujetos sanos, se realizaron estudios clínicos para determinar si la co-administración de PH20 Humana Recombinante (rHuPH20) podría aumentar la velocidad de absorción temprana y la cantidad de absorción de la insulina de acción rápida administrada. La absorción aumentada podría dar como resultado que la insulina de acción rápida fuera de acción aún más rápida y, por lo tanto, se asemejara más estrechamente al perfil de concentración de insulina endógena-tiempo observado en sujetos sanos. Esto podría proporcionar un beneficio clínico con respecto a mejor control glucémico y aumento de peso reducido en sujetos con diabetes mellitus. Los estudios clínicos se diseñaron para evaluar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética (PK) y farmacodinámica (PD) de insulina Humulin<sup>®</sup> R e insulina lispro Humalog<sup>®</sup> (siendo ambas insulinas de acción rápida como se ha descrito en el presente documento) administradas por vía subcutánea bien solas o bien en combinación con rHuPH20.

### Ejemplo 1a

#### Farmacocinética y farmacodinámica de insulina lispro Humalog<sup>®</sup> o insulina Humulin<sup>®</sup> R con y sin co-administración de rHuPH20 en sujetos sanos (no diabéticos)

Se realizó un estudio aleatorio, de doble ciego, cruzado, de dos estadios, secuencial de 2 ramas para evaluar la administración subcutánea de 20 unidades (U) de insulina lispro Humalog<sup>®</sup> o insulina Humulin<sup>®</sup> R con y sin co-administración de rHuPH20. Se admitieron veinticinco sujetos masculinos adultos sanos en el estudio. En el estadio 1, 12 sujetos recibieron una inyección subcutánea de insulina lispro Humalog<sup>®</sup> y rHuPH20 y una inyección subcutánea separada de insulina lispro Humalog<sup>®</sup> sola. Las inyecciones fueron habitualmente con 7 días de diferencia, recibiendo la mitad de los sujetos insulina lispro Humalog<sup>®</sup> y rHuPH20 primero, seguido de insulina lispro Humalog<sup>®</sup> sola, y recibiendo la mitad de los sujetos insulina lispro Humalog<sup>®</sup> sola primero, después insulina lispro Humalog<sup>®</sup> y rHuPH20. En el estadio 2, 13 sujetos recibieron una inyección subcutánea de insulina Humulin<sup>®</sup> R y rHuPH20 y una inyección subcutánea separada de insulina Humulin<sup>®</sup> R sola. Las inyecciones fueron habitualmente con 7 días de diferencia, recibiendo aproximadamente la mitad de los sujetos Humulin<sup>®</sup> R y rHuPH20 primero seguido insulina Humulin<sup>®</sup> R sola, y recibiendo la mitad de los sujetos insulina Humulin<sup>®</sup> R sola primero y después insulina Humulin<sup>®</sup> R y rHuPH20.

Aproximadamente 14 horas antes de cada inyección, cada uno de los sujetos recibió una cena basada en un plan de comidas de 2000 calorías de la Asociación de Diabetes Americana con 60 g de carbohidratos. También se proporcionó un tentempié de 30 g de carbohidratos. Aproximadamente 6 horas después de la cena, los sujetos comenzaron a ayudar (excepto agua) durante al menos 8 horas antes de comenzar un procedimiento de Pinza

Hiperinsulinémica-Euglucémica durante un periodo de 8 horas. Se recogieron muestras de sangre pre-tratamiento y se midieron los signos vitales y el peso antes de inyectarse a los sujetos insulina lispro Humalog<sup>®</sup>, insulina lispro Humalog<sup>®</sup>/rHuPH20, insulina Humulin<sup>®</sup> R o insulina Humulin<sup>®</sup> R/rHuPH20 2 horas después de iniciarse el procedimiento de Pinza Hiperinsulinémica-Euglucémica. Se recogieron muestras de sangre a intervalos prescritos, como se describe posteriormente, y se cuantificaron los niveles de glucosa e insulina durante un periodo de 6 horas.

#### A. Dosificación

Como se ha descrito anteriormente, se administró a 12 sujetos 20 U de insulina lispro Humalog<sup>®</sup> y 300 U de rHuPH20 en 220  $\mu$ l, y 20 U de insulina lispro Humalog<sup>®</sup> en 200  $\mu$ l por vía subcutánea en el cuadrante abdominal izquierdo inferior en el primer estadio del estudio. La dosis de insulina lispro Humalog<sup>®</sup>/rHuPH20 se preparó descongelando en primer lugar rHuPH20 (1 mg/ml, equivalente a aproximadamente 120.000 U/ml en HEPES 10 mM/NaCl 130 mM a pH ~7,0) a temperatura ambiente durante una hora y aspirando de forma aséptica 0,153 cm<sup>3</sup> (equivalente a 18.360 U) de rHuPH20 en una jeringa de insulina de 0,3 cm<sup>3</sup> de capacidad. Después los 0,153 cm<sup>3</sup> de rHuPH20 se transfirieron lentamente a un frasco que contenía 1,17 ml de HYLENEX 150 U/ml (rHuPH20). De este frasco, se aspiraron 1,1 ml y se transfirieron a un frasco que contenía aproximadamente 10,2 ml de insulina lispro Humalog<sup>®</sup> 100 U/ml aspirada del frasco. Después se aspiraron doscientos veinte microlitros de la mezcla de insulina lispro Humalog<sup>®</sup>/rHuPH20 usando una jeringa de insulina de 0,3 cm<sup>3</sup> de capacidad y se usó en un periodo de 4 horas para administración subcutánea a un único sujeto.

Por lo tanto, la mezcla de insulina lispro Humalog<sup>®</sup>/rHuPH20 que se suministró fue de 220  $\mu$ l y contenía 300 U de rHuPH20 (2,5  $\mu$ g), 20 U de insulina lispro Humalog<sup>®</sup>, 0,02 mg de Albúmina de Suero Humana (de la formulación de Hylenex, actúa para estabilizar rHuPH20 contra pérdidas de adsorción y también pueden tener propiedades estabilizadores en relación con la insulina y/o actuar como un eliminador de oxidación); 3 mg de glicerina (de la formulación de la insulina lispro Humalog<sup>®</sup>, presente como un tampón de pH, estabilizador de insulina y/o modificador de la tonicidad); 0,6 mg de m-cresol (de la formulación de insulina lispro Humalog<sup>®</sup>, conservante anticrecimiento microbiano presente a concentraciones elevadas para estabilizar la conformación de hexámero de insulina); 0,004 mg de cinc (de la formulación de insulina lispro Humalog<sup>®</sup> usada para estabilizar la conformación de hexámero de insulina); 0,18 mg de NaCl (de la formulación de Hylenex y rHuPH20 API, como un modificador de tonicidad); fosfato sódico dibásico 0,4 (de la formulación de Hylenex, como un tampón de pH); 0,017 mg de EDTA, disódico (de la formulación de Hylenex como un quelante metálico con el potencial para unirse con iones Zn<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup>); 0,006 mg de cloruro cálcico (de la formulación de Hylenex, forma un complejo con EDTA y puede mejorar la comodidad de la inyección subcutánea); 0,006 mg de HEPES (de la formulación de rHuPH20 API, como tampón de pH); agua (como el disolvente) y NaOH y/o HCl para ajuste de pH.

En el Estadio 2, como se ha descrito anteriormente, se administraron a 13 sujetos tanto 20 U de insulina Humulin R como 240 de rHuPH20 en 200  $\mu$ l y 20 U insulina Humulin<sup>®</sup> R en 200  $\mu$ l por vía subcutánea en el cuadrante abdominal izquierdo inferior. La dosis de insulina Humulin<sup>®</sup> R/rHuPH20 se preparó aspirando en primer lugar 0,3 cm<sup>3</sup> (150 U) de un frasco de insulina Humulin<sup>®</sup> R usando una jeringa de insulina de 0,3 cm<sup>3</sup> de capacidad y transfiriéndola a un frasco que contenía 1,2 ml de rHuPH20 1500 U/ml (formulado como una composición 10X de HYLENEX). La mezcla se mezcló suavemente y se retiraron 0,3 cm<sup>3</sup> de aire del frasco antes de aspirarse 200  $\mu$ l (que contenían 20 U de insulina Humulin<sup>®</sup> R y 240 U de rHuPH20) usando una jeringa de insulina de 0,3 cm<sup>3</sup> de capacidad. Esta se usó en un periodo de 4 horas para administración subcutánea a un único sujeto. Las 20 U de insulina Humulin<sup>®</sup> R en una dosis de 200  $\mu$ l se prepararon por vía subcutánea usando una jeringa individual.

Por lo tanto, la mezcla de insulina Humulin<sup>®</sup> R/rHuPH20 que se suministró fue de 200  $\mu$ l y contenía 240 U USP de rHuPH20 (2  $\mu$ g), 20 U de insulina Humulin<sup>®</sup> R, 0,16 mg de Albúmina de Suero Humano (de la formulación de HYLENEX 10X, que actúa para estabilizar rHuPH20 frente a pérdidas de adsorción y también potencialmente para proporcionar propiedades estabilizadoras en relación con la insulina y/o actuar como un eliminador de oxidación); 3 mg de glicerina (de la formulación de Humulin<sup>®</sup> R, que actúa como un tampón de pH, estabilizador de insulina y/o modificador de la tonicidad); 0,4 mg de m-cresol (de la formulación de Humulin<sup>®</sup> R, que actúa como un conservante anticrecimiento microbiano presente a concentraciones elevadas para estabilizar la conformación del hexámero de insulina); 0,34 mg de cinc (de la formulación de Humulin<sup>®</sup> R, que actúa para estabilizar la conformación del hexámero de insulina); 1,36 mg de NaCl (de la formulación de Hylenex 10X y rHuPH20 API, que actúa como un modificador de la tonicidad); 0,224 de fosfato sódico dibásico (de la formulación de Hylenex 10X, para un tampón de pH); 0,161 mg de EDTA, disódico (de la formulación de Hylenex 10X, como un quelante metálico con el potencial para unirse con iones Zn<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup>); 0,048 mg de cloruro cálcico (de la formulación de Hylenex 10X, que forma un complejo con EDTA y puede mejorar la comodidad de la inyección subcutánea); agua (como disolvente) y NaOH y/o HCl para ajuste de pH.

#### B. Procedimiento de Pinza Hiperinsulinémica-Euglucémica

El efecto de la co-administración de rHuPH20 en la farmacocinética y farmacodinámica de insulina lispro Humalog<sup>®</sup> o insulina Humulin<sup>®</sup> R administrada por vía subcutánea se evaluó tomando muestras sanguíneas para medir la

insulina (es decir, insulina lispro Humalog® o insulina Humulin® R) y los niveles de glucosa. Se usó un procedimiento de Pinza Hiperinsulinémica-Euglucémica para mantener los niveles de glucosa en plasma entre 90-110 mg/dl de modo que pudieran administrarse preparaciones de insulina sin provocar hipoglucemia.

5 El procedimiento consistía en obtener inicialmente el peso y la altura del sujeto y medir los signos vitales después de reposar en una posición sentado durante 5 minutos. Se colocaron ambos brazos en almohadillas calientes para dilatar las venas y se insertaron después catéteres IV. Se colocó un catéter en la vena antecúbica de un brazo para infusión de Dextrosa 20 % mediante dos llaves de interrupción separadas. El otro catéter intra-arterial se colocó en el otro brazo para tomar muestras de sangre arterializada para mediciones de glucosa. Puede retirarse la  
10 almohadilla caliente del sitio de infusión de glucosa, pero el sitio de catéter retrógrado se mantuvo a 65 °C. Se obtuvo una muestra de sangre inicial para medir la glucosa de línea basal 30 minutos antes de la inyección de las preparaciones de insulina. Se tomaron muestras de sangre 10 minutos y 1 minuto antes de la inyección de insulina lispro Humalog®, insulina lispro Humalog®/rHuPH20, insulina Humulin® R o insulina Humulin® R/rHuPH20, después cada 3 minutos durante los primeros 60 minutos, cada 15 minutos desde 60 minutos a 3 horas, después cada hora en lo sucesivo hasta 6 horas. Se analizaron los niveles de glucosa de cada sujeto en todo el procedimiento usando un Analizador de Glucosa YSI 2300 (YSI Inc.) y se ajustó la velocidad de infusión de glucosa (GIR) según sea necesario para mantener la glucosa en plasma entre 90-110 mg/dl. Se analizaron los niveles en circulación de insulina usando un ensayo radioinmunoabsorbente (RIA) que cuantifica los niveles de insulina lispro Humalog® e insulina Humulin® R (Millipore BioPharma Services Division, St. Charles MO).

20 **C. Efecto de la co-administración de rHuPH20 en la farmacocinética de la insulina de acción rápida**

Se midieron varios parámetros para determinar el efecto de la co-administración de rHuPH20 en la farmacocinética de la composición de insulina de acción rápida insulina lispro Humalog® e insulina Humulin® R. Estos incluyeron la  
25 concentración de insulina medida máxima durante el intervalo de dosificación seleccionado ( $C_{m\acute{a}x}$ ); tiempo hasta  $C_{m\acute{a}x}$  ( $t_{m\acute{a}x}$ ); y área bajo las curvas de concentración frente a tiempo (ABC), que se evaluaron para diversos intervalos temporales.

30 **1. Efecto de la co-administración de rHuPH20 e insulina Humalog® en la farmacocinética de insulina**

Se evaluó la concentración de insulina para cada intervalo temporal después de la administración de insulina lispro Humalog® o insulina lispro Humalog®/rHuPH20 por RIA, y se expone en las Tablas 5 y 6, respectivamente. También se proporciona la ABC para los diferentes intervalos temporales (de 0 minutos a x minutos; por ejemplo,  $ABC_{0-3}$   
35 minutos,  $ABC_{0-6}$  minutos,  $ABC_{0-9}$  minutos, etc.), así como la biodisponibilidad relativa ( $F_{rel}$ ), que se calcula como la  $[ABC_{0-x}$  (insulina Humulin® R +rHuPH20)] /  $[ABC_{0-x}$  (insulina Humulin® R sola)]\*100. También se presenta la pendiente creciente, que se determina calculando el cambio en la media geométrica de los niveles de insulina sobre un intervalo temporal, así como el cambio de pendiente medio que es un promedio suavizado de tres valores de la pendiente creciente.

40 **Tabla 5. Concentración de insulina en la sangre después de administración de insulina lispro Humalog®**

| Insulina inmunorreactiva (pmol/l) |          |         |       |       |            |                     |              |                                |
|-----------------------------------|----------|---------|-------|-------|------------|---------------------|--------------|--------------------------------|
| Tiempo (min)                      | Media    | Mediana | DT    | ET    | Media Geo. | Pendiente Creciente | ABC(0-x)     | Cambio de pendiente (promedio) |
| (min)                             | (pmol/l) |         |       |       |            | (pmol/l.min)        | (pmol/l.min) | (pmol/l.min)                   |
| 0                                 | 72,4     | 64,8    | 35,2  | 10,2  | 65,2       |                     |              |                                |
| 3                                 | 78,7     | 67,8    | 31,8  | 9,6   | 73,2       | 2,67                | 208          |                                |
| 6                                 | 82,3     | 84,8    | 24,9  | 7,5   | 79,0       | 1,93                | 436          | 2,85                           |
| 9                                 | 96,9     | 86,3    | 36    | 10,8  | 90,8       | 3,94                | 691          | 2,72                           |
| 12                                | 108,0    | 102,0   | 54,2  | 16,4  | 97,7       | 2,28                | 973          | 3,63                           |
| 15                                | 126,3    | 110,6   | 75,5  | 21,8  | 111,7      | 4,67                | 1287         | 5,16                           |
| 18                                | 160,9    | 146,1   | 116   | 33,5  | 137,2      | 8,52                | 1661         | 6,71                           |
| 21                                | 194,0    | 143,6   | 175,8 | 50,7  | 158,1      | 6,95                | 2104         | 8,21                           |
| 24                                | 233,9    | 172,0   | 228,5 | 66,0  | 185,6      | 9,17                | 2619         | 7,25                           |
| 27                                | 273,4    | 198,7   | 296,5 | 85,6  | 202,5      | 5,63                | 3201         | 10,1                           |
| 30                                | 324,9    | 242,3   | 332,9 | 96,1  | 249,0      | 15,51               | 3879         | 13,47                          |
| 33                                | 388,1    | 302,3   | 359,2 | 108,3 | 306,8      | 19,26               | 4712         | 15,43                          |
| 36                                | 417,0    | 325,4   | 343,8 | 103,6 | 341,3      | 11,51               | 5685         | 16,68                          |
| 39                                | 485,4    | 355,2   | 419,7 | 121,2 | 399,1      | 19,26               | 6795         | 12,2                           |
| 42                                | 495,2    | 354,7   | 381,9 | 110,3 | 416,6      | 5,83                | 8019         | 13,93                          |
| 45                                | 552,6    | 430,4   | 408,6 | 118,0 | 466,7      | 16,71               | 9344         | 9,11                           |
| 48                                | 553,6    | 451,4   | 387,3 | 111,8 | 481,1      | 4,78                | 10766        | 9,9                            |
| 51                                | 576,7    | 483,9   | 384,9 | 111,1 | 505,7      | 8,2                 | 12246        | 9,83                           |

| Insulina inmunorreactiva (pmol/l) |          |         |       |       |              |                     |              |                                |
|-----------------------------------|----------|---------|-------|-------|--------------|---------------------|--------------|--------------------------------|
| Tiempo (min)                      | Media    | Mediana | DT    | ET    | Media Geo.   | Pendiente Creciente | ABC(0-x)     | Cambio de pendiente (promedio) |
| (min)                             | (pmol/l) |         |       |       | (pmol/l.min) | (pmol/l.min)        | (pmol/l.min) |                                |
| 54                                | 612,8    | 504,7   | 306,3 | 88,4  | 555,2        | 16,5                | 13837        | 3,27                           |
| 57                                | 594,1    | 476,6   | 400,1 | 115,5 | 510,5        | -14,9               | 15436        | -0,47                          |
| 60                                | 551,3    | 460,1   | 258,5 | 74,6  | 501,4        | -3,03               | 16954        |                                |
| 75                                | 596,4    | 595,1   | 214,5 | 64,7  | 561,1        | 3,98                | 24923        |                                |
| 90                                | 573,6    | 556,5   | 193,1 | 55,8  | 541,6        | -1,3                | 33193        |                                |
| 105                               | 584,8    | 575,7   | 131,4 | 37,9  | 571,8        | 2,01                | 41543        |                                |
| 120                               | 566,4    | 558,9   | 92,2  | 26,6  | 559,3        | -0,83               | 50026        |                                |
| 135                               | 530,3    | 536,4   | 76,1  | 22,0  | 525,4        | -2,26               | 58162        |                                |
| 150                               | 533,6    | 515,7   | 92,3  | 26,6  | 526,6        | 0,08                | 66052        |                                |
| 165                               | 491,6    | 486,8   | 96,9  | 28,0  | 482,8        | -2,92               | 73623        |                                |
| 180                               | 463,1    | 467,1   | 93,3  | 26,9  | 454,2        | -1,9                | 80650        |                                |
| 240                               | 348,6    | 332,3   | 97,8  | 28,2  | 335,7        | -1,98               | 104350       |                                |
| 300                               | 261,1    | 255,5   | 81,6  | 23,6  | 248,7        | -1,45               | 121882       |                                |
| 360                               | 190,4    | 181,9   | 49,5  | 14,3  | 184,2        | -1,08               | 134867       |                                |

Tabla 6. Concentración de insulina en la sangre después de la co-administración de insulina lispro Humalog® y rHuPH20

| Insulina inmunorreactiva (pmol/l) |          |         |       |       |              |                     |              |                                |                  |
|-----------------------------------|----------|---------|-------|-------|--------------|---------------------|--------------|--------------------------------|------------------|
| Tiempo (min)                      | Media    | Mediana | DT    | ET    | Media Geo.   | Pendiente Creciente | ABC(0-x)     | Cambio de pendiente (promedio) | F <sub>rel</sub> |
| (min)                             | (pmol/l) |         |       |       | (pmol/l.min) | (pmol/l.min)        | (pmol/l.min) | (pmol/l.min)                   | (%)              |
| 0                                 | 70,5     | 66,3    | 32,8  | 9,5   | 64,3         |                     |              |                                |                  |
| 3                                 | 97,0     | 80,7    | 36,6  | 11,0  | 91,5         | 9,09                | 234          |                                | 113              |
| 6                                 | 144,7    | 112,2   | 92,4  | 27,8  | 126,7        | 11,73               | 561          | 9,68                           | 129              |
| 9                                 | 183,9    | 117,3   | 156,9 | 45,3  | 151,4        | 8,22                | 978          | 11,91                          | 142              |
| 12                                | 254,4    | 161,1   | 252,9 | 73,0  | 198,7        | 15,78               | 1503         | 15,21                          | 154              |
| 15                                | 354,6    | 216,8   | 391,1 | 112,9 | 263,6        | 21,63               | 2197         | 20,13                          | 171              |
| 18                                | 442,8    | 293,2   | 475,4 | 137,2 | 332,5        | 22,97               | 3091         | 28,43                          | 186              |
| 21                                | 539,4    | 387,6   | 400,5 | 115,6 | 454,6        | 40,7                | 4271         | 33,51                          | 203              |
| 24                                | 651,7    | 489,4   | 426,4 | 123,1 | 565,2        | 36,86               | 5801         | 40,17                          | 221              |
| 27                                | 759,8    | 621,2   | 390,2 | 112,6 | 694,0        | 42,94               | 7690         | 35,71                          | 240              |
| 30                                | 839,7    | 705,4   | 414,5 | 119,7 | 775,9        | 27,31               | 9895         | 37,81                          | 255              |
| 33                                | 958,2    | 791,4   | 360,4 | 104,0 | 905,4        | 43,17               | 12417        | 33,44                          | 263              |
| 36                                | 1040,5   | 890,4   | 352,4 | 101,7 | 994,9        | 29,83               | 15267        | 30,15                          | 269              |
| 39                                | 1118,0   | 940,3   | 445,8 | 128,7 | 1047,3       | 17,47               | 18331        | 18,89                          | 270              |
| 42                                | 1138,7   | 991,1   | 431,6 | 124,6 | 1075,5       | 9,38                | 21515        | 20,93                          | 268              |
| 45                                | 1239,1   | 1181,6  | 408,6 | 118   | 1183,3       | 35,93               | 24903        | 12,26                          | 267              |
| 48                                | 1234,0   | 1128,7  | 497,1 | 143,5 | 1157,6       | -8,53               | 28414        | 6,46                           | 264              |
| 51                                | 1173,8   | 1124,0  | 326,9 | 94,4  | 1133,6       | -8,01               | 31851        | -12,3                          | 260              |
| 54                                | 1095,6   | 1070,5  | 236,6 | 68,3  | 1072,6       | -20,34              | 35160        | -57,21                         | 254              |
| 57                                | 924,7    | 961,4   | 433,0 | 125,0 | 642,7        | -143,29             | 37733        | -16,71                         | 244              |
| 60                                | 1055,0   | 1006,7  | 363,8 | 105,0 | 983,2        | 113,48              | 40172        |                                | 237              |
| 75                                | 926,2    | 890,4   | 218,2 | 63,0  | 905,2        | -5,2                | 54335        |                                | 218              |
| 90                                | 818,2    | 788,9   | 212,1 | 61,2  | 793,7        | -7,43               | 67077        |                                | 202              |
| 105                               | 689,7    | 667,7   | 175,3 | 50,6  | 666,6        | -8,47               | 78029        |                                | 188              |
| 120                               | 586,5    | 571,2   | 145,3 | 41,9  | 569,5        | -6,48               | 87300        |                                | 175              |
| 135                               | 492,5    | 482,9   | 124,2 | 35,8  | 478,0        | -6,1                | 95157        |                                | 164              |
| 150                               | 423,0    | 432,4   | 127,4 | 36,8  | 405,3        | -4,85               | 101781       |                                | 154              |
| 165                               | 371,6    | 363,2   | 114,8 | 33,1  | 354,7        | -3,37               | 107481       |                                | 146              |
| 180                               | 342,0    | 339,6   | 95,4  | 27,5  | 329,3        | -1,69               | 112610       |                                | 140              |
| 240                               | 232,4    | 248,8   | 83,0  | 24,0  | 218,1        | -1,85               | 129033       |                                | 124              |
| 300                               | 178,3    | 146,6   | 75,0  | 21,7  | 164,1        | -0,9                | 140501       |                                | 115              |
| 360                               | 148,7    | 135,1   | 62,6  | 18,1  | 136,6        | -0,46               | 149523       |                                | 111              |

5 La C<sub>máx</sub> (pmol/l), t<sub>máx</sub> (minutos) y ABC<sub>0-360</sub> (min\*pmol/l) para insulina lispro Humalog® e insulina lispro Humalog® co-administrada con rHuPH20 se proporciona en la Tabla 7. La ABC para los diferentes intervalos temporales se proporciona en la Tabla 8. Los resultados indican que los sujetos recibieron la dosis de insulina lispro

Humalog®/rHuPH20 tuvieron mayor exposición a insulina lispro Humalog® en intervalos temporales tempranos que los que se dosificaron con insulina lispro Humalog® solamente. La Tabla 9 proporciona un sumario de los parámetros PK específicos para cada secuencia de dosificación (por ejemplo, PK para insulina lispro Humalog®/rHuPH20 administrada 1ª (1) o 2ª (2) y ambas (todas)), y un sumario estadístico que demuestra que la secuencia de dosificación no tuvo ningún efecto en la farmacocinética observada. El análisis estadístico determinó el p-valor de la diferencia en la PK observada usando los diferentes grupos de tratamiento (es decir, insulina lispro Humalog® frente a insulina lispro Humalog®/rHuPH20), y la diferencia en la PK observada usando las diferentes secuencias de dosificación (es decir insulina lispro Humalog® sola primero y después la insulina lispro Humalog®/rHuPH20, frente a insulina lispro Humalog®/rHuPH20 primero y después insulina lispro Humalog® sola). También se proporciona en la tabla la biodisponibilidad relativa (F<sub>rel</sub>) que se calcula como la [ABC<sub>0-360</sub> (insulina lispro Humalog®/rHuPH20)] / [ABC<sub>0-360</sub> (insulina lispro Humalog® sola)]\*100.

Para la PK de insulina, se redujo la mediana de t<sub>máx</sub> en 54 % con la co-administración de rHuPH20, de 105 a 48 min (p=0,0006), un efecto visto en los 12 sujetos. La C<sub>máx</sub> media aumentó 87 % de 697 pmol/l cuando se administró a los sujetos solamente insulina lispro Humalog® hasta 1.300 pmol/l (p=0,0003) con co-administración de rHuPH20. La ABC<sub>0-360 min</sub> aumentó 11 % de 134.867 a 149.523 min\*pmol/l, mientras que en intervalos temporales más tempranos las diferencias fueron más pronunciadas (es decir ABC<sub>0-30 min</sub> y ABC<sub>0-60 min</sub> aumentaron 155 % y 140 %, respectivamente). La variabilidad entre sujetos (DT/Media) en t<sub>máx</sub> mejoró del 34 % cuando los sujetos recibieron insulina lispro Humalog® sola al 17 % cuando los sujetos recibieron insulina lispro Humalog® en combinación con rHuPH20. Este ejemplo demuestra que la insulina lispro Humalog® por co-administración con una enzima degradante de hialuronano (rHuPH20) se convirtió en una insulina de acción súper rápida como se describe en el presente documento.

**Tabla 7. Farmacocinética de la insulina después de inyección subcutánea de insulina lispro Humalog® con y sin co-administración de rHuPH20**

| Tratamiento              | Sujeto ID | C <sub>máx</sub> (pmol/l) | t <sub>máx</sub> (pmol/l) | ABC <sub>0-360</sub> (min*pmol/l) | F <sub>rel</sub> |
|--------------------------|-----------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------|
| Humalog® solamente       | 1         | 590                       | 105                       | 136000                            |                  |
|                          | 2         | 496                       | 57                        | 126000                            |                  |
|                          | 3         | 562                       | 105                       | 106000                            |                  |
|                          | 4         | 721                       | 90                        | 150000                            |                  |
|                          | 5         | 972                       | 54                        | 154000                            |                  |
|                          | 6         | 449                       | 150                       | 105000                            |                  |
|                          | 7         | 1770                      | 39                        | 174000                            |                  |
|                          | 8         | 795                       | 75                        | 156000                            |                  |
|                          | 9         | 672                       | 120                       | 138000                            |                  |
|                          | 10        | 502                       | 120                       | 113000                            |                  |
|                          | 11        | 851                       | 105                       | 183000                            |                  |
|                          | 12        | 631                       | 150                       | 160000                            |                  |
|                          | N         | 12                        | 12                        | 12                                |                  |
|                          | Media     | 751                       | 98                        | 142000                            |                  |
| DT                       | 357       | 36                        | 25600                     |                                   |                  |
| Mediana                  | 652       | 105                       | 144000                    |                                   |                  |
| Media Geométrica         | 697       | 91                        | 139000                    |                                   |                  |
| Media Geométrica de % CV | 38,8      | 44                        | 18,8                      |                                   |                  |
| Humalog® con rHuPH20     | 1         | 1090                      | 54                        | 192000                            | 141              |
|                          | 2         | 1310                      | 57                        | 161000                            | 128              |
|                          | 3         | 1640                      | 48                        | 172000                            | 162              |
|                          | 4         | 853                       | 48                        | 146000                            | 97               |
|                          | 5         | 1140                      | 45                        | 130000                            | 84               |
|                          | 6         | 971                       | 57                        | 139000                            | 132              |
|                          | 7         | 2000                      | 30                        | 152000                            | 87               |
|                          | 8         | 2420                      | 48                        | 186000                            | 119              |
|                          | 9         | 1320                      | 45                        | 135000                            | 98               |
|                          | 10        | 930                       | 57                        | 123000                            | 109              |
|                          | 11        | 1590                      | 39                        | 189000                            | 103              |
|                          | 12        | 1080                      | 48                        | 179000                            | 112              |
|                          | N         | 12                        | 12                        | 12                                | 12               |
|                          | Media     | 1360                      | 48                        | 159000                            | 114              |
| DT                       | 473       | 8                         | 24500                     | 23                                |                  |
| Mediana                  | 1230      | 48                        | 157000                    | 110                               |                  |
| Media Geométrica         | 1300      | 47                        | 157000                    | 112                               |                  |

| Tratamiento | Sujeto ID                | C <sub>máx</sub> (pmol/l) | t <sub>máx</sub> (pmol/l) | ABC <sub>0-360</sub> (min*pmol/l) | F <sub>rel</sub> |
|-------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------|
|             | Media Geométrica de % CV | 32,8                      | 19                        | 15,7                              |                  |

Tabla 8. ABC de intervalo temporal en la media geométrica de las concentraciones de insulina para insulina lispro Humalog® sola o co-administrada con rHuPH20

| Intervalo temporal | ABC (min*pmol/l)   |                      |                                       |
|--------------------|--------------------|----------------------|---------------------------------------|
|                    | Humalog® solamente | Humalog® con rHuPH20 | Porcentaje de diferencia <sup>a</sup> |
| 0-15               | 1287               | 2197                 | 70,7                                  |
| 0-21               | 2104               | 4271                 | 103,0                                 |
| 0-30               | 3879               | 9895                 | 155,1                                 |
| 0-45               | 9344               | 24903                | 166,5                                 |
| 0-60               | 16954              | 40172                | 136,9                                 |
| 0-75               | 24923              | 54335                | 118,0                                 |
| 0-90               | 33193              | 67077                | 102,1                                 |
| 0-120              | 50026              | 87300                | 74,5                                  |
| 0-150              | 66052              | 101781               | 54,1                                  |
| 0-180              | 80650              | 112610               | 39,6                                  |
| 0-360              | 134867             | 149523               | 10,8                                  |

<sup>a</sup>Porcentaje de diferencia:  $(ABC_{0-x} [rHuPH20] - ABC_{0-x} [sin rHuPH20]) / (ABC_{0-x} [sin rHuPH20])$

5 Tabla 9. Efecto de la secuencia de dosificación de insulina lispro Humalog® en la farmacocinética observada.

| Tratamiento                                       | Secuencia de dosificación | C <sub>máx</sub> | t <sub>máx</sub> | ABC <sub>todas</sub> |        |        |
|---|---------------------------|------------------|------------------|----------------------|--------|--------|
| Humalog®  | 1                         | media            | 688              | 94                   | 140000 |        |
|   |                           | DT               | 172              | 38                   | 21000  |        |
|   |                           | ET               | 70               | 16                   | 8600   |        |
|   | 2                         | media            | 814              | 102                  | 143500 |        |
|   |                           | DT               | 491              | 37                   | 31600  |        |
|   |                           | ET               | 200              | 15                   | 12900  |        |
|   | Todas                     | media            | 751              | 98                   | 141800 |        |
|   |                           | DT               | 357              | 36                   | 25700  |        |
|   |                           | ET               | 103              | 10                   | 7400   |        |
|   | Humalog® con rHuPH20      | 1                | media            | 1239                 | 48     | 156800 |
|   |                           |                  | DT               | 456                  | 11     | 27800  |
|   |                           |                  | ET               | 186                  | 4      | 11400  |
| 2   |                           | media            | 1485             | 49                   | 160500 |        |
|   |                           | DT               | 498              | 4                    | 23300  |        |
|   |                           | ET               | 203              | 2                    | 9500   |        |
| Todas   |                           | media            | 1362             | 48                   | 158700 |        |
|   |                           | DT               | 473              | 8                    | 24500  |        |
|   |                           | ET               | 137              | 2                    | 7100   |        |
| <b>p-valor de la diferencia de tratamiento</b>    |                           | 0,0003           | 0,0006           | 0,0760               |        |        |
| <b>p-valor del efecto del grupo de secuencias</b> |                           | 0,7889           | 0,7783           | 0,9948               |        |        |

2. Efecto de la co-administración de rHuPH20 e insulina Humulin® R en la farmacocinética de la insulina

En el estadio 2, los pacientes recibieron primero la dosis de insulina Humulin® R/rHuPH20 y segundo la dosis de insulina Humulin® R sola, o bien primero la dosis de insulina Humulin® R sola y después la dosis de insulina Humulin® R/rHuPH20 habitualmente 7 días después. La concentración de la insulina en cada punto temporal después de la administración de insulina Humulin® R o insulina Humulin® R co-administrada con rHuPH20 se proporciona en las Tablas 10 y 11, respectivamente. La ABC para los diferentes intervalos temporales (es decir ABC para de 0 a x minutos (ABC<sub>(0-x)</sub>); por ejemplo ABC<sub>0-3 minutos</sub>, ABC<sub>0-6 minutos</sub>, ABC<sub>0-9 minutos</sub>, etc.), (Tablas 10, 11 y 12), así como la biodisponibilidad relativa (F<sub>rel</sub>) que se calcula como la  $[ABC_{0-x} (insulina Humulin® R/rHuPH20)] / [ABC_{0-x} (insulina Humulin® R sola)] * 100$ . También se presenta la pendiente creciente, que se determina calculando el cambio en la media geométrica de los niveles de insulina durante un intervalo temporal, así como el cambio de pendiente medio, que es un promedio suavizado de cinco valores de la pendiente creciente.

**Tabla 10. Concentración de insulina en sangre después de la administración de insulina Humulin® R**

| Insulina inmunorreactiva (pmol/l) |       |         |       |      |            |                     |           |                                |
|-----------------------------------|-------|---------|-------|------|------------|---------------------|-----------|--------------------------------|
| Tiempo (min)                      | Media | Mediana | DT    | ET   | Media Geo. | Pendiente creciente | ABC (0-x) | Cambio de pendiente (promedio) |
| 0                                 | 67,4  | 59,2    | 29,8  | 8,3  | 62,4       |                     |           |                                |
| 3                                 | 62,3  | 59,5    | 26,9  | 7,5  | 58,3       | -1,38               | 181       |                                |
| 6                                 | 70,3  | 62,8    | 29,7  | 8,2  | 65,4       | 2,37                | 366       |                                |
| 9                                 | 70,1  | 64,9    | 26,1  | 7,2  | 66,0       | 0,22                | 564       | 0,75                           |
| 12                                | 71,1  | 66,3    | 28,8  | 8,0  | 66,5       | 0,15                | 762       | 1,72                           |
| 15                                | 79,2  | 74,8    | 32,3  | 9,0  | 73,6       | 2,38                | 973       | 2,18                           |
| 18                                | 89,8  | 86,8    | 34,2  | 9,5  | 84,1       | 3,47                | 1209      | 3,29                           |
| 21                                | 104,2 | 103,4   | 36,5  | 10,1 | 98,1       | 4,68                | 1482      | 4,92                           |
| 24                                | 123,3 | 130,5   | 46,1  | 13,9 | 115,3      | 5,75                | 1802      | 6,39                           |
| 27                                | 149,8 | 143,2   | 57,6  | 16,0 | 140,2      | 8,3                 | 2186      | 7,59                           |
| 30                                | 179,4 | 171,3   | 59,6  | 16,5 | 169,5      | 9,75                | 2650      | 7,45                           |
| 33                                | 208,9 | 202,8   | 69,9  | 19,4 | 198,0      | 9,5                 | 3202      | 8,02                           |
| 36                                | 223,9 | 238,6   | 79,6  | 22,1 | 209,9      | 3,97                | 3813      | 7,30                           |
| 39                                | 248,3 | 231,6   | 78,7  | 21,8 | 235,6      | 8,57                | 4482      | 6,12                           |
| 42                                | 261,4 | 265,9   | 79,7  | 22,1 | 249,8      | 4,74                | 5210      | 4,57                           |
| 45                                | 272,3 | 274,1   | 78,1  | 21,7 | 261,2      | 3,81                | 5976      | 3,90                           |
| 48                                | 279,8 | 280,0   | 87,6  | 24,3 | 266,6      | 1,78                | 6768      | 3,00                           |
| 51                                | 278,6 | 262,5   | 77,2  | 21,4 | 268,4      | 0,59                | 7570      | 3,04                           |
| 54                                | 292,2 | 255,0   | 84,3  | 23,4 | 280,5      | 4,06                | 8394      | 2,49                           |
| 57                                | 313,7 | 278,3   | 110,6 | 30,7 | 295,4      | 4,95                | 9258      |                                |
| 60                                | 316,2 | 280,3   | 111,2 | 30,8 | 298,6      | 1,05                | 10149     |                                |
| 75                                | 349,0 | 320,4   | 132,7 | 36,8 | 325,5      | 1,79                | 14829     |                                |
| 90                                | 358,0 | 298,9   | 152,1 | 42,2 | 329,5      | 0,27                | 19741     |                                |
| 105                               | 364,8 | 363,6   | 128,5 | 35,6 | 344,9      | 1,03                | 24798     |                                |
| 120                               | 372,9 | 339,6   | 111,2 | 30,8 | 358,8      | 0,92                | 30076     |                                |
| 135                               | 400,8 | 402,8   | 123,6 | 34,3 | 382,6      | 1,59                | 35636     |                                |
| 150                               | 423,1 | 490,9   | 165,2 | 45,8 | 391,9      | 0,62                | 41445     |                                |
| 165                               | 423,9 | 424,9   | 164,1 | 45,5 | 392,6      | 0,04                | 47329     |                                |
| 180                               | 412,6 | 447,9   | 148,0 | 41,1 | 386,2      | -0,43               | 53169     |                                |
| 240                               | 336,0 | 309,9   | 90,4  | 26,1 | 325,8      | -1,01               | 74528     |                                |
| 300                               | 308,6 | 292,8   | 77,0  | 21,4 | 299,7      | -0,43               | 93292     |                                |
| 360                               | 242,9 | 238,7   | 64,5  | 17,9 | 234,5      | -1,09               | 109319    |                                |

**Tabla 11. Concentración de insulina en sangre después de co-administración de insulina Humulin® R y rHuPH20**

| Insulina inmunorreactiva (pmol/l) |       |         |       |      |            |                     |           |                                |                  |
|-----------------------------------|-------|---------|-------|------|------------|---------------------|-----------|--------------------------------|------------------|
| Tiempo (min)                      | Media | Mediana | DT    | ET   | Media Geo. | Pendiente creciente | ABC (0-x) | Cambio de pendiente (promedio) | F <sub>rel</sub> |
| 0                                 | 55,0  | 56,9    | 14,6  | 4,1  | 53,2       |                     |           |                                |                  |
| 3                                 | 94,7  | 95,6    | 20,3  | 5,6  | 92,5       | 13,08               | 219       |                                | 121              |
| 6                                 | 148,3 | 142,9   | 40,6  | 11,3 | 141,7      | 16,42               | 570       |                                | 156              |
| 9                                 | 194,2 | 174,7   | 43,7  | 12,1 | 189,9      | 16,07               | 1067      | 13,2                           | 189              |
| 12                                | 223,1 | 227,3   | 66,1  | 18,3 | 213,2      | 7,76                | 1672      | 16,3                           | 219              |
| 15                                | 262,2 | 250,1   | 75,6  | 21,0 | 251,3      | 12,69               | 2369      | 16,67                          | 244              |
| 18                                | 352,8 | 331,6   | 108,1 | 30,0 | 336,9      | 28,54               | 3251      | 17,25                          | 269              |
| 21                                | 402,0 | 381,5   | 96,6  | 26,8 | 391,7      | 18,27               | 4344      | 18,16                          | 293              |
| 24                                | 463,7 | 437,6   | 126,5 | 38,1 | 448,6      | 18,97               | 5605      | 10,86                          | 311              |
| 27                                | 504,5 | 506,6   | 135,6 | 37,6 | 485,6      | 12,33               | 7006      | 17,39                          | 321              |
| 30                                | 492,0 | 477,1   | 210,5 | 58,4 | 414,3      | -23,79              | 8356      | 17,64                          | 315              |
| 33                                | 614,5 | 620,5   | 146,8 | 40,7 | 597,8      | 61,16               | 9874      | 14,5                           | 308              |
| 36                                | 675,7 | 676,6   | 167,1 | 46,3 | 656,3      | 19,51               | 11755     | 19,13                          | 308              |
| 39                                | 690,4 | 649,8   | 194,2 | 53,9 | 666,1      | 3,28                | 13739     | 21,57                          | 307              |
| 42                                | 805,2 | 786,4   | 244,9 | 67,9 | 772,6      | 35,49               | 15897     | 12,53                          | 305              |
| 45                                | 772,3 | 741,5   | 235,2 | 65,2 | 737,9      | -11,57              | 18162     | 11,13                          | 304              |
| 48                                | 809,8 | 811,3   | 204,4 | 56,7 | 785,7      | 15,95               | 20448     | 10,65                          | 302              |
| 51                                | 847,7 | 822,0   | 209,2 | 58,0 | 823,2      | 12,5                | 22861     | 6,13                           | 302              |
| 54                                | 854,1 | 800,2   | 222,3 | 61,6 | 825,9      | 0,88                | 25335     | 5,77                           | 302              |
| 57                                | 894,5 | 840,2   | 242,6 | 67,3 | 864,5      | 12,87               | 27870     |                                | 301              |



| Insulina inmunorreactiva (pmol/l) |       |         |       |      |            |                     |           |                                |                  |
|-----------------------------------|-------|---------|-------|------|------------|---------------------|-----------|--------------------------------|------------------|
| Tiempo (min)                      | Media | Mediana | DT    | ET   | Media Geo. | Pendiente creciente | ABC (0-x) | Cambio de pendiente (promedio) | F <sub>rel</sub> |
| 60                                | 852,3 | 818,3   | 229,2 | 63,6 | 824,4      | -13,37              | 30404     |                                | 300              |
| 75                                | 916,8 | 937,5   | 226,5 | 62,8 | 890,9      | 4,44                | 43268     |                                | 292              |
| 90                                | 835,2 | 858,4   | 269,4 | 74,7 | 796,4      | -6,3                | 55923     |                                | 283              |
| 105                               | 774,9 | 692,0   | 314,6 | 87,2 | 703,0      | -6,23               | 67169     |                                | 271              |
| 120                               | 666,1 | 650,6   | 248,7 | 69,0 | 620,1      | -5,53               | 77092     |                                | 256              |
| 135                               | 599,7 | 557,3   | 233,7 | 64,8 | 550,2      | -4,66               | 85868     |                                | 241              |
| 150                               | 573,9 | 514,9   | 185,5 | 51,5 | 549,5      | -0,05               | 94116     |                                | 227              |
| 165                               | 522,3 | 452,2   | 166,8 | 46,3 | 500,2      | -3,29               | 101988    |                                | 215              |
| 180                               | 446,2 | 445,7   | 100,7 | 27,9 | 435,6      | -4,31               | 109007    |                                | 205              |
| 240                               | 250,5 | 255,7   | 61,2  | 17,7 | 243,1      | -3,21               | 129369    |                                | 174              |
| 300                               | 172,7 | 161,0   | 62,8  | 17,4 | 161,3      | -1,36               | 141501    |                                | 152              |
| 360                               | 115,5 | 123,6   | 36,9  | 10,2 | 109,2      | -0,87               | 149614    |                                | 137              |

Tabla 12. ABC de intervalo temporal en la media geométrica de concentraciones de insulina para insulina Humulin® R sola o co-administrada con rHuPH20

| Intervalo temporal | ABC (min*pmol/l)     |                        |                                       |
|--------------------|----------------------|------------------------|---------------------------------------|
|                    | Humulin® R solamente | Humulin® R con rHuPH20 | Porcentaje de diferencia <sup>a</sup> |
| 0-15               | 973                  | 2369                   | 143,5                                 |
| 0-21               | 1482                 | 4344                   | 193,1                                 |
| 0-30               | 2650                 | 8356                   | 215,3                                 |
| 0-45               | 5976                 | 18162                  | 203,9                                 |
| 0-60               | 10149                | 30404                  | 199,6                                 |
| 0-75               | 14829                | 43268                  | 191,8                                 |
| 0-90               | 19741                | 55923                  | 183,3                                 |
| 0-120              | 30076                | 77092                  | 156,3                                 |
| 0-150              | 41445                | 94116                  | 127,1                                 |
| 0-180              | 53169                | 109007                 | 105,0                                 |
| 0-360              | 109319               | 149614                 | 36,9                                  |

<sup>a</sup>Porcentaje de diferencia:  $(ABC_{0-x} [rHuPH20] - ABC_{0-x} [sin rHuPH20]) / (ABC_{0-x} [sin rHuPH20])$

### 5 3. Comparación de la farmacocinética de insulina Humalog® e insulina Humulin® R con y sin co-administración de rHuPH20

Se compararon las farmacocinéticas de insulina Humalog® e insulina Humulin® R con y sin co-administración de rHuPH20. La Figura 1 presenta una representación de la media geométrica (para todos los sujetos para cada composición) de las concentraciones de insulina en cada intervalo temporal. Tanto para Humalog® como para Humulin® R, las curvas de concentración-tiempo se desplazaron hacia arriba (mayores concentraciones de insulina) y a la izquierda (tiempos más rápidos). Por ejemplo, la media geométrica de la concentración de insulina máxima (C<sub>máx</sub>) casi se duplicó (hasta 1200 desde 697 pmol/l) para Humalog® y aumentaron más del doble (hasta 967 desde 433 pmol/l) para Humulin® R en presencia de rHuPH20 en relación con el control. De forma similar, la mediana del tiempo para alcanzar esta concentración máxima (t<sub>máx</sub>) se redujo (de 105 a 48 minutos) para Humalog® y (de 165 a 60 minutos) para Humulin® R en presencia de rHuPH20 en relación con el control. Este desplazamiento a concentraciones más altas en puntos temporales más tempranos es coherente con una velocidad de absorción aumentada y una velocidad de eliminación constante. Por lo tanto, la co-administración de rHuPH20 aumentó la velocidad de absorción tanto de insulina lispro Humalog®, un análogo de insulina de acción rápida, como de insulina Humulin® R, una insulina regular de acción rápida.

La respuesta de insulina prandial natural incluye una embolada inmediata que se produce durante los primeros 10-15 minutos después de comer. Este aumento rápido de los niveles de insulina proporciona una señal fisiológica importante que da como resultado la detención de la liberación de glucosa hepática a la circulación sistémica. Por lo tanto, la elevación en la concentración de insulina durante 15 minutos es un parámetro particularmente importante. Los datos presentados anteriormente demuestran que la media geométrica de las concentraciones de insulina lispro 15 minutos después de la administración de Humalog® aumentan 70 % desde sus niveles pre-administración (de 65 a 112 pmol/l) sin rHuPH20, pero tras la co-administración con rHuPH20, la concentración aumenta más del cuádruple (de 64 a 264 pmol/l). De forma aún más drástica, la media geométrica de la concentración de insulina aumenta de forma solamente ligera (de 62 a 74 pmol/l) para Humulin® R administrada sin rHuPH20, pero de nuevo aumenta más del cuádruple (53 a 251 pmol/l) cuando se co-administra con rHuPH20. Por lo tanto la co-administración con rHuPH20 proporciona un aumento rápido en las concentraciones de insulina que representa mejor la respuesta de insulina prandial fisiológica temprana en individuos sanos.

La respuesta prandial natural continúa durante aproximadamente 2 horas y proporciona control glucémico para carbohidratos en el momento de la comida, y por lo tanto, la exposición a insulina sistémica acumulativa durante aproximadamente las primeras 2 horas es otro parámetro particularmente importante. De acuerdo con los datos proporcionados en el presente documento, el área acumulativa bajo la curva de la media geométrica de insulina durante las primeras dos horas ( $ABC_{0-120}$ ) aumentó (de 50.000 a 87.000  $\text{min} \cdot \text{pmol/l}$ ) para Humalog<sup>®</sup> y (de 30.000 a 77.000  $\text{min} \cdot \text{pmol/l}$ ) para Humulin<sup>®</sup> R en presencia de rHuPH20 en relación con el control. De forma similar, la respuesta prandial natural se completa eficazmente a las aproximadamente 4 horas después de una comida, y la exposición a insulina en momentos postprandiales puede conducir a excursiones hipoglucémicas. La exposición correspondiente de 4 hasta las últimas observaciones a las 6 horas ( $ABC_{240-360}$ ) se redujo (de 31.000 a 20.000  $\text{min} \cdot \text{pmol/l}$ ) para Humalog<sup>®</sup> y (de 35.000 a 20.000  $\text{min} \cdot \text{pmol/l}$ ) para Humulin<sup>®</sup> R en presencia de rHuPH20 en relación con el control. Por lo tanto, la co-administración con rHuPH20 aumentó la exposición a insulina deseable en 175 y 256 % y redujo la exposición a insulina no deseable en 67 y 58 %, respectivamente para co-administración con rHuPH20 en relación con el control.

La variabilidad entre pacientes en la farmacocinética de la administración de insulina requiere que los médicos introduzcan a los pacientes la terapia de insulina a niveles subterapéuticos y aumenten progresivamente la dosis para evitar una sobredosificación de un paciente y que se arriesguen a un acontecimiento hipoglucémico. La variabilidad en la farmacocinética puede expresarse como el coeficiente de variación (CV; definido como la desviación típica/media típicamente expresada como porcentaje) para parámetros clave. El CV de la concentración máxima ( $C_{\text{máx}}$ ) comparada entre sujetos se redujo (del 48 % al 35 %) para Humalog<sup>®</sup> y (del 34 % al 26 %) para Humulin<sup>®</sup> R en presencia de rHuPH20 en relación con el control. El CV del tiempo hasta la concentración máxima ( $t_{\text{máx}}$ ) se redujo (del 48 % al 35 %) para Humalog<sup>®</sup> y (del 32 % al 28 %) para Humulin<sup>®</sup> R en presencia de rHuPH20 en relación con el control. Los datos anteriores demuestran que el CV del cambio en la concentración de insulina durante los primeros 15 minutos después de la administración se redujo (del 147 % al 141 %) para Humalog<sup>®</sup> y (del 165 % al 40 %) para Humulin<sup>®</sup> R en presencia de rHuPH20 en relación con el control. El CV de la exposición a insulina acumulativa durante las primeras 2 horas ( $ABC_{0-120}$ ) se redujo (del 41 % al 22 %) para Humalog<sup>®</sup> y (del 34 % al 26 %) para Humulin<sup>®</sup> R en presencia de rHuPH20 en relación con el control. Por lo tanto, la variabilidad entre pacientes de la farmacocinética de insulina se redujo para insulina cuando se co-administró con rHuPH20 en relación con el control.

La farmacocinética para insulina Humulin<sup>®</sup> R se mejoró por co-administración de rHuPH20 por lo que la farmacocinética se asemejó sustancialmente al perfil farmacocinético de insulina lispro Humalog<sup>®</sup> cuando se co-administró con rHuPH20. En particular, la velocidad de absorción de insulina y los niveles en suero de insulina durante los primeros 20 minutos fueron comparables entre los dos tipos diferentes de insulina cuando se co-administraron con rHuPH20 (refiérase a las Tablas 9 y 13). Por el contrario, cuando se administró sin rHuPH20, la insulina Humulin<sup>®</sup> R muestra una velocidad mucho más lenta y nivel de absorción reducido en comparación con insulina lispro Humalog<sup>®</sup> en los intervalos temporales tempranos. Por lo tanto, la combinación de rHuPH20, una enzima degradante de hialuronano, y una insulina de acción rápida da como resultado composiciones que actúan más rápido y en un mayor grado que la insulina de acción rápida sola y, para tiempos tempranos (es decir menos de 20 minutos después de la administración), sustancialmente independiente del tipo de insulina de acción rápida.

#### **D. Efecto de la co-administración de rHuPH20 en la farmacodinámica de la velocidad de infusión de glucosa (GIR)**

Para evaluar el efecto farmacodinámico que la co-administración con rHuPH20 tiene en la velocidad de infusión de glucosa (GIR) se determinaron diversos parámetros farmacodinámicos (o glucodinámicos (GD)) para sujetos a los que se dosificó Humulin<sup>®</sup> R con y sin rHuPH20. Estos incluían el tiempo hasta el efecto máximo ( $t_{\text{GIR}_{\text{máx}}}$ ) (minutos); el tiempo hasta el efecto semi-máximo tardío ( $t_{\text{GIR}_{50\% \text{ tardío}}}$ ) (minutos); el tiempo hasta el efecto semi-máximo temprano ( $t_{\text{GIR}_{50\% \text{ temprano}}}$ ) (minutos); el efecto metabólico máximo ( $\text{GIR}_{\text{máx}}$ ) (ml/h);  $\text{ABC-GIR}_{0-60 \text{ min}}$ ;  $\text{ABC-GIR}_{0-120 \text{ min}}$ ;  $\text{ABC-GIR}_{0-180 \text{ min}}$ ;  $\text{ABC-GIR}_{0-240 \text{ min}}$ ;  $\text{ABC-GIR}_{0-300 \text{ min}}$ ; y el  $\text{ABC-GIR}_{0-360 \text{ min}}$ . Se expresó GIR como mililitros de dextrosa infundidos por hora (ml/h), que puede convertirse a mg/kg/min usando lo siguiente:

$$\text{GIR (mg/kg/min)} = [\text{velocidad de infusión IV (ml/h)} \times \text{concentración de dextrosa (g/dl)} \times 0,0167 / \text{masa de los sujetos (kg)},$$

donde la concentración de dextrosa = 190,6 mg/ml.

#### **1. Efecto de la co-administración de rHuPH20 e insulina Humalog<sup>®</sup> en la farmacodinámica de GIR**

La velocidad de infusión de glucosa para cada intervalo temporal después de la administración de insulina lispro Humalog<sup>®</sup> sola o insulina lispro Humalog<sup>®</sup>/rHuPH20 se calculó y se presenta en las Tablas 13 y 14, respectivamente. También se calculó la ABC (proporcional a la administración de glucosa acumulativa) y la ABC relativa ( $F_{\text{rel}}$ ). También se presenta la pendiente creciente, que se determina calculando el cambio de GIR durante un intervalo temporal.

Tabla 13. Velocidades de infusión de glucosa después de administración de insulina lispro Humalog®

| GIR (Velocidad de infusión IV, ml/h) |              |                |           |           |                                |                     |
|--------------------------------------|--------------|----------------|-----------|-----------|--------------------------------|---------------------|
| Tiempo (min)                         | Media (ml/h) | Mediana (ml/h) | DT (ml/h) | ET (ml/h) | Pendiente creciente (ml/h*min) | ABC(0-x) (min*ml/h) |
| 0                                    | 3,1          | 0              | 7,4       | 2,1       |                                |                     |
| 3                                    | 8,4          | 0              | 13,6      | 3,9       | 1,78                           | 17                  |
| 6                                    | 9,8          | 0              | 16,3      | 4,7       | 0,44                           | 45                  |
| 9                                    | 10,8         | 0              | 16,0      | 4,6       | 0,36                           | 75                  |
| 12                                   | 10,8         | 0              | 16,0      | 4,6       | 0                              | 108                 |
| 15                                   | 11,0         | 0              | 16,4      | 4,7       | 0,06                           | 141                 |
| 18                                   | 11,3         | 0              | 17,1      | 4,9       | 0,08                           | 174                 |
| 21                                   | 14,1         | 9,0            | 16,3      | 4,7       | 0,94                           | 212                 |
| 24                                   | 15,9         | 13,0           | 15,9      | 4,6       | 0,61                           | 257                 |
| 27                                   | 20,9         | 20,5           | 19,7      | 5,7       | 1,67                           | 312                 |
| 30                                   | 24,3         | 22,0           | 20,4      | 5,9       | 1,11                           | 380                 |
| 33                                   | 29,7         | 29,5           | 16,2      | 4,7       | 1,81                           | 461                 |
| 36                                   | 35,8         | 37,5           | 18,0      | 5,2       | 2,03                           | 559                 |
| 39                                   | 42,0         | 39,5           | 20,3      | 5,9       | 2,08                           | 676                 |
| 42                                   | 50,1         | 46,0           | 27,3      | 7,9       | 2,69                           | 814                 |
| 45                                   | 55,7         | 48,0           | 32,9      | 9,5       | 1,86                           | 972                 |
| 48                                   | 63,0         | 55,5           | 37,2      | 10,7      | 2,44                           | 1150                |
| 51                                   | 68,3         | 57,5           | 42,0      | 12,1      | 1,75                           | 1347                |
| 54                                   | 76,6         | 69,0           | 53,2      | 15,4      | 2,78                           | 1565                |
| 57                                   | 85,7         | 75,5           | 69,4      | 20,0      | 3,03                           | 1808                |
| 60                                   | 97,7         | 82,5           | 90,0      | 26,0      | 4                              | 2083                |
| 75                                   | 112,3        | 80,0           | 77,2      | 22,3      | 0,97                           | 3657                |
| 90                                   | 130,7        | 93,0           | 77,3      | 22,3      | 1,23                           | 5479                |
| 105                                  | 142,3        | 114,0          | 73,0      | 21,1      | 0,78                           | 7527                |
| 120                                  | 155,3        | 122,0          | 79,7      | 23,0      | 0,86                           | 9759                |
| 135                                  | 166,4        | 143,5          | 76,1      | 22,0      | 0,74                           | 12171               |
| 150                                  | 170,7        | 148,0          | 75,4      | 21,8      | 0,28                           | 14699               |
| 165                                  | 175,8        | 151,5          | 74,6      | 21,5      | 0,34                           | 17297               |
| 180                                  | 178,4        | 162,5          | 73,8      | 21,3      | 0,18                           | 19954               |
| 240                                  | 184,9        | 167,0          | 88,3      | 25,5      | 0,11                           | 30854               |
| 300                                  | 141,3        | 130,0          | 67,4      | 19,4      | -0,73                          | 40641               |
| 360                                  | 110,3        | 105,0          | 50,8      | 14,7      | -0,52                          | 48191               |

Tabla 14. Velocidades de infusión de glucosa después de co-administración de insulina lispro Humalog® y rHuPH20

| GIR (Velocidad de infusión IV) |              |                |           |           |                                |                     |                      |
|--------------------------------|--------------|----------------|-----------|-----------|--------------------------------|---------------------|----------------------|
| Tiempo (min)                   | Media (ml/h) | Mediana (ml/h) | DT (ml/h) | ET (ml/h) | Pendiente creciente (ml/h*min) | ABC(0-x) (min*ml/h) | F <sub>rel</sub> (%) |
| 0                              | 5,4          | 0              | 9         | 2,6       |                                |                     |                      |
| 3                              | 8,8          | 0              | 13,5      | 3,9       | 1,15                           | 21                  | 124                  |
| 6                              | 15,8         | 10             | 18,1      | 5,2       | 2,31                           | 58                  | 131                  |
| 9                              | 11,8         | 0              | 14,8      | 4,3       | -1,31                          | 100                 | 132                  |
| 12                             | 13,6         | 0              | 17,2      | 5,0       | 0,58                           | 138                 | 128                  |
| 15                             | 17,0         | 10             | 18,6      | 5,6       | 1,14                           | 184                 | 131                  |
| 18                             | 20,9         | 25             | 19,1      | 5,8       | 1,3                            | 240                 | 138                  |
| 21                             | 26,3         | 27             | 23,6      | 7,1       | 1,79                           | 311                 | 147                  |
| 24                             | 33,8         | 29,5           | 27,1      | 7,8       | 2,52                           | 401                 | 156                  |
| 27                             | 43,9         | 40             | 32,7      | 9,4       | 3,36                           | 518                 | 166                  |
| 30                             | 53,8         | 49,5           | 36,2      | 10,5      | 3,31                           | 665                 | 175                  |
| 33                             | 68,1         | 59             | 43,5      | 12,6      | 4,75                           | 847                 | 184                  |
| 36                             | 82,1         | 68,5           | 49,4      | 14,3      | 4,67                           | 1073                | 192                  |
| 39                             | 104,0        | 80             | 64,5      | 18,6      | 7,31                           | 1352                | 200                  |
| 42                             | 115,5        | 89             | 64,7      | 18,7      | 3,83                           | 1681                | 207                  |
| 45                             | 127,9        | 96,5           | 64,1      | 18,5      | 4,14                           | 2046                | 210                  |
| 48                             | 134,8        | 104            | 66,8      | 19,3      | 2,31                           | 2440                | 212                  |
| 51                             | 142,6        | 107,5          | 72,1      | 20,8      | 2,58                           | 2856                | 212                  |
| 54                             | 145,8        | 112            | 70,6      | 20,4      | 1,08                           | 3289                | 210                  |

| GIR (Velocidad de infusión IV) |        |         |      |            |                     |            |                  |
|--------------------------------|--------|---------|------|------------|---------------------|------------|------------------|
| Tiempo                         | Media  | Mediana | DT   | ET         | Pendiente creciente | ABC(0-x)   | F <sub>rel</sub> |
| (min)                          | (ml/h) |         |      | (ml/h*min) |                     | (min*ml/h) | (%)              |
| 57                             | 146,8  | 121     | 60,7 | 17,5       | 0,31                | 3728       | 206              |
| 60                             | 159,2  | 124,5   | 71,1 | 20,5       | 4,14                | 4187       | 201              |
| 75                             | 174,6  | 138,5   | 84,8 | 24,5       | 1,03                | 6690       | 183              |
| 90                             | 186,3  | 176     | 77,0 | 22,2       | 0,78                | 9397       | 172              |
| 105                            | 182,3  | 147     | 78,9 | 22,8       | -0,27               | 12162      | 162              |
| 120                            | 180,2  | 131,5   | 83,5 | 24,1       | -0,14               | 14881      | 152              |
| 135                            | 183,8  | 132     | 88,8 | 25,6       | 0,24                | 17611      | 145              |
| 150                            | 184,8  | 139     | 87,1 | 25,2       | 0,06                | 20375      | 139              |
| 165                            | 185,0  | 143,5   | 88,8 | 25,6       | 0,02                | 23148      | 134              |
| 180                            | 181,8  | 139,5   | 85,1 | 24,6       | -0,22               | 25899      | 130              |
| 240                            | 139,7  | 129,5   | 75,1 | 21,7       | -0,7                | 35541      | 115              |
| 300                            | 98,6   | 85      | 61,2 | 17,7       | -0,68               | 42689      | 105              |
| 360                            | 87,7   | 65      | 62,6 | 18,1       | -0,18               | 48276      | 100              |

La GIR<sub>máx</sub>, t<sub>máx</sub> y AUG-GIR para diversos intervalos temporales también se determinaron para estos sujetos y se presentan en las Tablas 15 y 16. La Tabla 17 proporciona un sumario de los parámetros PD para cada secuencia de dosificación (por ejemplo GIR PD para insulina lispro Humalog®/rHuPH20 administrada 1ª (1) o 2ª (2) y ambas (todas), y un análisis estadístico para determinar si la secuencia de dosificación afectaba a la farmacodinámica observada. El análisis estadístico determinó el p-valor de la diferencia en la PD observada usando los grupos de tratamiento diferentes (es decir, insulina lispro Humalog® sola frente a insulina lispro Humalog®/rHuPH20) y la diferencia en la PK usando las diferentes secuencias de dosificación (es decir insulina lispro Humalog® sola primera y después la insulina lispro Humalog®/rHuPH20, frente a insulina lispro Humalog®/rHuPH20 primero y después insulina lispro Humalog® sola).

**Tabla 15. Farmacodinámica de la insulina después de la inyección de insulina lispro Humalog® subcutánea con y sin co-administración de rHuPH20**

| Tratamiento           | Sujeto ID                 | GIR <sub>máx</sub> | 50 % de GIR <sub>máx</sub> | tGIR <sub>50 % temprano</sub><br>(min) | tGIR <sub>50 % tardío</sub><br>(min) |     |
|-----------------------|---------------------------|--------------------|----------------------------|--|--------------------------------------|-----|
| Humalog®<br>solamente | 1                         | 137                | 68,5                       | 83                                     | NC                                   |     |
|                       | 2                         | 326                | 163                        | 98                                     | NC                                   |     |
|                       | 3                         | 247                | 124                        | 68                                     | NC                                   |     |
|                       | 4                         | 178                | 89,0                       | 83                                     | NC                                   |     |
|                       | 5                         | 119                | 59,5                       | 68                                     | 330                                  |     |
|                       | 6                         | 158                | 79,0                       | 98                                     | NC                                   |     |
|                       | 7                         | 350                | 175                        | 53                                     | 270                                  |     |
|                       | 8                         | 90,0               | 45,0                       | 47                                     | NC                                   |     |
|                       | 9                         | 115                | 57,5                       | 83                                     | 330                                  |     |
|                       | 10                        | 180                | 90,0                       | 68                                     | 330                                  |     |
|                       | 11                        | 132                | 66,0                       | 56                                     | NC                                   |     |
|                       | 12                        | 382                | 191                        | 68                                     | 330                                  |     |
|                       | N                         | 12                 | 12                         | 12                                     | 5                                    |     |
|                       | Media                     |                    | 201                        | 101                                    | 72                                   | 318 |
|                       | DT                        |                    | 100                        | 50,2                                   | 17                                   | 27  |
|                       | ET                        |                    | 29,0                       | 14,5                                   | 5                                    | 12  |
|                       | Mediana                   |                    | 168                        | 84,0                                   | 68                                   | 330 |
|                       | Media Geométrica          |                    | 181                        | 90,4                                   | 70                                   | 317 |
|                       | Media Geométrica del % CV |                    | 50,5                       | 50,5                                   | 24                                   | 9   |

| Tratamiento               | Sujeto ID | GIR <sub>máx</sub> | 50 % de GIR <sub>máx</sub> | tGIR <sub>50 % temprano</sub><br>(min) | tGIR <sub>50 % tardío</sub><br>(min) |
|---------------------------|-----------|--------------------|----------------------------|--|--------------------------------------|
| Humalog® con rHuPH20      | 1         | 126                | 63,0                       | 44                                     | 270                                  |
|                           | 2         | 320                | 160                        | 32                                     | 270                                  |
|                           | 3         | 385                | 193                        | 44                                     | 270                                  |
|                           | 4         | 200                | 100                        | 83                                     | 360                                  |
|                           | 5         | 149                | 74,5                       | 50                                     | 270                                  |
|                           | 6         | 260                | 130                        | NC                                     | NC                                   |
|                           | 7         | 223                | 112                        | 26                                     | 330                                  |
|                           | 8         | 109                | 54,5                       | 29                                     | 210                                  |
|                           | 9         | 154                | 77,0                       | 42                                     | 210                                  |
|                           | 10        | 257                | 129                        | 38                                     | 270                                  |
|                           | 11        | 138                | 69,0                       | 38                                     | NC                                   |
|                           | 12        | 336                | 168                        | 47                                     | 330                                  |
|                           | N         | 12                 | 12                         | 11                                     | 10                                   |
|                           | Media     | 221                | 111                        | 43                                     | 279                                  |
|                           | DT        | 91,1               | 45,6                       | 15                                     | 49                                   |
|                           | ET        | 26,3               | 13,2                       | 5                                      | 16                                   |
|                           | Mediana   | 212                | 106                        | 42                                     | 270                                  |
| Media Geométrica          | 205       | 102                | 41                         | 275                                    |                                      |
| Media Geométrica del % CV | 43,8      | 43,8               | 32                         | 18                                     |                                      |

NC = No calculado

Tabla 16. Farmacodinámica de la insulina después de inyección de insulina lispro Humalog® subcutánea con y sin co-administración de rHuPH20-intervalo de GIR-ABC

| Tratamiento | Sujeto ID                 | GIR <sub>máx</sub> | t <sub>máx</sub> | GIR ABC (min*ml/h) |           |           |           |           |    |
|-------------|---------------------------|--------------------|------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----|
|             |                           |                    |                  | 0-60 min           | 0-120 min | 0-180 min | 0-240 min | 0-360 min |    |
| Humalog®    | 1                         | 137                | 240              | 1040               | 5400      | 13200     | 21400     | 33800     |    |
|             | 2                         | 326                | 150              | 3300               | 14000     | 33100     | 52200     | 82800     |    |
|             | 3                         | 247                | 240              | 1770               | 13500     | 27100     | 41400     | 66500     |    |
|             | 4                         | 178                | 240              | 1940               | 8570      | 18600     | 29200     | 46500     |    |
|             | 5                         | 119                | 180              | 1050               | 5340      | 11400     | 18500     | 28700     |    |
|             | 6                         | 158                | 240              | 752                | 4780      | 12600     | 21800     | 39200     |    |
|             | 7                         | 350                | 60               | 4920               | 22100     | 37600     | 50900     | 68900     |    |
|             | 8                         | 90,0               | 135              | 1490               | 5390      | 10500     | 15500     | 23100     |    |
|             | 9                         | 115                | 165              | 590                | 4200      | 10500     | 17100     | 25800     |    |
|             | 10                        | 180                | 180              | 2030               | 9090      | 18700     | 29400     | 44400     |    |
|             | 11                        | 132                | 240              | 2880               | 8070      | 14600     | 22000     | 35600     |    |
|             | 12                        | 382                | 240              | 3240               | 16700     | 31600     | 50800     | 83000     |    |
|             | N                         | 12                 | 12               | 12                 | 12        | 12        | 12        | 12        | 12 |
|             | Media                     | 201                | 193              | 2080               | 9760      | 20000     | 30900     | 48200     |    |
|             | DT                        | 100                | 58               | 1280               | 5640      | 9800      | 14200     | 21600     |    |
|             | ET                        | 29,0               | 17               | 371                | 1630      | 2830      | 4090      | 6250      |    |
|             | Mediana                   | 168                | 210              | 1850               | 8320      | 16600     | 25600     | 41800     |    |
|             | Intervalo                 | 292                | 180              | 4330               | 17900     | 27100     | 36800     | 59900     |    |
|             | Media Geométrica          | 181                | 181              | 1740               | 8470      | 18000     | 28100     | 44000     |    |
|             | Media Geométrica del % CV | 50,5               | 42,5             | 71,9               | 59,1      | 50,1      | 47,3      | 46,9      |    |

| Tratamiento               | Sujeto ID | GIR <sub>máx</sub> | t <sub>máx</sub> | GIR ABC (min*ml/h) |           |           |           |           |       |
|---------------------------|-----------|--------------------|------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|
|                           |           |                    |                  | 0-60 min           | 0-120 min | 0-180 min | 0-240 min | 0-360 min |       |
| Humalog® con rHuPH20      | 1         | 126                | 60               | 2180               | 8600      | 15400     | 21200     | 28500     |       |
|                           | 2         | 320                | 135              | 7800               | 24500     | 43400     | 58800     | 72300     |       |
|                           | 3         | 385                | 75               | 5330               | 25800     | 43500     | 58100     | 77000     |       |
|                           | 4         | 200                | 90               | 3020               | 11400     | 19300     | 28100     | 43200     |       |
|                           | 5         | 149                | 165              | 1990               | 9250      | 17600     | 24100     | 31400     |       |
|                           | 6         | 260                | 360              | 2100               | 9780      | 16300     | 22200     | 36400     |       |
|                           | 7         | 223                | 135              | 6590               | 19300     | 32200     | 42400     | 55500     |       |
|                           | 8         | 109                | 57               | 3670               | 10200     | 15900     | 19900     | 24200     |       |
|                           | 9         | 154                | 75               | 2250               | 10300     | 16500     | 21300     | 27300     |       |
|                           | 10        | 257                | 150              | 6070               | 18800     | 34000     | 48100     | 62600     |       |
|                           | 11        | 138                | 165              | 3640               | 10600     | 18700     | 26000     | 36800     |       |
|                           | 12        | 336                | 165              | 5610               | 19900     | 38200     | 56300     | 84100     |       |
|                           | N         | 12                 | 12               | 12                 | 12        | 12        | 12        | 12        | 12    |
|                           | Media     | 221                | 136              | 4190               | 14900     | 25900     | 35500     | 48300     | 48300 |
|                           | DT        | 91,1               | 82               | 2010               | 6350      | 11400     | 15900     | 21200     | 21200 |
|                           | ET        | 26,3               | 24               | 582                | 1830      | 3290      | 4600      | 6120      | 6120  |
|                           | Mediana   | 212                | 135              | 3650               | 11000     | 19000     | 27000     | 40000     | 40000 |
| Intervalo                 | 276       | 303                | 5810             | 17200              | 28100     | 38900     | 59800     | 59800     |       |
| Media Geométrica          | 205       | 118                | 3750             | 13700              | 23800     | 32500     | 44200     | 44200     |       |
| Media Geométrica del % CV | 43,8      | 57,5               | 52,9             | 42,8               | 44,6      | 46,1      | 46,0      | 46,0      |       |

NC = no calculado

Tabla 17. Efecto de la secuencia de dosificación de insulina lispro Humalog® en la farmacodinámica observada

| Tratamiento                               | Secuencia de dosificación | C <sub>máx</sub> | t <sub>máx</sub> | GIR ABC (min*ml/h) |           |           |           |           |       |
|---|---------------------------|------------------|------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|
|   |                           |                  |                  | 0-60 min           | 0-120 min | 0-180 min | 0-240 min | 0-360 min |       |
| Humalog® sola                             | 1                         | Media            | 213              | 185                | 1910      | 9860      | 20700     | 32580     | 51650 |
|   |                           | DT               | 123              | 45                 | 1130      | 5470      | 11030     | 17460     | 28930 |
|   |                           | ET               | 50               | 18                 | 460       | 2230      | 4500      | 7130      | 11810 |
|   | 2                         | Media            | 189              | 200                | 2260      | 9670      | 19220     | 29120     | 44730 |
|   |                           | DT               | 81               | 73                 | 1510      | 6340      | 9380      | 11300     | 12810 |
|   |                           | ET               | 33               | 30                 | 620       | 2590      | 3830      | 4610      | 5230  |
|   | todas                     | Media            | 201              | 193                | 2080      | 9760      | 19960     | 30850     | 48190 |
|   |                           | DT               | 100              | 58                 | 1280      | 5640      | 9790      | 14140     | 21630 |
|   |                           | ET               | 29               | 17                 | 370       | 1630      | 2830      | 4080      | 6250  |
| Humalog® y rHuPH20                        | 1                         | Media            | 201              | 160                | 3930      | 13080     | 22650     | 31330     | 43830 |
|   |                           | DT               | 58               | 105                | 1950      | 4720      | 8240      | 11210     | 12870 |
|   |                           | ET               | 24               | 43                 | 800       | 1930      | 3370      | 4580      | 5260  |
|   | 2                         | Media            | 242              | 112                | 4440      | 16660     | 29180     | 39750     | 52720 |
|   |                           | DT               | 118              | 49                 | 2230      | 7650      | 13860     | 19760     | 27830 |
|   |                           | ET               | 48               | 20                 | 910       | 3120      | 5660      | 8070      | 11360 |
|   | todas                     | Media            | 221              | 136                | 4190      | 14870     | 25920     | 35540     | 48280 |
|   |                           | DT               | 91               | 82                 | 2010      | 6340      | 11390     | 15940     | 21190 |
|   |                           | ET               | 26               | 24                 | 580       | 1830      | 3290      | 4600      | 6120  |
| p-valor de la diferencia del tratamiento  |                           | 0,3502           | 0,0627           | 0,0002             | 0,0011    | 0,0044    | 0,0484    | 0,9746    |       |
| p-valor del efecto del grupo de secuencia |                           | 0,5517           | 0,3445           | 0,9365             | 0,5879    | 0,5219    | 0,5075    | 0,5403    |       |

Los datos PD de la velocidad de infusión de glucosa apoyaron los hallazgos de PK, que mostraban un tiempo hasta efecto máximo ( $tGIR_{m\acute{a}x}$ ) reducido en 36 % cuando se administró a los pacientes insulina lispro Humalog<sup>®</sup> en combinación con rHuPH20 (mediana 135 minutos) en comparación con la insulina lispro Humalog<sup>®</sup> sola (mediana 210 minutos) y el efecto metabólico máximo ( $GIR_{m\acute{a}x}$ ) aumentó en 13 % de una media de 181 ml/h cuando los sujetos recibieron insulina lispro Humalog<sup>®</sup> sola hasta 205 ml/h cuando los sujetos recibieron insulina lispro Humalog<sup>®</sup> y rHuPH20 ( $p=0,35$ ). El tiempo hasta el efecto semi-máximo temprano ( $tGIR_{50\% \text{ temprano}}$ ) se redujo en 38 % de una mediana de 68 cuando se administró a los pacientes insulina lispro Humalog<sup>®</sup> sola hasta 42 min cuando se administró a los pacientes insulina lispro Humalog<sup>®</sup> en combinación con rHuPH20 ( $p=0,0006$ )

10 **2. Efecto de la co-administración de rHuPH20 e insulina Humulin<sup>®</sup> R en la farmacodinámica de GIR**

En el estadio 2, los pacientes recibieron bien primero la dosis de insulina Humulin<sup>®</sup> R/rHuPH20 y segundo la dosis de insulina Humulin<sup>®</sup> R sola o bien primero la dosis de insulina Humulin<sup>®</sup> R sola y después la dosis de insulina Humulin<sup>®</sup> R/rHuPH20 habitualmente 7 días después. Se calculó la velocidad de infusión de glucosa para cada intervalo temporal después de la administración de insulina Humulin<sup>®</sup> R sola o insulina Humulin<sup>®</sup> R/rHuPH20 y se presenta en las Tablas 18 y 19, respectivamente. También se calcularon la ABC y la cantidad relativa de glucosa infundida sobre diversos tiempos ( $G_{rel}$ ). También se presenta la pendiente creciente, que se determina calculando el cambio de GIR sobre un intervalo temporal.

20 **Tabla 18. Velocidades de infusión de glucosa después de administración de insulina Humulin<sup>®</sup> R**

| GIR          |        |         |      |            |                     |            |
|--------------|--------|---------|------|------------|---------------------|------------|
| Tiempo (min) | Media  | Mediana | DT   | ET         | Pendiente creciente | ABC(0-x)   |
| (min)        | (ml/h) |         |      | (ml/h*min) |                     | (min*ml/h) |
| 0            | 8,5    | 0       | 11   | 3,1        |                     |            |
| 3            | 15,0   | 7       | 17   | 4,7        | 2,17                | 35         |
| 6            | 15,7   | 12      | 17,4 | 4,8        | 0,23                | 81         |
| 9            | 18,0   | 21      | 17,8 | 4,9        | 0,77                | 132        |
| 12           | 18,8   | 21      | 17,8 | 4,9        | 0,28                | 187        |
| 15           | 20,4   | 21      | 18,9 | 5,3        | 0,51                | 246        |
| 18           | 20,5   | 21      | 19   | 5,3        | 0,05                | 307        |
| 21           | 22,2   | 21      | 18,5 | 5,1        | 0,56                | 371        |
| 24           | 22,9   | 27      | 18,2 | 5          | 0,23                | 439        |
| 27           | 24,1   | 30      | 18,5 | 5,1        | 0,38                | 510        |
| 30           | 28,4   | 30      | 21   | 5,8        | 1,44                | 588        |
| 33           | 29,3   | 32      | 20   | 5,5        | 0,31                | 675        |
| 36           | 30,9   | 32      | 19,6 | 5,4        | 0,54                | 765        |
| 39           | 32,7   | 32      | 19,8 | 5,5        | 0,59                | 861        |
| 42           | 34,8   | 34      | 20,4 | 5,7        | 0,72                | 962        |
| 45           | 40,2   | 37      | 21,6 | 6          | 1,77                | 1075       |
| 48           | 42,2   | 40      | 19,4 | 5,4        | 0,67                | 1198       |
| 51           | 44,3   | 39      | 19,3 | 5,4        | 0,72                | 1328       |
| 54           | 47,8   | 47      | 17,5 | 4,8        | 1,18                | 1466       |
| 57           | 51,5   | 49      | 17,6 | 4,9        | 1,23                | 1615       |
| 60           | 56,9   | 63      | 19,3 | 5,3        | 1,79                | 1778       |
| 75           | 72,5   | 77      | 27,4 | 7,6        | 1,04                | 2749       |
| 90           | 83,6   | 85      | 41,7 | 11,6       | 0,74                | 3920       |
| 105          | 92,8   | 97      | 47,3 | 13,1       | 0,62                | 5243       |
| 120          | 102,6  | 99      | 50,1 | 13,9       | 0,65                | 6709       |
| 135          | 119,4  | 105     | 55,1 | 15,3       | 1,12                | 8374       |
| 150          | 127,5  | 109     | 57,2 | 15,9       | 0,54                | 10226      |
| 165          | 138,9  | 136     | 55,8 | 15,5       | 0,76                | 12223      |
| 180          | 146,2  | 147     | 61,5 | 17,1       | 0,48                | 14362      |
| 240          | 178,9  | 193     | 61,2 | 17         | 0,55                | 24114      |
| 300          | 172,0  | 176     | 59,1 | 16,4       | -0,12               | 34642      |
| 360          | 150,3  | 164     | 45,4 | 12,6       | -0,36               | 44311      |

**Tabla 19. Velocidades de infusión de glucosa después de la administración de insulina Humulin® R y rHuPH20**

| GIR          |        |         |      |            |                     |            |                  |
|--------------|--------|---------|------|------------|---------------------|------------|------------------|
| Tiempo (min) | Media  | Mediana | DT   | ET         | Pendiente creciente | ABC(0-x)   | G <sub>rel</sub> |
| (min)        | (ml/h) |         |      | (ml/h*min) |                     | (min*ml/h) | (%)              |
| 0            | 7,4    | 0       | 12,5 | 3,5        |                     |            |                  |
| 3            | 16,0   | 12      | 15   | 4,2        | 2,86                | 35         | 100              |
| 6            | 17,5   | 19      | 15,2 | 4,2        | 0,51                | 85         | 105              |
| 9            | 20,1   | 24      | 15,3 | 4,3        | 0,85                | 142        | 108              |
| 12           | 21,8   | 24      | 14,7 | 4,1        | 0,59                | 205        | 109              |
| 15           | 24,8   | 26      | 14,4 | 4          | 1                   | 275        | 112              |
| 18           | 30,6   | 32      | 13,2 | 3,7        | 1,92                | 358        | 116              |
| 21           | 36,4   | 35      | 15,7 | 4,4        | 1,92                | 458        | 123              |
| 24           | 48,2   | 45      | 13,4 | 3,7        | 3,95                | 585        | 133              |
| 27           | 54,8   | 47      | 16,2 | 4,5        | 2,21                | 740        | 145              |
| 30           | 65,9   | 66      | 21,6 | 6          | 3,69                | 921        | 157              |
| 33           | 74,3   | 74      | 25,8 | 7,2        | 2,79                | 1132       | 168              |
| 36           | 82,1   | 78      | 28,4 | 7,9        | 2,59                | 1366       | 179              |
| 39           | 91,8   | 87      | 28,2 | 7,8        | 3,26                | 1627       | 189              |
| 42           | 99,8   | 91      | 33,1 | 9,2        | 2,67                | 1915       | 199              |
| 45           | 110,5  | 109     | 36,8 | 10,2       | 3,56                | 2230       | 208              |
| 48           | 121,5  | 124     | 42,4 | 11,8       | 3,67                | 2578       | 215              |
| 51           | 133,7  | 134     | 49,7 | 13,8       | 4,05                | 2961       | 223              |
| 54           | 143,4  | 145     | 54,4 | 15,1       | 3,23                | 3377       | 230              |
| 57           | 153,5  | 162     | 62,8 | 17,4       | 3,38                | 3822       | 237              |
| 60           | 164,6  | 172     | 73,8 | 20,5       | 3,69                | 4299       | 242              |
| 75           | 184,8  | 178     | 99   | 27,5       | 1,34                | 6920       | 252              |
| 90           | 179,7  | 194     | 62,1 | 17,2       | -0,34               | 9653       | 246              |
| 105          | 183,9  | 211     | 60,5 | 16,8       | 0,28                | 12380      | 236              |
| 120          | 191,1  | 220     | 64,1 | 17,8       | 0,48                | 15193      | 226              |
| 135          | 206,5  | 216     | 66   | 18,3       | 1,03                | 18174      | 217              |
| 150          | 215,5  | 206     | 64   | 17,8       | 0,6                 | 21339      | 209              |
| 165          | 202,9  | 214     | 62,4 | 17,3       | -0,84               | 24477      | 200              |
| 180          | 197,4  | 214     | 57,1 | 15,8       | -0,37               | 27479      | 191              |
| 240          | 181,5  | 183     | 64,2 | 17,8       | -0,26               | 38847      | 161              |
| 300          | 117,5  | 116     | 44,6 | 12,4       | -1,07               | 47819      | 138              |
| 360          | 86,5   | 80      | 28,7 | 8          | -0,52               | 53939      | 122              |

**3. Comparación de la farmacodinámica de la insulina lispro Humalog® e insulina Humulin® R con y sin co-administración de rHuPH20**

Se comparó la farmacodinámica de insulina lispro Humalog® e insulina Humulin® R con y sin co-administración de rHuPH20. Se evaluó el efecto relativo de la co-administración de rHuPH20 en la farmacodinámica de cada tipo de insulina. La Figura 2 presenta una representación de las velocidades de infusión de glucosa en cada intervalo temporal. Se observó que la co-administración de rHuPH20 y Humalog® o Humulin® desplazó notablemente las velocidades de infusión de glucosa en función del tiempo hacia arriba y a la izquierda en comparación con cuando las insulinas se administraron sin rHuPH20, de forma similar al desplazamiento en las representaciones de la concentración de insulina en función del tiempo. La velocidad de infusión máxima aumentó ligeramente de una medida de 201 a 221 ml/h para Humalog® y de 187 a 203 ml/h para Humulin® R co-administrada con rHuPH20 en relación con el control. De forma similar, el tiempo de GIR máxima se redujo de 193 a 136 minutos para Humalog® y de 253 a 206 minutos para Humulin® R co-administrada con rHuPH20 en relación con el control. El inicio de la acción, como se midió por el tiempo hasta la GIR semi-máxima temprana (tGIR<sub>50</sub> % temprana) se redujo de 72 a 43 minutos para Humalog® y de 113 a 83 minutos para Humulin® R co-administrada con rHuPH20 en relación con el control.

Los carbohidratos del momento de la comida se digieren en gran medida y se introducen en la circulación sistémica durante las primeras pocas horas (por ejemplo, de dos a cuatro) después de una comida dependiendo del tipo de carbohidrato, y por lo tanto, la GIR acumulativa durante las primeras 2 o 3 horas (por ejemplo, de 0 a 120 minutos) es particularmente relevante. El volumen acumulativo de una solución de glucosa 190,6 mg/ml suministrada durante las primeras 2 horas aumentó de 163 a 248 ml para Humalog® y de 112 a 226 ml para Humulin® R co-administrada con rHuPH20 en relación con el control. El metabolismo de glucosa en exceso después de completarse la digestión de carbohidratos en el momento de la comida puede conducir a incidentes hipoglucémicos. El volumen acumulativo



de la solución de glucosa suministrada de 4 a 6 horas se redujo de 289 a 212 ml para Humalog® y de 337 a 252 ml para Humulin® R co-administrada con rHuPH20 en relación con el control. Por lo tanto, la co-administración de un análogo de insulina de acción rápida o una preparación de insulina regular de acción rápida con rHuPH20 aumenta la capacidad reductora de glucosa pronto para facilitar la digestión postprandial y reducir la actividad reductora de glucosa cuando esa actividad podría conducir a excursiones hipoglucémicas.

La GIR es un reflejo de la cantidad de glucosa que se usa por el cuerpo (es decir, es necesario infundir más glucosa exógena para mantener los niveles de glucosa en sangre entre 90-110 mg/dl cuando el cuerpo usa más glucosa) y, por lo tanto, la actividad farmacológica de la insulina administrada (es decir, la actividad de insulina da como resultado reducción de la producción de glucosa endógena y/o aumento de la utilización de glucosa en sangre, dando como resultado una reducción general de la glucosa en sangre). Por lo tanto, estos datos demuestran que la acción biológica de cada una de las insulinas aumentó sustancialmente tanto en velocidad (inicio del metabolismo de la glucosa) como en alcance cuando se co-administró con rHuPH20, una enzima degradante de hialuronano, en comparación con cuando las insulinas se administraron sin rHuPH20.

En este estudio, las propiedades farmacodinámicas de la insulina Humulin® R cuando se co-administra con rHuPH20 se mejoraron de modo que la farmacodinámica se asemejó sustancialmente al perfil farmacodinámico de Humalog® cuando se co-administró con rHuPH20, a diferencia de las propiedades farmacodinámicas sustancialmente retardadas de insulina Humulin® R en relación con insulina lispro Humalog® administrada en ausencia de rHuPH20. La GIR requerida para mantener los niveles de glucosa en sangre entre 90-110 mg/dl durante los primeros 60 minutos y, por extensión, la actividad farmacológica de la insulina, particularmente en los primeros 60-90 minutos después de la inyección, fue esencialmente igual entre los dos tipos diferentes de insulina cuando se co-administraron con rHuPH20. Por el contrario, la insulina Humulin® R que es una insulina regular de acción rápida, cuando se administra sin rHuPH20 tiene un perfil de GIR que indica una velocidad de acción de insulina más lenta en comparación con la insulina lispro Humalog® cuando se administra sin rHuPH20. Por lo tanto, la combinación de rHuPH20, una enzima degradante de hialuronano, y una insulina de acción rápida en, por ejemplo, condiciones tales como las descritas en este estudio da como resultado composiciones de insulina de acción súper rápida que actúan más rápido y en un mayor grado que la insulina de acción rápida solamente y, para tiempos más tempranos (es decir menos de 60 minutos después de la administración), sustancialmente independiente del tipo de insulina de acción rápida.

### Ejemplo 1b

#### Farmacocinética y respuesta glucémica postprandial de insulina lispro Humalog® inyectada por vía subcutánea o insulina Humulin® R con o sin co-administración de rHuPH20 después de una comida líquida en pacientes con diabetes mellitus de tipo 1

Se realizó un estudio que evaluaba la farmacocinética (PK) y la respuesta glucémica postprandial (es decir, la farmacodinámica (PD)) de insulina lispro Humalog® e insulina Humulin® R inyectada por vía subcutánea, con o sin co-inyección de rHuPH20, después de una comida líquida en pacientes con Diabetes Mellitus de Tipo 1. El estudio fue un ensayo de ciego sencillo (ciego solamente para los pacientes), de un único centro, cruzado, de alimento líquido, consistente en una serie de exposiciones a alimento líquido normalizadas, en pacientes diabéticos de Tipo 1 con 2 horas de toma de muestras sanguíneas pre-dosificación y 8 horas post-dosificación para parámetros de PK y PD.

Cada sujeto se sometió a una serie de visitas de hallazgo de dosis para insulina lispro Humalog® y rHuPH20 (Visitas 2A-C; hasta tres inyecciones) para determinar la dosis de insulina individual apropiada cuando se co-inyectó con rHuPH20 para abarcar la comida líquida en el control glucémico óptimo (definido como el que mantiene la glucosa en sangre postprandial del paciente en un intervalo de 60 mg/dl y 160 mg/dl). Una vez determinada, esta misma dosis optimizada se empleó para una comida de ensayo que se cubría por insulina lispro Humalog® sin rHuPH20 (Visita 3). Los sujetos se sometieron después a la misma serie de investigaciones (Visitas 4A-B; hasta dos inyecciones) usando insulina humana regular (insulina Humulin® R), para determinar la dosis de insulina regular individual apropiada con rHuPH20 para el control glucémico óptimo. Se empleó la misma dosis optimizada para una comida de ensayo que se cubría por insulina Humulin® R sin rHuPH20 (Visita 5).

El estudio permitió la comparación de perfiles PK y excursiones de glucosa postprandial cuando se administró insulina prandial con o sin rHuPH20. También se evaluó la hipoglucemia después de la comida para verificar la relevancia clínica de cualquier diferencia de PK observada. El objetivo primario era comparar la exposición a insulina temprana como se mide por el criterio de valoración farmacocinética (PK) primario de  $ABC_{0-60}$  de insulina lispro Humalog® e insulina Humulin® R inyectada por vía subcutánea (SC) antes de una comida líquida con o sin hialuronidasa humana recombinante (rHuPH20). Otros parámetros PK de insulina medidos incluían  $C_{máx}$ ;  $t_{máx}$ ;  $t_{50\%}$  temprano (tiempo hasta la concentración en suero semi-máxima temprana)  $t_{50\%}$  tardío (tiempo hasta la concentración en suero semi-máxima tardía),  $ABC_{última}$  (área bajo la curva de concentración-tiempo del tiempo 0 hasta la última observación, que de acuerdo con el protocolo es 480 minutos después de la dosis);  $ABC_{(0-inf)}$  (ABC total de tiempo 0 hasta infinito); ABC de Intervalos (0-15, 0-30, 0-45, 0-60, 0-90, 0-120, 0-180, 0-240, 0-360, 0-480,

15-480, 30-480, 45-480, 60-480, 90-480, 120-480, 180-480 y 240-480 minutos).  $\lambda_z$  (constante de velocidad de eliminación terminal; determinada por la regresión lineal de los puntos terminales de la curva de concentración en suero-tiempo lineal logarítmica);  $t_{1/2}$  (semi-vida de eliminación, definida como  $0,693/\lambda_z$ ); CL/F (eliminación en función de la biodisponibilidad; calculado como  $\text{Dosis}/\text{ABC}(0\text{-inf})$ ); MRT(última) (tiempo de residencia medio del tiempo 0 hasta la última observación, que de acuerdo con el protocolo es 480 minutos después de la dosis); MRT(0-inf) (tiempo de residencia medio del tiempo 0 hasta infinito, y Vz/F (volumen de distribución en función de la biodisponibilidad).

Los criterios de valoración de farmacodinámica (PD) fueron parámetros de respuesta glucémica postprandial, incluyendo  $\text{ABC}_{\text{BG } 0\text{-}4 \text{ h}}$  (donde BG indica glucosa en sangre), y otros criterios de valoración de PD incluyendo  $\text{ABC}_{\text{BG}}$  en intervalos temporales específicos,  $\text{BG}_{\text{máx}}$ ,  $t_{\text{BGmáx}}$ ,  $t_{\text{BG } 50\% \text{ temprano}}$ ,  $t_{\text{BG } 50\% \text{ tardío}}$ , episodios hipoglucémicas (HE) en intervalos temporales específicos, infusión de solución de glucosa al 20 % (cantidad y duración) para tratar la hipoglucemia, uso de solución de glucosa al 50 % para resucitación de emergencia (es decir presencia de síntomas graves y/o glucosa en sangre  $<36 \text{ mg/dl}$ ) y excursiones hipoglucémicas como se cuantifican por ABC por encima de la glucosa en sangre  $36 \text{ mg/dl}$  y por debajo de  $70 \text{ mg/dl}$ . También se evaluaron parámetros de seguridad tales como acontecimientos adversos, hematología, bioquímica, análisis de orina, exámenes físicos, signos vitales, ECG, glucosa en sangre, tolerabilidad local en el sitio de inyección y formación de anticuerpos para agentes de insulina y para rHuPH20.

## 20 A. Selección de pacientes

Pacientes hombres y mujeres con diabetes mellitus de Tipo 1, tratados con insulina durante  $\geq 12$  meses, eran elegibles para inclusión en el estudio. Se requería que los pacientes fueran de 18 a 65 años de edad. Se requería que las mujeres con potencial para tener hijos usaran un medio convencional y eficaz de control de la natalidad durante el transcurso del estudio. Otros criterios de inclusión incluyeron: IMC de  $18,0$  a  $29,0 \text{ kg/m}^2$ , inclusive, HbA1c (hemoglobina glucosilada Alc)  $\leq 10\%$  basándose en resultados de laboratorio local; péptido C en ayunas  $< 0,6 \text{ ng/ml}$ ; tratamiento actual con insulina  $< 1,2 \text{ U/kg/día}$ . También se requería que los pacientes tuvieran buena salud general basándose en el historial médico y en el examen físico, sin afecciones médicas que podrían evitar la compleción de las inyecciones farmacológicas del estudio y evaluaciones requeridas en este protocolo.

Los diversos criterios de exclusión del estudio incluyeron: alergia conocida o sospechada a cualquier componente de cualquiera de los fármacos del estudio en el ensayo; previa admisión en el ensayo; pacientes con retinopatía proliferativa o maculopatías, y/o neuropatía grave, en particular neuropatía autónoma; enfermedad activa clínicamente significativa de los sistemas gastrointestinal, cardiovascular (incluyendo un historial de arritmia o retardos en la conducción en ECG), hepático, neurológico, renal, genitourinario o hematológico, o hipertensión incontrolada (presión sanguínea diastólica  $\geq 13,3 \text{ kPa}$  y/o presión sanguínea sistólica  $\geq 21,28 \text{ kPa}$  después de 5 minutos en la posición supina); historial de cualquier enfermedad o dolencia que pudieran confundir los resultados del ensayo o suponer un riesgo adicional en la administración de los fármacos del estudio al paciente; hallazgos clínicamente significativos en datos de laboratorio rutinarios; anemia con hemoglobina menor que los límites menores de lo normal en la exploración es específicamente excluyente; el uso de fármacos que pudieran interferir con la interpretación de los resultados del ensayo que se sepa que provocan interferencia clínicamente relevante con la acción de la insulina, utilización de glucosa o recuperación de hipoglucemia; hipoglucemia importante recurrente o desconocimiento de hipoglucemia, según se valora por el Investigador; adicción actual al alcohol o sustancias de abuso; donación de sangre ( $> 500 \text{ ml}$ ) durante las 9 semanas previas antes de la Visita 2A (véase sección B, posterior) en el estudio; embarazo, lactancia, la intención de quedarse embarazada o no usar medios anticonceptivos adecuados (los medios anticonceptivos adecuados consisten en esterilización, dispositivo intrauterino [DIU], anticonceptivos orales o inyectables o métodos de barrera); incapacidad mental, renuencia, o barreras idiomáticas que evitan el entendimiento o la cooperación adecuados; gastroparesis sintomática; toma de cualquier fármaco de investigación en un periodo de 4 semanas desde la Visita 2A (véase sección B, posterior) en este estudio; cualquier afección (intrínseca o extrínseca) que pudiera interferir con la participación en el ensayo o en la evaluación de los datos; uso actual de terapia de bomba de insulina y renuencia a cambiar a Lantus junto con una insulina de acción corta durante el transcurso del ensayo.

Veintiún pacientes evaluables completaron el ensayo: 14 hombres; 7 mujeres; edad =  $41,6 \pm 10,6$  años; IMC =  $24,4 \pm 286 \text{ kg/m}^2$ ). Un paciente evaluable fue un paciente que completó la visita 3 y la visita 5 y tuvo suficientes muestras de sangre y evaluaciones de seguridad para análisis de puntos finales. Cualquier paciente que no completó todas las inyecciones farmacológicas del estudio especificadas en el protocolo y/o sin suficientes muestras sanguíneas y evaluaciones de seguridad hasta la visita 5 se reemplazó por la admisión de un paciente adicional.

## 60 B. Métodos de estudio

### 1. Procedimientos de visita

Cada paciente asistió a una visita de exploración (Visita 1) para determinar la elegibilidad para participación en el ensayo. Una vez admitido, cada paciente tuvo al menos una y hasta tres visitas de hallazgo de dosificación 2A-C

(insulina lispro Humalog® con rHuPH20) una Visita de dosificación 3 (insulina lispro Humalog® sola), al menos una y hasta dos Visitas de hallazgo de dosificación 4A-B (insulina Humulin® R con rHuPH20), una Visita de dosificación 5 (insulina Humulin® R sola) y una visita de seguimiento (Visita 6).

5 Los pacientes con una bomba de insulina, NPH, o cualquier otra insulina de acción larga, que participaron en el estudio, cambiaron a Lantus durante el transcurso del estudio. La conversión tuvo lugar una vez que el sujeto había pasado las evaluaciones de exploración pero al menos 36 horas antes de su primera visita de dosificación.

10 Cada visita de hallazgo de dosis y cada visita de dosificación se completó en un único día. Después de la comprobación por la mañana temprano, se observó a los pacientes y se estabilizaron durante aproximadamente 2 horas usando glucosa y/o insulina intravenosa según se requiriera para llevar la glucosa en sangre a un valor diana de 100 mg/dl. No se permitió infusión de insulina o glucosa durante los 30 minutos inmediatamente precedentes a la dosificación. Esto se siguió después de dosificación con el artículo de ensayo (es decir, insulina lispro Humalog®, insulina lispro Humalog®/rHuPH20, insulina Humulin® o insulina Humulin®/rHuPH20) y después del consumo de la comida líquida aproximadamente a las 8:30 de la mañana. En todas las visitas de dosificación, se realizaron evaluaciones de PK y PD durante 8 horas hasta aproximadamente las 4:30 de la tarde, momento en el cual los pacientes recibieron una comida y se les dio el alta si se consideraba seguro.

## 2. Preparaciones para los procedimientos de visita de hallazgo de dosis

20 Se insertó un catéter de calibre 18 en la vena cúbica del mismo brazo para análisis de insulina en suero y glucosa en sangre usando el Analizador de Glucosa YSI STAT2300. Se previno la coagulación sanguínea en el catéter y la línea lavando con solución salina 0,15 mmol/l. Se colocó un segundo catéter de PTEF de calibre 18 en una vena del antebrazo opuesto para infusión de solución de glucosa al 20 %, solución salina e insulina según se considerara apropiado durante el periodo de pre-dosificación. Sesenta minutos antes de la dosificación, se determinó la concentración de glucosa en sangre en los siguientes puntos temporales en relación con la dosificación: -60, -30, -20 y -10 min con un Analizador de Glucosa YSI STAT2300. Se usó el promedio de las lecturas de glucosa en sangre de -30, -20 y -10 min para determinar el nivel de glucosa en sangre en ayunas del paciente individual para cada visita de hallazgo de dosis y de dosificación. A un paciente con diferencias entre los valores de glucosa en sangre en ayunas iniciales que se consideraban demasiado grandes se le reprogramó la visita o se le retiró del estudio.

## 3. Periodo pre-dosificación

35 Durante el periodo previo de 2 horas, la glucosa en sangre se controló según fue necesario para estabilizar la glucosa en sangre en el intervalo diana. El periodo previo de 2 horas se usó para ajustar los niveles de glucosa en sangre según fuera apropiado por administración IV de glucosa y/o insulina por medio de una infusión de precisión/bomba de jeringa. No se administró infusión de insulina o glucosa durante los 30 minutos inmediatamente antes de la dosificación. En el momento de la administración de fármaco, el nivel de glucosa en sangre del paciente estaba en un intervalo entre 80 y 140 mg/dl (dirigiéndose a un valor tan cercano al intervalo de 100-120 mg/dl como fuera posible).

## 4. Dosificación e ingestión de comida líquida convencional

45 Después del periodo previo de 2 horas, se administró la inyección del fármaco de estudio (en el punto temporal 0) por inyección subcutánea con una jeringa en un pliegue cutáneo levantado de la pared abdominal. Los artículos de ensayo se prepararon de la siguiente manera. Se preparó la dosis solamente de insulina Humulin® R aspirando la dosis correcta (como se determinó en la Visita 4) de un frasco de insulina Humulin® R (100 U/ml; Eli Lilly) usando una jeringa de insulina de 0,3 cm<sup>3</sup> de capacidad. Se preparó la insulina Humulin® R/rHuPH20 aspirando en primer lugar 0,3 cm<sup>3</sup> (150 unidades) de un frasco de insulina Humulin® R (500 U/ml; Eli Lilly) usando una jeringa de insulina de 0,3 cm<sup>3</sup> de capacidad y transfiriéndola a un frasco que contenía 1 ml de rHuPH20 (20 µg/ml; 3000 U/ml). La solución se mezcló por agitación suave.

55 Se preparó la dosis de solamente insulina lispro Humalog® aspirando la dosis correcta (como se determinó en la Visita 2) a partir de un frasco de insulina lispro Humalog® (100 U/ml; Eli Lilly) usando una jeringa de insulina de 0,3 cm<sup>3</sup> de capacidad. Se preparó la insulina lispro Humalog®/rHuPH20 descongelando en primer lugar un frasco de rHuPH20 (1 mg/ml; aproximadamente 1200.000 U/ml) a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas. Usando una jeringa de insulina de 0,3 cm<sup>3</sup> de capacidad estéril, se extrajeron 0,27 cm<sup>3</sup> de aire en la jeringa y se expulsaron en el espacio de cabeza del frasco de rHuPH20, antes de retirar 0,27 cm<sup>3</sup> (0,27 mg; aproximadamente 32400 U) de rHuPH20 en la jeringa. Esto se transfirió después lentamente, para evitar la formación de espuma, a un frasco de Hylenex y se agitó suavemente. Usando una jeringa de insulina de 3,3 cm<sup>3</sup> estéril, se extrajo 1,1 ml de aire y se expulsó al espacio de cabeza del frasco Hylenex (que contenía 0,27 mg de rHuPH20 extra; aproximadamente 32400 U) antes de aspirarse 1,1 ml de la solución y dispersarse a un frasco de insulina lispro Humalog® (100 U/ml; Eli Lilly). La solución se mezcló por agitación suave.

65

Se administró una dosis media de 5,7 ( $\pm 3,0$ ) de insulina lispro Humalog®, con o sin rHuPH20 (0,2  $\mu\text{g}/\text{U}$  de insulina). Se administró una dosis media de 6,2 ( $\pm 3,5$ ) de insulina Humulin®, con o sin rHuPH20 (0,2  $\mu\text{g}/\text{U}$  de insulina). Los sitios de inyección para insulinas co-administradas con rHuPH20 fueron los siguientes: la inyección para la Visita 2A fue en la región abdominal media izquierda, para la siguiente visita (Visita 2B o Visita 3 si la Visita 2B no fue necesaria) se usó la región abdominal media derecha y para la siguiente visita se usó la región abdominal media izquierda, alternando los sitios de inyección posteriores en consecuencia. La aguja de inyección se colocó a un ángulo de 45 grados y se mantuvo en el pliegue cutáneo durante 10 segundos.

En un periodo de 10 minutos después de la dosificación del fármaco del estudio, los pacientes consumieron un alimento líquido (Ensure) que proporcionaba 60 g de carbohidratos. La comida líquida se ingirió completamente en un periodo de 10 minutos. Se midió la glucosa en sangre durante las siguientes 8 horas en puntos temporales específicos. Se realizaron mediciones de glucosa en sangre adicionales para fines de seguridad según fue necesario.

### 5. Toma de muestras y evaluación

Durante el periodo de pre-dosificación y después de la dosificación, se controló la concentración de glucosa en sangre por mediciones de glucosa en sangre frecuentes usando el analizador de glucosa YSI STAT2300 en los puntos temporales específicos de -60, -30, -20, -10, 0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 255, 270, 285, 300, 315, 330, 345, 360, 375, 390, 415, 420, 430, 445, 460, 475 y 480 minutos. Se extrajeron muestras de sangre en serie para la determinación de insulina en suero a -30, -30, -10, 0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360, 420 y 480 minutos.

### B. Farmacocinética de insulina Humulin® R e insulina lispro Humalog® con y sin rHuPH20

La farmacocinética para tanto la insulina lispro Humalog®/rHuPH20 como la insulina Humulin® R/rHuPH20 mostró exposición acelerada pero en general comparable comparadas entre sí sin rHuPH20. La Tabla 19a expone un resumen de diversos parámetros PK para 12 pacientes. Este fue un análisis provisional que se realizó antes de recogerse los datos de todos los pacientes. Por lo tanto, solamente los datos de 12 de los 21 pacientes contribuyeron a este análisis. También se incluye el efecto de la co-administración con rHuPH20 que se muestra por % de control, calculado por [media (geométrica o aritmética) del valor PK para insulina con rHuPH20] / [media (geométrica o aritmética) del valor PK para insulina sola] x 100. La Media Geométrica y el p-valor para datos transformados logarítmicamente para los parámetros  $C_{\text{máx}}$  y ABC, aunque están basados en la media aritmética y valores no transformados para  $t_{\text{máx}}$  y  $t_{50\%}$  temprana y tardía. El criterio de valoración primario, la exposición de insulina total durante la primera hora ( $\text{ABC}_{0-60}$ ), aumentó 135 % para insulina lispro Humalog®/rHuPH20 en comparación con insulina lispro Humalog® sola ( $p=0,0197$ ) y 304 % para insulina Humulin® R/rHuPH20 sobre insulina Humulin® R sola ( $p=0,0005$ ). La  $T_{50}$  temprana se redujo de 19,9 a 12,6 min ( $p=0,0002$ ) para insulina lispro Humalog® y de 40,1 a 14,8 ( $p=0,033$ ) para insulina Humulin® R.  $t_{\text{máx}}$  se redujo de 43,8 a 27,9 min ( $p=0,002$ ) para insulina lispro Humalog® y 96,7 a 52,1 ( $p=0,086$ ) para regular;  $T_{50\%}$  tardía se redujo de 98,6 a 68,6 min ( $p=0,0001$ ) para insulina lispro Humalog® y 219,2 a 111,2 ( $p=0,008$ ), insulina Humulin® R.

**Tabla 19a. Farmacocinética de la insulina administrada con o sin rHuPH20 en un estudio de comida líquida**

|   | Insulina lispro Humalog® (N= 12) |                     |                                     | Insulina Humulin® R (N= 12) |                     |                                     |
|---|----------------------------------|---------------------|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------------------------|
|   | - rHuPH20                        | + rHuPH20           | Efecto de rHuPH20                   | - rHuPH20                   | + rHuPH20           | Efecto de rHuPH20                   |
|   | Mediana (Intervalo)              | Mediana (Intervalo) | % de control (p valor) <sup>a</sup> | Mediana (Intervalo)         | Mediana (Intervalo) | % de control (p valor) <sup>a</sup> |
| <b>Dosis de Insulina (U)</b>                  | 6 (3, 16)                        | 6 (3, 16)           |                                     | 6 (2,18)                    | 6 (2,18)            |                                     |
| <b><math>t_{50\%}</math> temprano (min)</b>   | 20,2 (13,3, 25,6)                | 13,6 (6,3, 18,2)    | 63 % ( $p= 0,0002$ )                | 27,3 (14,6, 146,0)          | 16,2 (3,9, 22,9)    | 60 % ( $p= 0,0329$ )                |
| <b><math>t_{\text{máx}}</math> (min)</b>      | 45 (30, 60)                      | 30 (15, 45)         | 67 % ( $p= 0,0015$ )                | 60 (20, 240)                | 45 (20, 150)        | 75 % ( $p= 0,0856$ )                |
| <b><math>t_{50\%}</math> tardío (min)</b>     | 86,6 (69,2, 135,0)               | 71,0 (42,5, 93,9)   | 82 % ( $p= 0,0001$ )                | 172,0 (91,8, 370,0)         | 104,5 (67,2, 173,0) | 61 % ( $p= 0,0066$ )                |
| <b><math>C_{\text{máx}}</math> (pmol/L*U)</b> | 40,7 (25,5, 76,2)                | 53,2 (31,2, 101,5)  | 126 % ( $p=0,0394$ )                | 21,1 (6,0, 52,3)            | 38,5 (21,7, 76,8)   | 186 % ( $p= 0,0047$ )               |

| Intervalo de ABC (min*pmol/l*U) |                   |                   |                    |                   |                   |                    |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| <b>0-60</b>                     | 1373 (947, 3113)  | 2310 (1238, 3683) | 135 % (p = 0,0197) | 583 (150, 1860)   | 1495 (856, 3600)  | 304 % (p = 0,0005) |
| <b>0-último</b>                 | 3840 (1673, 5133) | 3452 (2133, 6375) | 105 % (p= 0,7332)  | 3633 (745, 6500)  | 4021 (2417, 5656) | 133 % (p= 0,1679)  |
| <b>0-inf</b>                    | 4016 (1783, 5667) | 3491 (2167, 6650) | 102 % (p= 0,9004)  | 3867 (990, 11467) | 4143 (2433, 5700) | 105 % (p= 0,8366)  |

<sup>a</sup> Análisis de la varianza usando un modelo mixto con efecto fijo para el tratamiento. Una matriz de covarianza no estructurada entre mediciones repetidas, realizada en valores transformados logarítmicamente para los parámetros ABC y C<sub>máx</sub>, y datos no transformados para parámetros t<sub>máx</sub> y t<sub>50%</sub>. Los valores de 0 se establecieron en 1 antes de la transformación logarítmica.

- La Tabla 19b expone un resumen de diversos parámetros PK para todos los 21 pacientes que completaron el estudio, mostrando la media y la desviación típica. Los análisis PK en la Tabla 19b se realizaron en datos de concentración insulina lispro Humalog® o insulina Humulin® R individual con la línea basal restada (donde la línea basal fue la medición en el tiempo 0) frente al tiempo usando el enfoque no compartimental (regla trapezoidal lineal para cálculo de ABC). Se usaron criterios de selección de usuario WinNonlin en la determinación de Lambda z, la constante de velocidad de eliminación, en la que se basó la semivida, ABC INF<sub>obs</sub>, MRT, CL y Vz. Todas las mediciones menores de 20,0 pM se establecieron en cero para fines de cálculo de PK.
- 10 La adición de rHuPH20 a inyección de insulina lispro Humalog® o insulina Humulin® R aumentó la exposición de insulina temprana. La media de C<sub>máx</sub> con línea basal normalizada para la dosis restada aumentó 74 % de 46,6 a 81,2 pmol/l con adición de rHuPH20 a una insulina lispro Humalog®, y 122 % de 25,4 a 56,5 pmol/l para insulina Humulin® R. Para el criterio de valoración PK primario, ABC<sub>0-60min</sub>, la co-administración con rHuPH20 aumentó la exposición de insulina lispro Humalog® temprana en 75 % de 1.690 a 2.950 min\*pmol/l/UI y aumentó la exposición de insulina Humulin® R temprana en 210 % de 649 a 2.010 min\*pmol/l/UI en relación con la administración de control sin enzima. La biodisponibilidad tras la co-administración con rHuPH20 no se vio alterada significativamente en relación con la inyección de control de insulina lispro Humalog® sola: 98 % para ABC<sub>0-inf</sub> y 116 % para ABC<sub>0-último</sub>. La biodisponibilidad relativa fue de 120 % para ABC<sub>0-inf</sub> y 174 % para ABC<sub>0-último</sub> con co-administración de insulina Humulin® R con rHuPH20 en relación con la administración de control sin enzima (media geométrica de datos con línea basal normalizada para la dosis restada usados para estos cálculos; datos no mostrados). La co-administración tanto de insulina como de lispro con rHuPH20 aceleró T<sub>máx</sub> y T<sub>50%</sub> temprano y tardío en comparación con la inyección de control sin rHuPH20.
- 25 El tiempo hasta la concentración de insulina máxima fue más rápido para la inyección de insulina lispro Humalog® con rHuPH20, con una media aritmética t<sub>máx</sub> a 38,8 minutos, frente a 47,1 minutos con inyección de insulina lispro Humalog® sin rHuPH20. La inyección subcutánea de insulina Humulin® R con rHuPH20 dio como resultado un t<sub>máx</sub> de 58,3 minutos, en comparación con 104 minutos sin rHuPH20.

**Tabla 19b. Farmacocinética de insulina administrada con o sin rHuPH20 en un estudio de comida líquida**

|                                    | Insulina lispro Humalog® (N= 21) |      |           |       | Insulina Humulin® R (N= 21) |      |           |      |
|------------------------------------|----------------------------------|------|-----------|-------|-----------------------------|------|-----------|------|
|                                    | - rHuPH20                        |      | + rHuPH20 |       | - rHuPH20                   |      | + rHuPH20 |      |
|                                    | Media                            | DT   | Media     | DT    | Media                       | DT   | Media     | DT   |
| <b>C<sub>máx</sub> (pmol/l *U)</b> | 46,6                             | 23,3 | 81,2      | 92,9  | 25,4                        | 13,1 | 56,5      | 52,1 |
| <b>ABC última (min*pmol/l *U)</b>  | 4440                             | 2360 | 8470      | 19400 | 3850                        | 1840 | 6570      | 8690 |
| <b>ABC0-inf (min*pmol/l *U)</b>    | 4680                             | 2580 | 4410      | 1700  | 4200                        | 1620 | 4810      | 1580 |
| <b>ABC0_15 (min*pmol/l *U)</b>     | 82,1                             | 105  | 262       | 183   | 36                          | 43,6 | 188       | 172  |
| <b>ABC0_30 (min*pmol/l *U)</b>     | 485                              | 394  | 1190      | 1080  | 171                         | 125  | 698       | 461  |
| <b>ABC0_45 (min*pmol/l *U)</b>     | 1080                             | 681  | 2190      | 1980  | 395                         | 269  | 1340      | 763  |
| <b>ABC0_60 (min*pmol/l *U)</b>     | 1690                             | 926  | 2950      | 2530  | 649                         | 422  | 2010      | 1070 |
| <b>ABC0_90 (min*pmol/l *U)</b>     | 2680                             | 1320 | 4050      | 3800  | 1210                        | 693  | 3140      | 1520 |
| <b>ABC0_120 (min*pmol/l *U)</b>    | 3370                             | 1620 | 4980      | 6080  | 1770                        | 934  | 4050      | 2320 |
| <b>ABC0_180 (min*pmol/l *U)</b>    | 4070                             | 1900 | 5980      | 9120  | 2810                        | 1170 | 4900      | 3040 |

|                                 | Insulina lispro Humalog® (N= 21) |        |           |         | Insulina Humulin® R (N= 21) |        |           |        |
|---------------------------------|----------------------------------|--------|-----------|---------|-----------------------------|--------|-----------|--------|
|                                 | - rHuPH20                        |        | + rHuPH20 |         | - rHuPH20                   |        | + rHuPH20 |        |
|                                 | Media                            | DT     | Media     | DT      | Media                       | DT     | Media     | DT     |
| ABC0_240 (min*pmol/l *U)        | 4310                             | 2060   | 7230      | 14200   | 3560                        | 1280   | 5230      | 3450   |
| ABC0_36 (min*pmol/l *U)         | 4500                             | 2440   | 7950      | 16900   | 4190                        | 1540   | 5950      | 6040   |
| ABC0_480 (min*pmol/l *U)        | 4540                             | 2450   | 8520      | 19300   | 4280                        | 1630   | 6910      | 9950   |
| ABC15_480 (min*pmol/l *U)       | 4460                             | 2360   | 8270      | 19200   | 4250                        | 1620   | 6720      | 9870   |
| ABC30_480 (min*pmol/l *U)       | 4050                             | 2140   | 7330      | 18300   | 4110                        | 1610   | 6210      | 9690   |
| ABC45_480 (min*pmol/l *U)       | 3460                             | 1960   | 6340      | 17500   | 3890                        | 1600   | 5560      | 9480   |
| ABC60_480 (min*pmol/l *U)       | 2850                             | 1810   | 5570      | 16900   | 3630                        | 1620   | 4890      | 9220   |
| ABC90_480 (min*pmol/l *U)       | 1860                             | 1490   | 4470      | 15600   | 3080                        | 1600   | 3770      | 8820   |
| ABC120_480 (min*pmol/l *U)      | 1160                             | 1190   | 3540      | 13300   | 2520                        | 1550   | 2850      | 7910   |
| ABC180_480 (min*pmol/l *U)      | 473                              | 782    | 2540      | 10300   | 1480                        | 1350   | 2000      | 7090   |
| ABC240_480 (min*pmol/l *U)      | 223                              | 525    | 1300      | 5130    | 726                         | 903    | 1680      | 6620   |
| Lambda_z (1/min)                | 0,0214                           | 0,0094 | 0,0253    | 0,00905 | 0,0224                      | 0,0118 | 0,0249    | 0,0118 |
| HL_Lambda_z (min)               | 38,7                             | 16,3   | 31,8      | 14,1    | 40,8                        | 21,4   | 36,2      | 24,8   |
| t <sub>máx</sub> (min)          | 47,1                             | 15,2   | 38,8      | 40,2    | 104                         | 65     | 58,3      | 32,5   |
| t <sub>50%</sub> temprano (min) | 21,1                             | 5,83   | 13,9      | 3,34    | 38,7                        | 31,6   | 18,5      | 10,8   |
| t <sub>50%</sub> tardío (min)   | 112                              | 30,5   | 81,9      | 45,2    | 214                         | 70,7   | 118       | 30,8   |
| Vz F obs (l)                    | 87,4                             | 52,2   | 67,1      | 30,2    | 117                         | 141    | 70,5      | 50,5   |
| Cl F obs (l/min)                | 1,56                             | 0,668  | 1,56      | 0,582   | 1,81                        | 1,27   | 1,37      | 0,435  |
| MRT última (min)                | 86,1                             | 23,3   | 72,4      | 34,3    | 131                         | 50,5   | 93,6      | 43,7   |
| MRTINF_obs (min)                | 97,6                             | 31,6   | 73,6      | 27      | 144                         | 38,2   | 90,7      | 33,5   |

### C. Comparación de la Respuesta Glucémica a Exposición a Comida después de Insulina Humana Regular e Insulina Lispro con y sin rHuPH20

- 5 La respuesta glucémica a una exposición a comida se mejoró cuando se administró insulina lispro Humalog® o insulina Humulin® R con rHuPH20 en comparación con cuando las insulinas se administraron solas. La Tabla 19c expone los parámetros farmacodinámicos como se miden de 12 pacientes. La co-administración de insulina lispro Humalog® o insulina Humulin® R con rHuPH20 dio como resultado niveles de glucosa en sangre postprandiales reducidos en relación con la inyección de control sin rHuPH20. La glucosa en sangre máxima observada en el periodo postprandial de 4 horas se redujo desde 186 hasta 154 mg/dl cuando se administró insulina lispro Humalog® con rHuPH20 en comparación con insulina lispro Humalog® sola (p=0,0213) y de 212 a 166 mg/dl cuando se administró insulina Humulin® R con rHuPH20 en comparación con insulina Humulin® R sola (p=0,0406). La glucosa postprandial de 2 horas (PPG) y el área de excursión total mayor de 140 mg/dl se redujeron de forma similar. El área de excursión total menor de 70 mg/dl fue mínimo y similar para todos los artículos de ensayo, con una tendencia menor hacia área aumentada para insulina lispro Humalog® y área reducida para insulina Humulin® R con co-administración de rHuPH20.

**Tabla 19c. Farmacodinámica de la insulina administrada con o sin rHuPH20 en un estudio de comida líquida**

|                                 | Insulina lispro Humalog® (N= 12)       |  |  | Insulina Humulin® R (N= 12)            |  |  |
|---------------------------------|--|--|--|--|--|--|
|                                 | -<br>rHuPH20<br>Mediana<br>(Intervalo) | +<br>rHuPH20<br>Mediana<br>(Intervalo) | %<br>Control<br>(p valor) <sup>a</sup> | -<br>rHuPH20<br>Mediana<br>(Intervalo) | +<br>rHuPH20<br>Mediana<br>(Intervalo) | %<br>Control<br>(p valor) <sup>a</sup> |
| <b>BG<sub>máx</sub> (mg/dl)</b> | 186 (127, 270)                         | 154 (98, 196)                          | 83 % (p=0.0213)                        | 212 (128, 343)                         | 166 (137,274)                          | 79 % (p=0.0406)                        |
| <b>t<sub>BGmáx</sub> (min)</b>  | 70 (30, 120)                           | 95 (20, 240)                           | 136 % (p=0.1854)                       | 90 (45, 120)                           | 70 (45, 140)                           | 78 % (p=0.5744)                        |
| <b>PPG de 2 horas (mg/dl)</b>   | 156 (70, 239)                          | 124 (74, 194)                          | 80 % (p=0.0862)                        | 192 (101,329)                          | 132 (79,207)                           | 69 % (p=0.0084)                        |
| <b>ABC &gt; 140 (mg*min/dl)</b> | 3573 (0, 15758)                        | 400 (0, 6864)                          | 11 % (p=0.0693)                        | 5254 (0, 35013)                        | 847 (2, 14513)                         | 16 % (p=0.2105)                        |
| <b>ABC &lt; 70 (mg*min/dl)</b>  | 0 (0,0)                                | 0 (0, 642)                             | 0 % (p=0.0958)                         | 347 (0, 1148)                          | 0 (0, 939)                             | 0 % (p=0.2803)                         |

<sup>a</sup> ensayo de t, par de muestras relacionadas, de 2 colas

**D. Seguridad**

- 5 No se han presentado acontecimientos adversos graves (AE). El AE más habitualmente indicado fue glucosa en sangre reducida/hipoglucemia (147 acontecimientos). De los 147 acontecimientos de glucosa en sangre reducida/hipoglucemia, 21 se consideraron posiblemente o probablemente relacionados con rHuPH20. 17 acontecimientos se clasificaron como de intensidad moderada, 4 de los cuales se consideraron posiblemente relacionados con rHuPH20. Los 126 acontecimientos restantes se clasificaron como de intensidad leve. Todos los otros AE se produjeron con menos del 5 % de frecuencia en este estudio.

Todos los episodios de hipoglucemia (definidos como tener un valor de glucosa en sangre de > 70 mg/dl), independientemente de los síntomas se capturaron como AE en este estudio.

**E. Sumario**

La co-administración de insulina lispro Humalog® o insulina Humulin® R con rHuPH20 dio como resultado exposición a insulina más temprana con parámetros de t<sub>máx</sub> más temprano, t<sub>50%</sub> temprano y t<sub>50%</sub> tardío, así como mayor concentración de insulina máxima en relación con inyecciones de control sin rHuPH20, sin un cambio significativo en la biodisponibilidad. Esta exposición a insulina más temprana condujo a menor hiperglucemia postprandial, con niveles de glucosa a las 0-4 horas máximos reducidos, niveles de glucosa postprandial de 2 horas reducidos y menos excursiones hiperglucémicas como se mide por ABC > 140 mg/dl. Las excursiones hipoglucémicas, como se midió por ABC < 70 mg/dl, fueron mínimas y similares para todos los artículos de ensayo, con una tendencia menor hacia área aumentada para insulina lispro Humalog® y área reducida para insulina humana regular (insulina Humulin® R) tras co-administración con rHuPH20.

**Ejemplo 1c.**

**Farmacocinética y farmacodinamia de insulina Humulin® R o insulina lispro Humalog® administrada por vía subcutánea con o sin dosis diversas dosis de rHuPH20 recombinante en sujetos humanos sanos**

Como parte de un estudio de un único centro, de fase I, abierto, ciego sencillo (sujetos ciegos a los contenidos de cada inyección), de 4 estadios para determinar la farmacocinética, farmacodinamia (o glucodinámica; GD), seguridad, tolerabilidad, y relación óptima de rHuPH20: insulina, se administró una serie de relaciones de dosis de rHuPH20 por vía subcutánea (SC) con dosis de insulina regular (insulina Humulin® R) o insulina lispro Humalog®, y se evaluó la farmacocinética (PK) y relación óptima de rHuPH20: insulina determinando t<sub>máx</sub>, C<sub>máx</sub>, ABC<sub>0→t</sub>, y biodisponibilidad relativa basándose en las concentraciones de insulina en suero recogidas en puntos temporales específicos.

Se evaluó el efecto de la co-administración de diversas dosis de rHuPH20 en la farmacocinética y la farmacodinámica (o glucodinámica (GD)) de insulina Humulin® R administrada por vía subcutánea o insulina lispro

Humalog® tomando muestras sanguíneas para medir los niveles de insulina y glucosa. Se usó un procedimiento de Pinza Hiperinsulinémica-Euglucémica (como se ha descrito en el Ejemplo 1) para mantener los niveles de glucosa en plasma entre 90 y 110 mg/dl. Se evaluaron las concentraciones de insulina para determinar los parámetros PK de insulina:  $t_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{50\%}$  temprano,  $t_{50\%}$  tardío,  $ABC_{0\rightarrow t}$  y  $ABC_{t\rightarrow final}$  (donde  $t = 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360$  y  $480$  minutos después de inyección),  $ABC_{0\rightarrow todas}$ ,  $ABC_{0\rightarrow inf}$ ,  $C_{m\acute{a}x}$ , biodisponibilidad relativa (en comparación con sin rHuPH20) y variabilidad entre y dentro de sujetos basándose en el coeficiente de variación para todos los parámetros PK. Se midió la velocidad de infusión de glucosa (GIR) para mantener la euglucemia durante la pinza y se usó para determinar los siguientes parámetros GD:  $tGIR_{m\acute{a}x}$ ,  $tGIR_{50\%}$  temprano,  $tGIR_{50\%}$  tardío,  $GIR_{ABC_{0\rightarrow t}}$ , y  $GIR_{ABC_{t\rightarrow final}}$  (donde  $t = 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360$  y  $480$  minutos después de la inyección),  $GIR_{ABC_{t\rightarrow todas}}$ , y  $cGIR_{m\acute{a}x}$ , y la variabilidad entre y dentro de sujetos basándose en el coeficiente de variación para todos los parámetros GD. También se evaluó la seguridad y tolerabilidad local de cada una de las inyecciones SC.

**A. Administración de insulina Humulin® R con o sin diversas dosis de rHuPH20**

Se administró a voluntarios sanos 30 µl o 120 µl de insulina Humulin® R (diluida a 100 U/ml) con una concentración final de rHuPH20 de 0 µg/ml, 1,25 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml u 80 µg/ml (aproximadamente 0 U/ml, 150 U/ml, 600 U/ml, 1.200 U/ml, 2.400 U/ml o 9.600 U/ml, respectivamente). Por lo tanto, se administró a los voluntarios 30 µl que contenían 3 U de insulina Humulin® R con aproximadamente 0, 4,5, 18, 36, 72 o 288 Unidades de rHuPH20, o 120 µl que contenían 12 U de insulina Humulin® R con aproximadamente 0, 18, 72, 144, 288 o 1.152 Unidades de rHuPH20. La Tabla 19d expone los parámetros farmacocinéticos medidos para los sujetos que recibieron 12 U de insulina. Los parámetros PK característicos de la co-administración de hialuronidasa ( $t_{m\acute{a}x}$  temprano y  $t_{1/2m\acute{a}x}$ ,  $C_{m\acute{a}x}$  mayor y exposición sistémica temprana por ejemplo  $ABC_{0-60min}$ ) aumentaron de forma comparable para todas las concentraciones de rHuPH20 ensayadas en comparación con cuando se administró insulina sola. Los perfiles de velocidad de infusión de glucosa (GIR) para todas las concentraciones de rHuPH20 fueron diferentes del placebo (es decir 0 µg/ml) con un aumento característico de las velocidades tempranas y reducción de la infusión de glucosa tardía. Sobre las dosis ensayadas, todas las concentraciones de rHuPH20 fueron similarmente eficaces, y no se observó una dosis no eficaz.

**Tabla 19d. Parámetros PK de insulina para 12 U de insulina Humulin® R con diversas dosis de rHuPH20**

| Variable (Unidades)                       | Estadística           | Cantidad de rHuPH20 |               |               |               |               |               |
|---|-----------------------|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|   |                       | 0 µg/ml             | 1,25 µg/ml    | 5 µg/ml       | 10 µg/ml      | 20 µg/ml      | 80 µg/ml      |
| <b>C<sub>máx</sub>(pmol/l)</b>            | N                     | 4                   | 4             | 4             | 4             | 4             | 4             |
|   | Media Geométrica      | 192,3               | 418,1         | 355,7         | 323,4         | 371,0         | 352,2         |
|   | % de CV               | 22,9                | 33,2          | 23,7          | 45,6          | 32,4          | 35,5          |
|   | Mediana               | 179,5               | 432,0         | 334,0         | 276,0         | 353,0         | 371,0         |
| <b>t<sub>máx</sub> (minutos)</b>          | N                     | 4                   | 4             | 4             | 4             | 4             | 4             |
|   | Media Aritmética (DT) | 121,5 (125,42)      | 108,8 (33,26) | 71,3 (14,36)  | 93,8 (39,45)  | 75,0 (21,21)  | 101,3 (41,31) |
|   | % de CV               | 103                 | 30,6          | 20,2          | 42,1          | 28,3          | 40,8          |
|   | Mediana               | 90,0                | 105,0         | 67,5          | 82,5          | 82,5          | 97,5          |
| <b>t<sub>50% temprano</sub> (minutos)</b> | N                     | 4                   | 4             | 4             | 4             | 4             | 4             |
|   | Media Aritmética (DT) | 41,3 (25,67)        | 33,3 (9,14)   | 22,3 (6,97)   | 30,4 (9,58)   | 24,7 (3,99)   | 33,5 (15,10)  |
|   | % de CV               | 62,2                | 27,4          | 31,2          | 31,5          | 16,2          | 45,1          |
|   | Mediana               | 30,3                | 33,5          | 25,4          | 29,3          | 25,0          | 34,2          |
| <b>t<sub>50% tardío</sub> (minutos)</b>   | N                     | 4                   | 4             | 4             | 4             | 4             | 4             |
|   | Media Aritmética (DT) | 359,0 (28,28)       | 196,3 (47,35) | 209,8 (47,08) | 194,5 (69,25) | 210,8 (50,09) | 193,8 (43,26) |
|   | % de CV               | 7,9                 | 24,1          | 22,4          | 35,6          | 23,8          | 22,3          |
|   | Mediana               | 359,0               | 201,0         | 204,0         | 174,5         | 231,0         | 187,0         |



| Variable (Unidades)                         | Estadística      | Cantidad de rHuPH20 |            |         |          |          |          |
|---|------------------|---------------------|------------|---------|----------|----------|----------|
|   |                  | 0 µg/ml             | 1,25 µg/ml | 5 µg/ml | 10 µg/ml | 20 µg/ml | 80 µg/ml |
| <b>ABC<sub>0-60</sub></b><br>(min*pmol/l)   | N                | 4                   | 4          | 4       | 4        | 4        | 4        |
|   | Media Geométrica | 4606,8              | 11299,9    | 11679,1 | 9078,3   | 12193,6  | 9514,5   |
|   | % de CV          | 51,8                | 38,6       | 27,6    | 63,2     | 44,1     | 67,0     |
|   | Mediana          | 4635,0              | 10475,0    | 11865,0 | 7190,0   | 11425,0  | 9885,0   |
| <b>ABC<sub>último</sub></b><br>(min*pmol/l) | N                | 4                   | 4          | 4       | 4        | 4        | 4        |
|   | Media Geométrica | 59362,0             | 76639,9    | 75575,6 | 64666,6  | 70945,2  | 65635,2  |
|   | % de CV          | 20,0                | 11,2       | 10,6    | 18,3     | 24,5     | 22,1     |
|   | Mediana          | 57750,0             | 76550,0    | 76450,0 | 64100,0  | 68150,0  | 63100,0  |

### B. Administración de insulina lispro Humalog® con o sin diversas dosis de rHuPH20

5 Se administró a voluntarios sanos 30 µl o 120 µl de insulina lispro Humalog® (diluida a 50 U/ml) con una concentración final de 0 µg/ml, 0,078 µg/ml, 0,3 µg/ml, 1,2 µg/ml, 5 µg/ml o 20 µg/ml de rHuPH20 (aproximadamente 0 U/ml, 9,36 U/ml, 36 U/ml, 144 U/ml, 600 U/ml o 2.400 U/ml, respectivamente). Por lo tanto, se administró a los voluntarios 30 µl que contenían 1,5 U de insulina lispro Humalog® con aproximadamente 0, 0,28, 1,08, 4,32, 18 o 72 Unidades de rHuPH20, o 120 µl que contenían 6 U de insulina lispro Humalog® con aproximadamente 0, 1,12, 4,32, 17,28, 72 o 288 Unidades de rHuPH20. La Tabla 19e expone los parámetros farmacocinéticos medidos para los  
10 sujetos que recibieron 6 U de insulina lispro Humalog®. Sobre las dosis ensayadas, todas las concentraciones de rHuPH20 mayores de 0,3 µg/ml fueron eficaces de forma similar.

**Tabla 19e. Parámetros PK de insulina para 6 U de insulina lispro Humalog® con diversas dosis de rHuPH20**

| Variable (unidades)                       | Estadística           | Cantidad de rHuPH20 |             |            |             |            |             |
|---|-----------------------|---------------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
|   |                       | 0 µg/ml             | 0,08 µg/ml  | 0,31 µg/ml | 1,25 µg/ml  | 5 µg/ml    | 20 µg/ml    |
| <b>C<sub>máx</sub></b> (pmol/l)           | N                     | 4                   | 4           | 4          | 4           | 4          | 4           |
|   | Media Geométrica      | 381,8               | 355,9       | 435,1      | 483,7       | 579,5      | 463,6       |
|   | % de CV               | 13                  | 21          | 26         | 23          | 29         | 32          |
|   | Mediana               | 385                 | 376         | 463        | 506         | 532        | 438,8       |
| <b>t<sub>máx</sub></b> (minutos)          | N                     | 4                   | 4           | 4          | 4           | 4          | 4           |
|   | Media Aritmética (DT) | 67,5 (8,7)          | 36,3 (10,3) | 33,8 (7,5) | 41,3 (14,4) | 33,8 (7,5) | 40,0 (15,8) |
|   | % de CV               | 13                  | 28          | 22         | 35          | 22         | 40          |
|   | Mediana               | 67,5                | 37,5        | 30         | 37,5        | 30         | 37,5        |
| <b>t<sub>50%</sub> temprano</b> (minutos) | N                     | 4                   | 4           | 4          | 4           | 4          | 4           |
|   | Media Aritmética (DT) | 25,9 (2,8)          | 15,6 (2,6)  | 15,2 (3,2) | 17,0 (1,0)  | 16,0 (4,5) | 15,6 (0,8)  |
|   | % de CV               | 11                  | 17          | 21         | 6           | 28         | 5           |
|   | Mediana               | 26,1                | 16,4        | 14,8       | 16,5        | 15,7       | 15,8        |

| Variable<br>(unidades)                      | Estadística           | Cantidad de rHuPH20 |             |             |             |             |             |
|---|-----------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|   |                       | 0 µg/ml             | 0,08 µg/ml  | 0,31 µg/ml  | 1,25 µg/ml  | 5 µg/ml     | 20 µg/ml    |
| <b>t<sub>50%</sub> tardío</b><br>(minutos)  | N                     | 4                   | 4           | 4           | 4           | 4           | 4           |
|   | Media Aritmética (DT) | 120,0 (10,5)        | 85,6 (17,4) | 92,8 (23,5) | 85,4 (20,9) | 80,4 (11,6) | 77,1 (21,8) |
|   | % de CV               | 9                   | 20          | 25          | 25          | 14          | 28          |
|   | Mediana               | 120                 | 79,8        | 88,0        | 82,2        | 83,1        | 77,2        |
| <b>ABC<sub>0-60</sub></b><br>(min*pmol/l)   | N                     | 4                   | 4           | 4           | 4           | 4           | 4           |
|   | Media Geométrica      | 11658               | 14886       | 18299       | 19494       | 23424       | 18523       |
|   | % de CV               | 18                  | 20          | 22          | 17          | 27          | 25          |
|   | Mediana               | 11600               | 16150       | 19400       | 20050       | 22150       | 17650       |
| <b>ABC<sub>último</sub></b><br>(min*pmol/l) | N                     | 4                   | 4           | 4           | 4           | 4           | 4           |
|   | Media Geométrica      | 38590               | 30890       | 41165       | 39504       | 47405       | 36705       |
|   | % de CV               | 9                   | 10          | 33          | 14          | 17          | 12          |
|   | Mediana               | 39200               | 30950       | 36350       | 38150       | 4610        | 35700       |

### Ejemplo 2

#### 5 Generación de una línea celular que expresa rHuPH20 soluble

Se usó el plásmido HZ24 (expuesto en SEC ID N°: 52) para transfectar ovario de hámster chino (células CHO) (véase, por ejemplo Solicitudes de Patente de Estados Unidos N° 10.795.095, 11/065.716 y 11/238.171). El vector plasmídico HZ24 para expresión de rHuPH20 soluble contiene una cadena principal de vector pCI (Promega), ADN que codifica los aminoácidos 1482 de hialuronidasa PH20 humana (SEC ID N°: 49), un sitio de entrada ribosómica interno (IRES) del virus ECMV (*Clontech*) y el gen de la dihidrofolato reductasa de ratón (DHFR). La cadena principal del vector pCI también incluye ADN que codifica el gen de resistencia a Beta-lactamasa (AmpR), un origen fl de replicación, una región promotora/potenciadora temprana inmediata de citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El ADN que codifica la construcción de rHuPH20 soluble contiene un sitio NheI y una secuencia consenso de Kozak antes del ADN que codifica la metionina en la posición del aminoácido 1 de la secuencia señal de 35 aminoácidos nativa de PH20 humana, y un codón de parada después del ADN que codifica la tirosina correspondiente a la posición de aminoácido 482 de la hialuronidasa PH20 humana (expuesta en SEC ID N°: 1), seguido de un sitio de restricción BamHI. La construcción pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24), por lo tanto, da como resultado una única especie de ARNm conducida por el promotor de CMV que codifica los aminoácidos 1-482 de PH20 humana (expuesta en SEC ID N°: 3) y los aminoácidos 1-186 de dihidrofolato reductasa de ratón (expuesta en SEC ID N°: 53), separada por el sitio de entrada ribosómica interno (IRES).

Se sembraron células CHO DG44 no transfectadas que crecían en medio CD-CHO modificado por GIBCO para células DHFR(-), complementado con glutamina 4 mM y Pluronic F68/L 18 ml/l (Gibco) a  $0,5 \times 10^6$  células/ml en un matraz de agitación en preparación para la transfección. Las células se cultivaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> 5 % en un incubador humidificado, agitando a 120 rpm. Se ensayaron células CHO DG44 no transfectadas con crecimiento exponencial con respecto a viabilidad antes de la transfección.

Se sedimentaron sesenta millones de células viables del cultivo de células CHO DG44 no transfectadas y se resuspendieron a una densidad de  $2 \times 10^7$  células en 0,7 ml de tampón de transfección 2x (2x HeBS: HEPES 40 mM, pH 7,0, NaCl 274 mM, KCl 10 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,4 mM, dextrosa 12 mM). A cada alícuota de células resuspendidas, se añadieron 0,09 ml (250 µg) del plásmido HZ24 lineal (linealizado por digestión durante una noche con Cla I (New England Biolabs) y las soluciones de ADN/células se transfirieron a cubetas de electroporación BTX (Gentronics) de 0,4 cm de hueco a temperatura ambiente. Se realizó electroporación de control negativo sin ADN plasmídico mezclado con las células. Las mezclas de células/plásmidos se sometieron a electroporación con una

descarga de capacitor de 330 V y 960  $\mu$ F o a 350 V y 960  $\mu$ F.

5 Las células se retiraron de las cubetas después de electroporación y se transfirieron a 5 ml de medio CD-CHO modificado para células DHFR(-), complementado con glutamina 4 mM y Pluronic F68/L 18 ml/l (Gibco), y se permitió que crecieran en un pocillo de una placa de cultivo tisular de 6 pocillos sin selección durante 2 días a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % en un incubador humidificado.

10 Dos días después de la electroporación, se retiraron 0,5 ml de medio de cultivo tisular de cada pocillo y se ensayaron con respecto a la presencia de actividad hialuronidasa, usando el ensayo de microturbidez descrito en el Ejemplo 5. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

**Tabla 20. Actividad hialuronidasa inicial de células CHO DG44 transfectadas con HZ24 a las 40 horas después de la transfección**

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

15 Se recogieron células de la transfección 2 (350V) del pocillo de cultivo tisular, se contaron y se diluyeron a  $1 \times 10^4$  hasta  $2 \times 10^4$  células viables por ml. Se transfirió un alícuota de 0,1 ml de la suspensión celular a cada pocillo de cinco placas de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron cien microlitros de medio CD-CHO (GIBCO) que contenía complemento GlutaMAX™-1 4 mM (GIBCO™, Invitrogen Corporation) y sin complementos de hipoxantina y timidina a los pocillos que contenían células (volumen final 0,2 ml).

20 Se identificaron diez clones de las 5 placas cultivadas sin metotrexato (Tabla 21).

**Tabla 21. Actividad hialuronidasa de clones identificados**

| Placa/Pocillo ID | Hialuronidasa Relativa |
|------------------|------------------------|
| 1C3              | 261                    |
| 2C2              | 261                    |
| 3D3              | 261                    |
| 3E5              | 243                    |
| 3C6              | 174                    |
| 2G8              | 103                    |
| 1B9              | 304                    |
| 2D9              | 273                    |
| 4D10             | 302                    |

25 Se expandieron seis clones de HZ24 en cultivo y se transfieren a matraces de agitación como suspensiones celulares individuales. Los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11 y 4D10 se sembraron en placas de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos usando una estrategia de dilución infinita bidimensional en la que las células se diluyeron 1:2 hacia abajo en la placa, y 1:3 en horizontal en la placa, comenzando a 5.000 células en el pocillo superior izquierdo. Los clones diluidos se cultivaron en un fondo de 500 células CHO DG44 no transfectadas por pocillo, para proporcionar los factores de crecimiento necesarios para los días iniciales de cultivo. Se realizaron diez placas por subclón, conteniendo 5 placas metotrexato 50 nM y 5 placas sin metotrexato.

30 El clon 3D3 produjo 24 subclones visuales (13 del tratamiento sin metotrexato, y 11 del tratamiento con metotrexato a 50 nM). 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 tisular T-25. Se expandieron clones aislados del protocolo de tratamiento con metotrexato en presencia de metotrexato 50 nM. Se expandió adicionalmente el clon 3D35M en metotrexato 500 nM dando lugar a clones que producían un exceso de 1.000  
35 Unidades/ml en matraces de agitación (clon 3D35M, o Gen1 3D35M). Se preparó después un banco de células maestro (MCB) de las células 3D35M.

**Ejemplo 3****Determinación de la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble**

5 Se determinó la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble en muestras tales como cultivos celulares, fracciones de purificación y soluciones purificadas usando un ensayo turbidimétrico, que se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une con la albúmina de suero. La actividad se mide incubando rHuPH20 soluble con hialuronato sódico (ácido hialurónico) durante un periodo de tiempo determinado (10 minutos) y precipitando después el hialuronato sódico no digerido con la adición de albúmina de suero acidificada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nM después de un periodo de desarrollo de 30 minutos. La reducción de la turbidez resultante de la actividad enzimática en el sustrato de hialuronato sódico es una medida de la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble. El método se realiza usando una curva de calibración generada con diluciones de un patrón de referencia de trabajo del ensayo de rHuPH20 soluble, y se realizan mediciones de la actividad de la muestra en relación con esta curva de calibración.

15 Se prepararon diluciones de la muestra en solución diluyente de enzima. La solución diluyente de enzima se preparó disolviendo  $33,0 \pm 0,05$  mg de gelatina hidrolizada en 25,0 ml del tampón de reacción PIPES 50 mM (NaCl 140 mM, PIPES 50 mM, pH 5,5) y 25,0 ml de SWFI, y diluyendo 0,2 ml de solución de buminato 25 % en la mezcla y agitando vorticialmente durante 30 segundos. Esto se realizó en un periodo de 2 horas de uso y se almacenó en hielo hasta que fue necesario. Las muestras se diluyeron hasta una estimación de 1-2 U/ml. En general, la dilución máxima por etapa no excedió 1:100 y el tamaño de muestra inicial para la primera dilución no fue menor de 20  $\mu$ l. Los volúmenes de muestra mínimos necesarios para realizar el ensayo fueron: muestras en proceso, fracciones de FPLC: 80  $\mu$ l; sobrenadantes de cultivo tisular: 1 ml; material concentrado 80  $\mu$ l; material de etapa final o purificado: 80  $\mu$ l. Las diluciones se realizaron por triplicado en una placa de 96 pocillos de unión de baja proteína, y se transfirieron 30  $\mu$ l de cada dilución se transfieren a placas de fondo transparente/negro Optilux (BD Biosciences).

20 Se prepararon diluciones de rHuPH20 soluble conocida con una concentración de 2,5 U/ml en solución diluyente de enzima para generar una curva patrón y se añadió a la placa Optilux por triplicado. Las diluciones incluían 0 U/ml, 0,25 U/ml, 0,5 U/ml, 1,0 U/ml, 1,5 U/ml, 2,0 U/ml y 2,5 U/ml. Se incluyeron pocillos de "Reactivo blanco" que contenían 60  $\mu$ l de solución diluyente de enzima en la placa como control negativo. La placa se cubrió después y se calentó en un bloque térmico durante 5 minutos a 37 °C. Se retiró la cubierta y la placa se agitó durante 10 segundos. Después de agitar, la placa se devolvió al bloque térmico y se preparó el dispositivo de manipulación de líquidos MULTIDROP 384 con la solución de hialuronato sódico 0,25 mg/ml caliente (preparada disolviendo 100 mg de hialuronato sódico (LifeCore Biomedical) en 20,0 ml de SWFI. Esto se mezcló rotando suavemente y/o meciendo a 2-8 °C durante 2-4 horas, o hasta que se disolvió completamente). La placa de reacción se transfirió al MULTIDROP 384 y la reacción se inició presionando el botón de inicio para distribuir 30  $\mu$ l de hialuronato sódico en cada pocillo. La placa se retiró del MULTIDROP 384 y se agitó durante 10 segundos antes de transferirse a un bloque térmico con la cubierta de la placa recolocada. La placa se incubó a 37 °C durante 10 minutos.

30 El MULTIDROP 384 se preparó para detener la reacción preparando la máquina con Solución de Trabajo de Suero y cambiando el ajuste de volumen a 240  $\mu$ l. (25 ml de Solución de Reserva de Suero [1 volumen de suero de caballo (Sigma) se diluyó con 9 volúmenes de solución de tampón de acetato 500 mM y el pH se ajustó a 3,1 con ácido clorhídrico] en 75 ml de solución de tampón de acetato 500 mM). La placa se retiró del bloque térmico y se colocó en el MULTIDROP 384 y se dispersaron 240  $\mu$ l de soluciones de trabajo de suero en los pocillos. La placa se retiró y se agitó en un lector de placas durante 10 segundos. Después de otros 15 minutos, se midió la turbidez de las muestras a 640 nM y se determinó la actividad hialuronidasa (en U/ml) de cada muestra ajustando a la curva patrón.

35 Se calculó la actividad específica (Unidades/mg) dividiendo la actividad hialuronidasa (U/ml) por la concentración proteica (mg/ml).

**Ejemplo 4****Producción y Purificación de sPH20 Humana Gen1****55 A. Proceso de Biorreactor de 5 l**

Se descongeló un frasco de 3D35M y se expandió de matraces de agitación a través de matraces de agitación de 1 l en medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad Calif.) complementado con metotrexato 100 nM y GlutaMAX™-1 (Invitrogen). Las células se transfirieron de matraces de agitación a un biorreactor de 5 l (Braun) a una densidad de inoculación de  $4 \times 10^5$  células viables por ml. Los parámetros fueron punto establecido de temperatura 37 °C, pH 7,2 (punto establecido de partida), con punto establecido de oxígeno disuelto 25 % y una superposición de aire de 0-100  $\text{cm}^3/\text{min}$ . A las 168 horas, se añadieron 250 ml de medio de suministro N° 1 (CD CHO con glucosa 50 g/l). A las 216 horas, se añadieron 250 ml de medio de suministro N° 2 (CD CHO con glucosa 50 g/l y butirato sódico 10 mM), y a las 264 horas se añadieron 250 ml de medio de suministro N° 2. Este proceso dio como resultado una productividad final de 1600 Unidades por ml con una densidad celular máxima de  $6 \times 10^6$  células/ml. La adición de butirato sódico

fue para potenciar drásticamente la producción de rHuPH20 soluble en los estadios finales de producción.

Los medios acondicionados del clon 3D35M se clarificaron por filtración profunda y diafiltración de flujo tangencial en HEPES 10 mM pH 7,0. Después se purificó rHuPH20 soluble por cromatografía secuencial en intercambio iónico de Q Sepharose (Pharmacia), cromatografía de interacción hidrófoba de fenil Sepharose (Pharmacia), fenil boronato (Prometics) y cromatografía de hidroxiapatita (Biorad, Richmond, CA).

La rHuPH20 soluble se unió a Q Sepharose y se eluyó a NaCl 400 mM en el mismo tampón. El eluato se diluyó con sulfato de amonio 2 M a una concentración final de sulfato de amonio 500 mM y se pasó a través de una columna de fenil Sepharose (baja sub), seguido de unión en las mismas condiciones con una resina de fenil boronato. La rHuPH20 soluble se eluyó de la resina de fenil Sepharose en HEPES pH 6,9, después de lavar a pH 9,0 en bicina 50 mM sin sulfato de amonio. El eluato se cargó en una resina de hidroxiapatita cerámica a pH 6,9 en fosfato potásico 5 mM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM y se eluyó con fosfato potásico 80 mM, pH 7,4 con CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM.

La rHuPH20 soluble purificada resultante poseía una actividad específica de más de 65.000 Unidades USP/mg de proteína por medio del ensayo de microturbidez (Ejemplo 3) usando el patrón de referencia USP. La SPH20 purificada eluyó como un único pico de 24 a 26 minutos de una columna de estireno divinilbenceno 5RPC de Pharmacia con una gradiente entre TFA 0,1 %/H<sub>2</sub>O y TFA 0,1 %/acetónitrilo 90 %/H<sub>2</sub>O 10% y se resolvió como una única banda amplia de 61 kDa por electroforesis SDS que se redujo a una banda de 51 kDa fina tras el tratamiento con PNGASA-F. La secuenciación de aminoácidos N-terminales reveló que el péptido líder se había retirado eficazmente.

#### **B. Proceso de Expansión de Cultivo Celular Cadena Arriba en Cultivo Celular de Biorreactor de 100 l**

Se usó un proceso de escala aumentada para purificar por separado rHuPH20 soluble de cuatro frascos diferentes de células 3D35M para producir 4 lotes separados de sHuPH20; HUA0406C, HUA0410C, HUA0415C y HUA0420C. Cada frasco se expandió por separado y se cultivó a través de un biorreactor de 125 l, después se purificó usando cromatografía en columna. Se tomaron muestras a lo largo del proceso para evaluar dichos parámetros como el rendimiento enzimático. La descripción del proceso proporcionado posteriormente expone especificaciones representativas para cosas tales como los volúmenes de medio de inicio y alimentación del biorreactor, densidades de células de transferencia, y volúmenes de lavado y elución. Los números exactos varían ligeramente con cada lote, y se detallan en las Tablas 24 a 30.

Se descongelaron cuatro frascos de células 3D35M en un baño de agua a 37 °C, se añadió CD CHO que contenía metotrexato 100 nM y GlutaMAX 40 ml/l y las células se centrifugaron. Las células se resuspendieron en un matraz de agitación de 125 ml con 20 ml de medio nuevo y se colocan en un incubador de CO<sub>2</sub> a 7 %, a 37 °C. Las células se expandieron hasta 40 ml en el matraz de agitación de 125 ml. Cuando la densidad celular alcanzó 1,5-2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 125 ml en un volumen de cultivo de 100 ml. El matraz se incubó a 37 °C, CO<sub>2</sub> 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó 1,5-2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, el cultivo se expandió a un matraz de agitación de 250 ml en volumen de cultivo de 200 ml, y el matraz se incubó a 37 °C, CO<sub>2</sub> 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó 1,5-2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, el cultivo se expandió a un matraz de agitación de 1 l en un volumen de cultivo de 800 ml y se incubó a 37 °C, CO<sub>2</sub> 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó 1,5-2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, el cultivo se expandió a un matraz de agitación de 6 l en un volumen de cultivo de 5 l y se incubó a 37 °C, CO<sub>2</sub> 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó 1,5-2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 36 l en un volumen de cultivo de 20 l y se incubó a 37 °C, CO<sub>2</sub> 7 %.

Se esterilizó un reactor de 125 l con vapor a 121 °C, 137,90 kPa y se añadieron 65 l de medio CD CHO. Antes de su uso, el reactor se comprobó con respecto a contaminación. Cuando la densidad celular en los matraces de agitación de 36 l alcanzaron 1,8-2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, se transfirieron 20 l de cultivo celular de los matraces de agitación de 36 l al biorreactor de 125 l (Braun), dando como resultado un volumen final de 85 l y una densidad de siembra de aproximadamente 4 x 10<sup>5</sup> células/ml. Los parámetros fueron punto establecido de temperatura, 37 °C; pH: 7,2; oxígeno disuelto: 25 % ± 10%; velocidad del impulsor 50 rpm; presión del recipiente 20,68 kPa; chorro de aire 1 l/min; superposición de aire: 1 l/min. Se tomaron muestras de reactor diariamente para recuentos celulares, verificación de pH, análisis de medios, producción y retención de proteínas. Se añadieron alimentos nutrientes durante el ciclo. El día 6, se añadieron 3,4 l del medio de suministro N° 1 (CD CHO + glucosa 50 g/l + GlutaMAX™-1 40 ml/l), y la temperatura de cultivo se cambió a 36,5 °C. El día 9, se añadieron 3,5 l de Suministro N° 2 (CD CHO + 50 glucosa g/l + GlutaMAX™-1 40 ml/l + butirato sódico 1,1 g/l), y la temperatura de cultivo se cambió a 36 °C. El día 11, se añadieron 3,7 l de Suministro N° 3 (CD CHO + glucosa 50 g/l + GlutaMAX™-1 40 ml/l + butirato sódico 1,1 g/l), y la temperatura de cultivo se cambió a 35,5 °C. El reactor se recogió a los 14 días o cuando la viabilidad de las células descendió por debajo del 50 %. El proceso dio como resultado la producción de rHuPH20 soluble con una actividad enzimática de 1.600 unidades/ml con una densidad celular máxima de 8 millones de células/ml. En la recogida, se tomaron muestras del cultivo con respecto a microplasma, carga biológica, endotoxina y virus *in vitro* e *in vivo*, microscopía electrónica de transmisión (TEM) con respecto a partículas virales y la actividad enzimática.

La recogida de cultivo celular del biorreactor de cien litros se filtró a través de una serie de filtros de cápsula desechables que tenían un medio de polietersulfona (Sartorius): en primer lugar a través de una cápsula de 8,0 µm

de profundidad, una cápsula de 0,65  $\mu\text{m}$  de profundidad, una cápsula de 0,22  $\mu\text{m}$  y finalmente a través de un filtro de 2.000  $\text{cm}^2$  Sartopore de 0,22  $\mu\text{m}$  y a una bolsa de almacenamiento estéril de 100 l. El cultivo se concentró 10x usando dos TFF con filtros MWCO de 30 kDa de polietersulfona espirales (Millipore), seguido de un intercambio de tampón 6x con HEPES 10 mM,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  25 mM, pH 7,0 a un filtro final de 0,22  $\mu\text{m}$  en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 l. La Tabla 22 proporciona datos de control relacionados con las etapas de cultivo celular, recogida, concentración e intercambio de tampón.

**Tabla 22. Datos de control para las etapas de cultivo celular, recogida, concentración e intercambio de tampón**

| Parámetro  | HUA0406C | HUA04010C | HUA0415C | HUA0420C |
|--|----------|-----------|----------|----------|
| Tiempo desde la descongelación hasta inocular el biorreactor de 100 l (días) | 21       | 19        | 17       | 18       |
| Densidad de inoculación de 100 l ( $\times 10^6$ células/ml)                 | 0,45     | 0,33      | 0,44     | 0,46     |
| Tiempo de duplicación en crecimiento logarítmico (h)                         | 29,8     | 27,3      | 29,2     | 23,5     |
| Densidad celular máxima ( $\times 10^6$ células/ml)                          | 5,65     | 8,70      | 6,07     | 9,70     |
| Viabilidad de recogida (%)   | 41       | 48        | 41       | 41       |
| Título de recogida (U/ml)  | 1964     | 1670      | 991      | 1319     |
| Tiempo en biorreactor de 100 l (días)  | 13       | 13        | 12       | 13       |
| Volumen de recogida clarificado (ml)   | 81800    | 93300     | 91800    | 89100    |
| Ensayo enzimático de recogida clarificada (U/ml)                             | 2385     | 1768      | 1039     | 1425     |
| Ensayo enzimático concentrado (U/ml)   | 22954    | 17091     | 8561     | 17785    |
| Ensayo enzimático concentrado con tampón intercambiado (U/ml)                | 15829    | 11649     | 9915     | 8679     |
| Ensayo enzimático concentrado con tampón intercambiado filtrado (U/ml)       | 21550    | 10882     | 9471     | 8527     |
| Volumen de concentrado con tampón intercambiado (ml)                         | 10699    | 13578     | 12727    | 20500    |
| Relación de concentración de unidades enzimáticas/recogida                   | 0,87     | 0,96      | 1,32     | 1,4      |

Se preparó una columna de intercambio iónico de Q Sepharose (Pharmacia) (3 l de resina, altura = 20 cm, diámetro = 14 cm). Se recogieron muestras de lavado para una determinación de pH, conductividad y ensayo de endotoxina (LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  20 mM, pH 7,5. La recogida diafiltrada, concentrada se cargó en la columna Q a un caudal de 100  $\text{cm}^3/\text{h}$ . La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  20 mM, pH 7,5 y HEPES 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. La proteína se eluyó con HEPES 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0 y se filtró a través de un filtro final de 0,22  $\mu\text{m}$  a una bolsa estéril.

A continuación se realizó una cromatografía de interacción hidrófoba de Fenil-Sepharose (Pharmacia). Se preparó una columna de Fenil-Sepharose (PS) (9,1 l de resina, altura = 29 cm, diámetro = 20 cm). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato potásico 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM, pH 7,0. El eluato de proteína de antes se complementó con sulfato de amonio 2 M, fosfato potásico 1 M y soluciones de reserva de  $\text{CaCl}_2$  1 M hasta concentraciones finales de 5 mM, 0,5 M y 0,1 mM, respectivamente. La proteína se cargó en la columna de PS a un caudal de 100  $\text{cm}^3/\text{h}$ . Se añadió fosfato potásico 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM pH 7,0 a 100  $\text{cm}^3/\text{h}$ . El flujo continuo se pasó a través de un filtro final de 0,22  $\mu\text{m}$  a una bolsa estéril.

La proteína purificada por PS se cargó después en una columna de aminofenil boronato (ProMedics) (6,3 l de resina, altura = 20 cm, diámetro = 20 cm) que se había equilibrado con 5 volúmenes de columna de fosfato potásico 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. La proteína se pasó a través de la columna a un caudal de 100  $\text{cm}^3/\text{h}$ , y la columna se lavó con fosfato potásico 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. La columna se lavó después con bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9,0 y la proteína se eluyó con HEPES 50 mM, NaCl 100 mM pH 6,9 a través de un filtro estéril y a una bolsa estéril de 20 l. El eluato se ensayó con respecto a carga biológica, concentración proteica y actividad enzimática.

Se equilibró una columna de hidroxapatita (HAP) (BioRad) (1,6 l de resina, altura = 10 cm, diámetro = 14 cm) con fosfato potásico 5 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, pH 7,0. Las muestras de lavado se recogieron y se ensayaron con respecto a pH, conductividad y ensayo de endotoxina (LAL). La proteína purificada con aminofenil boronato se complementó con fosfato potásico y CaCl<sub>2</sub> para producir concentraciones finales de fosfato potásico 5 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM y se cargó en la columna de HAP a un caudal de 100 cm/h. La columna se lavó con fosfato potásico 5 mM, pH 7,0, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, después fosfato potásico 10 mM pH 7,0, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM pH. La proteína se eluyó con fosfato potásico 70 mM pH 7,0 y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm a una bolsa de almacenamiento estéril de 5 l. El eluato se ensayó con respecto a carga biológica, concentración de proteínas y actividad enzimática.

La proteína purificada por HAP se bombeó después a través de un filtro de retirada viral 20 nM mediante un tanque de presión. La proteína se añadió al tanque de presión DV20 y filtro (Pall Corporation), pasando a través de un filtro DV20 Ultipor con poros de 20 nm (Pall Corporation) a una bolsa de almacenamiento de 20 l estéril. El filtrado se ensayó con respecto a concentración de proteínas, actividad enzimática, perfil de oligosacáridos, monosacáridos y ácido siálico, e impurezas relacionadas con el proceso. La proteína en el filtrado se concentró después a 1 mg/ml usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) de corte de Sartocom de 10 kD de punto de corte de peso molecular (MWCO) (Sartorius). El filtro se preparó en primer lugar lavando con una solución de HEPES/solución salina (HEPES 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7,0) y se tomaron muestras de permeado para pH y conductividad. Después de la concentración, se tomaron muestras de la proteína concentrada y se ensayó con respecto a concentración de proteínas y actividad enzimática. Se realizó un intercambio de tampón 6x en la proteína concentrada al tampón final: HEPES 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7,0. La proteína concentrada se pasó a través de un filtro de 0,22 µm a una bolsa de almacenamiento estéril de 20 litros. Se tomaron muestras de la proteína y se ensayaron con respecto a concentración de proteínas, actividad enzimática, grupos de sulfhidrilo libres, perfiles de oligosacáridos y osmolaridad.

Las Tablas 23 a 29 proporcionan datos de control relacionados con cada una de las etapas de purificación descritas anteriormente, para cada lote de células 3D35M.

**Tabla 23. Datos de columna de Q sepharose**

| Parámetro                                      | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|--|----------|----------|----------|----------|
| Volumen de carga (ml)                          | 10647    | 13524    | 12852    | 20418    |
| Relación de Volumen de Carga/Volumen de Resina | 3,1      | 4,9      | 4,5      | 7,3      |
| Volumen de Columna (ml)                        | 2770     | 3840     | 2850     | 2880     |
| Volumen de Eluato (ml)                         | 6108     | 5923     | 5759     | 6284     |
| Concentración de Proteínas de Eluato (mg/ml)   | 2,8      | 3,05     | 2,80     | 2,86     |
| Ensayo de Enzima de Eluato (U/ml)              | 24493    | 26683    | 18321    | 21052    |
| Rendimiento Enzimático (%)                     | 65       | 107      | 87       | 76       |

**Tabla 24. Datos de columna de Fenil Sepharose**

| Parámetro  | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|--|----------|----------|----------|----------|
| Volumen antes de la Adición de Solución Madre (ml) | 5670     | 5015     | 5694     | 6251     |
| Volumen de carga (ml)                              | 7599     | 6693     | 7631     | 8360     |
| Volumen de Columna (ml)                            | 9106     | 9420     | 9340     | 9420     |
| Relación de Volumen de Carga/Volumen de Resina     | 0,8      | 0,71     | 0,82     | 0,89     |
| Volumen de Eluato (ml)                             | 16144    | 18010    | 16960    | 17328    |
| Cono Proteico de Eluato (mg/ml)                    | 0,4      | 0,33     | 0,33     | 0,38     |
| Ensayo de Enzima de Eluato (U/ml)                  | 8806     | 6585     | 4472     | 7509     |
| Rendimiento Proteico (%)                           | 41       | 40       | 36       | 37       |
| Rendimiento Enzimático (%)                         | 102,     | 88       | 82       | 96       |

**Tabla 25. Datos de Columna de Amino Fenil Boronato**

| Parámetro  | HUA0406C       | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|--|----------------|----------|----------|----------|
| Volumen de carga (ml)                              | 16136          | 17958    | 16931    | 17884    |
| Relación de Volumen de Carga/Volumen de Resina     | 2,99           | 3,15     | 3,08     | 2,98     |
| Volumen de Columna (ml)                            | 5400           | 5700     | 5500     | 5300     |
| Volumen de Eluato (ml)                             | 17595          | 22084    | 20686    | 19145    |
| Concentración Proteica de Eluato (mg/ml)           | 0,0            | 0,03     | 0,03     | 0,04     |
| Concentración Proteica del Eluato filtrado (mg/ml) | no ensayado    | 0,03     | 0,00     | 0,04     |
| Ensayo de Enzima de Eluato (U/ml)                  | 4050           | 2410     | 1523     | 4721     |
| Rendimiento Proteico (%)                           | 0              | 11       | 11       | 12       |
| Rendimiento Enzimático (%)                         | no determinado | 41       | 40       | 69       |

**Tabla 26. Datos de columna de Hidroxiapatita**

| Parámetro  | HUA0406C    | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|--|-------------|----------|----------|----------|
| Volumen antes de la Adición de Solución Madre (ml) | 16345       | 20799    | 20640    | 19103    |
| Relación de Volumen de Carga/Volumen de Resina     | 10,95       | 13,58    | 14,19    | 12,81    |
| Volumen de Columna (ml)                            | 1500        | 1540     | 1462     | 1500     |
| Volumen de carga (ml)                              | 16429       | 20917    | 20746    | 19213    |
| Volumen de Eluato (ml)                             | 4100        | 2415     | 1936     | 2419     |
| Concentración Proteica de Eluato (mg/ml)           | no ensayado | 0,24     | 0,17     | 0,23     |
| Concentración Proteica del Eluato filtrado (mg/ml) | ND          | ND       | 0,17     | ND       |
| Ensayo Enzimático del Eluato (U/ml)                | 14051       | 29089    | 20424    | 29826    |
| Rendimiento Proteico (%)                           | no ensayado | 93       | 53       | 73       |
| Rendimiento Enzimático (%)                         | 87          | 118      | 140      | 104      |

5

**Tabla 27. Datos de filtración de DV20**

| Parámetro  | HUA0406C    | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|--|-------------|----------|----------|----------|
| Volumen de Partida (ml)                            | 4077        | 2233     | 1917     | 2419     |
| Volumen de Filtrado (ml)                           | 4602        | 3334     | 2963     | 3504     |
| Concentración Proteica del Filtrado (mg/ml)        | 0,1         | ND       | 0,09     | ND       |
| Concentración Proteica del Eluato Filtrado (mg/ml) | ND          | 0,15     | 0,09     | 0,16     |
| Rendimiento Proteico (%)                           | no ensayado | 93       | 82       | 101      |

**Tabla 28. Datos de Concentración Finales**

| Parámetro                                      | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|--|----------|----------|----------|----------|
| Volumen de Partida (ml)                        | 4575     | 3298     | 2963     | 3492     |
| Volumen de Concentrado (ml)                    | 562      | 407      | 237      | 316      |
| Concentración Proteica del Concentrado (mg/ml) | 0,9      | 1,24     | 1,16     | 1,73     |
| Rendimiento Proteico (%)                       | 111      | 102      | 103      | 98       |



Tabla 29. Intercambio de Tampón en Datos de Formulación Finales

| Parámetro   | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|---|----------|----------|----------|----------|
| Volumen de Partida (ml)                                     | 562      | 407      | 237      | 316      |
| Volumen Final del Concentrado con Tampón Intercambiado (ml) | 594      | 516      | 310      | 554      |
| Concentración Proteica del Concentrado (mg/ml)              |          |          |          |          |
| Concentración Proteica del Concentrado Filtrado (mg/ml)     | 0,95     | 0,92     | 0,95     | 1,02     |
| Rendimiento Proteico (%)                                    | 118      | 99       | 110      | 101      |

La proteína rHuPH20 soluble purificada y concentrada se cargó de forma aséptica en frascos estériles con 5 ml y 1 ml de volúmenes de carga. La proteína se pasó a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  a una bomba controlada por operador que se usó para llenar los frascos usando una lectura gravimétrica. Los frascos se cerraron con tapones y se fijaron con tapas corrugadas. Los frascos cerrados se inspeccionaron visualmente con respecto a partículas ajenas y después se etiquetaron. Después del etiquetado, los frascos se congelaron instantáneamente por inmersión en nitrógeno líquido durante no más de 1 minuto y se almacenaron a  $\leq -15\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $-20 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

## 10 Ejemplo 5

### Producción de células Gen2 que contienen PH20 humana soluble (rHuPH20)

La línea celular 3D35M Gen1 descrita en el Ejemplo 2 se adaptó a niveles de metotrexato mayores para producir clones de generación 2 (Gen2). Se separaron células 3D35M de cultivos que contenían metotrexato establecidos en el medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 1,0  $\mu\text{M}$ . Las células se adaptaron a un nivel de metotrexato mayor cultivando y pasándolas 9 veces durante un periodo de 46 días en un incubador humidificado de  $\text{CO}_2$  al 7 % a 37  $^{\circ}\text{C}$ . La población amplificada de células se clonó limitando la dilución en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían medio con metotrexato 2,0  $\mu\text{M}$ . Después de aproximadamente 4 semanas, se identificaron los clones y se seleccionó el clon 3E10B para expansión. Se cultivaron células 3E10B en medio CD CHO que contenía metotrexato GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 2,0  $\mu\text{M}$  para 20 pases. Se creó un banco de células maestro (MCB) de la línea celular 3E10B y se congeló y se usó para estudios posteriores.

La amplificación de la línea celular continuó cultivando células 3E10B en medio de CD CHO que contenía metotrexato GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 4,0  $\mu\text{M}$ . Después del 12° pase, las células se congelaron en frascos como un banco celular de investigación (RCB). Se descongeló un frasco de RCB y se cultivó en medio que contenía metotrexato 8,0  $\mu\text{M}$ . Después de 5 días, la concentración de metotrexato en el medio se aumentó a 16,0  $\mu\text{M}$ , después 20,0  $\mu\text{M}$  18 días después. Las células del 8° pase en medio que contenía metotrexato 20,0  $\mu\text{M}$  se clonaron por dilución limitante en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían medio CD CHO que contenía metotrexato GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 20,0  $\mu\text{M}$ . Los clones se identificaron 5-6 semanas después y se seleccionó el clon 2B2 para expansión en medio que contenía metotrexato 20,0  $\mu\text{M}$ . Después del 11° pase, se congelaron células 2B2 en frascos como un banco celular de investigación (RCB).

Las células 2B2 resultantes son células CHO DG44 deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr-) que expresan PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20). La PH20 soluble está presente en células 2B2 a un número de copias de aproximadamente 206 copias/célula. El análisis de transferencia de Southern de ADN genómico de células 2B2 digerido con Spe I, Xba I y BamH I/Hind III usando una sonda específica de rHuPH20 reveló el siguiente perfil de digestión de restricción: una banda de hibridación principal de ~7,7 kb y cuatro bandas de hibridación menores (~13,9, ~6,6, ~5,7 y ~4,6 kb) con ADN digerido con Spe I; una banda de hibridación principal de ~5,0 kb y dos bandas de hibridación menores (~13,9 y ~6,5 kb) con ADN digerido con Xba I; y una única banda de hibridación de ~1,4 kb observada usando ADN 2B2 digerido con BamH I/Hind III. El análisis de secuencia del transcrito de ARNm indicó que el ADNc derivado (SEC ID N°: 56) era idéntico a la secuencia de referencia (SEC ID N°: 49), excepto por una diferencia de un par de bases en la posición 1131, que se observó que era una timidina (T) en lugar de la citosina esperada (C). Esta es una mutación silenciosa, sin ningún efecto en la secuencia de aminoácidos.

## 45 Ejemplo 6

### A. Producción de rHuPH20 soluble de Gen2 en cultivo celular de biorreactor de 300 l

Se descongeló un frasco de HZ24-2B2 y se expandió de matraces de agitación a través de matraces de agitación de 36 l en medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA), complementado con metotrexato 20  $\mu\text{M}$  y GlutaMAX-1™ (Invitrogen). Brevemente, se descongeló el frasco de células en un baño de agua a 37  $^{\circ}\text{C}$ , se añadió medio y las células se centrifugaron. Las células se resuspendieron en un matraz de agitación de 125 ml con 20 ml de medio nuevo y se colocó en un incubador de  $\text{CO}_2$  al 7 %, a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Las células se expandieron hasta 40 ml en el matraz de

agitación de 125 ml. Cuando la densidad celular alcanzó más de  $1,5 \times 10^6$  células/ml, se expandió el cultivo a un matraz de agitación de 125 ml en un volumen de cultivo de 100 ml. El matraz se incubó a  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  7 %. Cuando la densidad celular alcanzó más de  $1,5 \times 10^6$  células/ml, el cultivo se expandió a un matraz de agitación de 250 ml en un volumen de cultivo de 200 ml, y el matraz se incubó a  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó más de  $1,5 \times 10^6$  células/ml, el cultivo se expandió a un matraz de agitación de 1 l en 800 ml de volumen de cultivo y se incubó a  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó más de  $1,5 \times 10^6$  células/ml el cultivo se expandió a un matraz de agitación de 6 l en un volumen de cultivo de 5.000 ml y se incubó a  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó más de  $1,5 \times 10^6$  células/ml el cultivo se expandió a un matraz de agitación de 36 l en un volumen de cultivo de 32 l y se incubó a  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  al 7 %.

Se esterilizó un reactor de 400 l y se añadieron 230 ml de medio CD-CHO. Antes de su uso, el reactor se comprobó con respecto a contaminación. Se transfirieron aproximadamente 30 l de células de los matraces de agitación de 36 l al biorreactor de 400 l (Braun) a una densidad de inoculación de  $4,0 \times 10^5$  células viables por ml y un volumen total de 260 l. Los parámetros fueron punto establecido de temperatura,  $37^\circ\text{C}$ ; velocidad del impulsor 40-55 RPM; presión del recipiente: 20,68 kPa; chorro de aire 0,5-1,5 l/min; superposición de aire: 3 l/min. Se tomaron muestras del reactor diariamente con respecto a recuentos celulares, verificación de pH, análisis de medios, producción de proteínas y retención. Además, durante el ciclo se añadieron suministros de nutrientes. A las 120 horas (día 5), se añadieron 10,4 l de medio de suministro N° 1 (CD-CHO 4x + glucosa 33 g/l + Glutamax-1™ 160 ml/l + yeastolato 83 ml/l + rHuInsulina 33 mg/l). A las 168 horas (día 7), se añadieron 10,8 l del suministro N° 2 (CD-CHO 2x + glucosa 33 g/l + Glutamax-1™ 80 ml/l + yeastolato 167 ml/l + butirato sódico 0,92 g/l) y se cambió la temperatura de cultivo a  $36,5^\circ\text{C}$ . A las 216 horas (día 9), se añadieron 10,8 l de suministro N° 3 (CD-CHO 1x + glucosa 50 g/l + Glutamax-1™ 50 ml/l + yeastolato 250 ml/l + butirato sódico 1,80 g/l), y la temperatura de cultivo se cambió a  $36^\circ\text{C}$ . A las 264 horas (día 11), se añadieron 10,8 l de suministro N° 4 (CD-CHO 1x + glucosa 33 g/l + Glutamax-1™ 33 ml/l + yeastolato 250 ml/l + butirato sódico 0,92 g/l), y la temperatura de cultivo se cambió a  $35,5^\circ\text{C}$ . Se observó que la adición de los medios de suministro potenciaba drásticamente la producción de rHuPH20 soluble en los estadios finales de producción. El reactor se recogió a los 14 o 15 días o cuando la viabilidad de las células descendió por debajo del 40 %. El proceso dio como resultado una productividad final de 17.000 Unidades por ml con una densidad celular máxima de 12 millones de células/ml. En la recogida, se tomaron muestras del cultivo para micoplasma, carga biológica, endotoxina y viral *in vitro* e *in vivo*, Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y actividad enzimática.

El cultivo se bombeó por una bomba peristáltica a través de cuatro nódulos del sistema de filtración Millistack (Millipore) en paralelo, conteniendo cada uno una capa de tierras diatomeas graduadas de 4 a  $8\ \mu\text{m}$  y una capa de tierras diatomeas graduadas a 1,4 a  $1,1\ \mu\text{m}$ , seguido de una membrana de celulosa, después a través de un segundo sistema de filtración Millistack individual (Millipore) que contiene una capa de tierras diatomeas graduadas de 0,4 a  $0,11\ \mu\text{m}$  y una capa de tierras diatomeas graduadas a  $< 0,1\ \mu\text{m}$ , seguido de una membrana de celulosa, y después a través de un filtro final de  $0,22\ \mu\text{m}$  a una bolsa flexible de un único uso estéril con una capacidad de 350 l. El fluido de cultivo de células recogidas se complementó con EDTA 10 mM y Tris 10 mM hasta un pH de 7,5. El cultivo se concentró 10x con un aparato de filtración de flujo tangencial (TFF) usando cuatro filtros de poliéter sulfona (PES) de 30 kDa de punto y corte de peso molecular (MWCO) TFF Sartoslice (Sartorius), seguido de un intercambio de tampón 10x con Tris 10 mM,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  20 mM, pH 7,5 a un filtro final de  $0,22\ \mu\text{m}$  a una bolsa de almacenamiento estéril de 50 l.

La recogida diafiltrada, concentrada, se inactivó para virus. Antes de la inactivación viral, se preparó una solución de Triton X-100 10 %, tri (n-butil) fosfato (TNBP) 3 %. La recogida diafiltrada, concentrada se expuso a Triton X-100 1 %, TNBP 0.3 % durante 1 hora en un recipiente de reacción de vidrio de 36 l inmediatamente antes de la purificación en la columna Q.

## B. Purificación de rHuPH20 soluble de Gen2

Se preparó una columna de intercambio iónico de Q Sepharose (Pharmacia) (resina de 9 l, H = 29 cm, D = 20 cm). Las muestras de lavado se recogieron para una determinación de pH, conductividad y ensayo de endotoxinas (LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  20 mM, pH 7,5. Después de la inactivación viral, la recogida concentrada, diafiltrada se cargó en la columna Q a un caudal de 100 cm/h. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  20 mM, pH 7,5 y HEPES 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. La proteína se eluyó con HEPES 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0 en un filtro final de  $0,22\ \mu\text{m}$  a la bolsa estéril. La muestra de eluato se ensayó con respecto a carga biológica, concentración de proteínas y actividad hialuronidasa. Se tomaron lecturas de absorbancia  $A_{280}$  al comienzo y al final del intercambio.

A continuación se realizó una cromatografía de interacción hidrófoba de Fenil-Sepharose (Pharmacia). Se preparó una columna de Fenil-Sepharose (PS) (resina de 19-21 l, H = 29 cm, D = 30 cm). El lavado se recogió y se tomaron muestras de él para pH, conductividad y endotoxina (ensayo de LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato potásico 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM, pH 7,0. El eluato proteico de la columna de Q Sepharose se complementó con sulfato de amonio 2 M, de fosfato potásico 1 M y soluciones madre de  $\text{CaCl}_2$  1 M para producir concentraciones finales de 5 mM, 0,5 M y 0,1 mM, respectivamente. La proteína se cargó en la

columna de PS a un caudal de 100 cm/h y se recogió el flujo continuo de la columna. La columna se lavó con fosfato potásico 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM a pH 7,0 a 100 cm/h y el lavado se añadió al flujo continuo recogido. Combinado con el lavado de columna, el flujo continuo se pasó a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril. Se tomaron muestras de flujo continuo para carga biológica, concentración de proteínas y actividad enzimática.

Se preparó una columna de aminofenil boronato (Prometics). El lavado se recogió y se tomaron muestras de él para pH, conductividad y endotoxina (ensayo de LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato potásico 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. El flujo continuo de PS que contenía proteína purificada se cargó en la columna de la aminofenil boronato a un caudal de 100 cm/h. La columna se lavó con fosfato potásico 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. La columna se lavó con bicina 20 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 9,0. La columna se lavó con bicina 20 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 9,0. La proteína se eluyó con HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, pH 6,9 y se pasó a través de un filtro estéril a una bolsa estéril. La muestra eluida se ensayó con respecto a carga biológica, concentración de proteínas y actividad enzimática.

Se preparó la columna de hidroxiapatita (HAP) (Biorad). El lavado se recogió y se ensayó con respecto a pH, conductividad y endotoxina (ensayo de LAL). La columna se equilibró con fosfato potásico 5 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, pH 7,0. La proteína purificada con aminofenil boronato se complementó hasta concentraciones finales de fosfato potásico 5 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM y se cargó en la columna de HAP a un caudal de 100 cm/h. La columna se lavó con fosfato potásico 5 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM. La columna se lavó a continuación con fosfato potásico 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM. La proteína se eluyó con fosfato potásico 70 mM, pH 7,0 y se pasó a través de un filtro estéril de 0,22 µm a una bolsa estéril. La muestra eluida se ensayó con respecto a carga biológica, concentración de proteínas y actividad enzimática.

La proteína purificada de HAP se pasó después a través de un filtro de retirada viral. El filtro Virosart esterilizado (Sartorius) se preparó en primer lugar lavando con 2 l de fosfato potásico 70 mM, pH 7,0. Antes de su uso, se tomaron muestras del tampón filtrado para pH y conductividad. La proteína purificada de HAP se bombeó mediante una bomba peristáltica a través del filtro de retirada viral de 20 nm. La proteína filtrada en fosfato potásico 70 mM, pH 7,0 se pasó a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril. La muestra filtrada viral se ensayó con respecto a concentración de proteínas, actividad enzimática, perfil de oligosacáridos, monosacáridos y ácido siálico. La muestra también se ensayó con respecto a impurezas relacionadas con el proceso.

La proteína en el filtrado se concentró después a 10 mg/ml usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) de corte Sartocoon de 10 kD de punto de corte peso molecular (MWCO) (Sartorius). El filtro se preparó en primer lugar lavando con histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0 y se tomaron muestras de permeado para pH y conductividad. Después de la concentración, se tomaron muestras de la proteína concentrada y se ensayó con respecto a concentración de proteínas y actividad enzimática. Se realizó un intercambio de tampón 6x en la proteína concentrada al tampón final: histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0. Después del intercambio de tampón, la proteína concentrada se pasó a través de un filtro de 0,22 µm a una bolsa de almacenamiento estéril de 20 l. Se tomaron muestras de la proteína y se ensayó con respecto a concentración de proteínas, actividad enzimática, grupos sulfhidrilo libres, perfiles de oligosacáridos y osmolaridad.

La proteína a granel esterilizada por filtración se dispersó después de forma aséptica a 20 ml en frascos de teflón estériles de 30 ml (Nalgene). Los frascos se congelaron después instantáneamente y se almacenaron a -20±5 °C.

### C. Comparación de la producción y purificación de rHuPH20 soluble de Gen1 y rHuPH20 soluble de Gen2

La producción y purificación de rHuPH20 soluble de Gen2 en un cultivo celular de biorreactor de 300 l contenía algunos cambios en los protocolos en comparación con la producción y purificación de rHuPH20 soluble de Gen1 en un cultivo celular de biorreactor de 100 l (descrito en el Ejemplo 4B). La Tabla 30 expone diferencias ejemplares, además de cambios de aumento de escala sencillos, entre los métodos.

| Diferencia de Proceso                        | rHuPH20 soluble de Gen1                   | rHuPH20 soluble de Gen2   |
|--|---|---|
| Línea celular                                | 3D35M                                     | 2B2   |
| Medio usado para expandir el inóculo celular | Contiene metotrexato 0,10 µM (0,045 mg/l) | Contiene metotrexato 20 µM (9 mg/l)   |
| Medio en cultivos de 6 l en adelante         | Contiene metotrexato 0,10 µM              | No contiene metotrexato   |
| Matraz de agitación de 36 l                  | Sin instrumentación                       | Equipado con instrumentación que controla y monitoriza el pH, oxígeno disuelto, caudal de gas |

ES 2 531 630 T3

| <b>Tabla 30</b>   |  |  |
|---|--|--|
| <b>Diferencia de Proceso</b>                                    | <b>rHuPH20 soluble de Gen1</b>   | <b>rHuPH20 soluble de Gen2</b>   |
|   |  | superpuesto y a chorro.  |
|   | 20 l de volumen operativo  | Volumen operativo de 32 l  |
| Volumen operativo final en el biorreactor                       | Aproximadamente 100 l en un biorreactor de 125 l (volumen de cultivo inicial + 65 l)   | Aproximadamente 300 l en un biorreactor de 400 l (volumen de cultivo inicial + 260 l)  |
| Medio de cultivo en el biorreactor final                        | Sin rHuInsulina  | rHuInsulina 5,0 mg/l   |
| Volumen de suministro de medio                                  | Cambio de escala al 4 % del volumen de cultivo celular del biorreactor es decir 3,4, 3,5 y 3,7 l, dando como resultado un volumen de biorreactor diana de ~92 l. | Cambio de escala al 4 % del volumen de cultivo celular del biorreactor es decir 10,4, 10,8, 11,2 y 11,7 l, dando como resultado un volumen de biorreactor diana de ~303 l.   |
| Suministro de medio   | Medio de suministro N° 1: CD CHO + Glucosa 50 g/l + GlutaMAX™-1 8 mM   | Medio de suministro N° 1: CD CHO 4x + Glucosa 33 g/l + Glutamax 32 mM + Yeastolato 16,6 g/l + rHuInsulina 33 mg/l  |
|   | Suministro N° 2 (CD CHO + Glucosa 50 g/l + GlutaMAX 8 mM + Butirato Sódico 1,1 g/l   | Suministro N° 2: CD CHO 2x + Glucosa 33 g/l + Glutamax 16 mM + Yeastolato 33,4 g/l + Butirato Sódico 0,92 g/l  |
|   | Suministro N° 3: CD CHO + Glucosa 50 g/l + GlutaMAX 8 mM + Butirato Sódico 1,1 g/l   | Suministro N° 3: CD CHO 1x + Glucosa 50 g/l + Glutamax 10 mM + Yeastolato 50 g/l + Butirato Sódico 1,80 g/l  |
|   |  | Suministro N° 4: CD CHO 1x + Glucosa 33 g/l + Glutamax 6,6 mM + Yeastolato 50 g/l + Butirato Sódico 0,92 g/l   |
| Filtración de cultivo celular del biorreactor                   | Cuatro filtros de polietersulfona (8,0 µm, 0,65 µm, 0,22 µm y 0,22 µm) en serie  | 1 <sup>er</sup> estadio – Cuatro módulos en paralelo, cada uno con una capa de tierras diatomeas graduadas a 4-8 µm y una capa de tierras diatomeas graduadas a 1,4-1,1 µm, seguido de una membrana de celulosa<br>2 <sup>o</sup> estadio – Módulo individual que contiene una capa de tierras diatomeas graduadas a 0,4-0,11 µm y una capa de tierras diatomeas graduadas a < 0,1 µm, seguido de una membrana de celulosa<br>3 <sup>er</sup> estadio – Filtro de polietersulfona de 0,22 µm |
|   | Bolsa de almacenamiento de 100 l   | Bolsa de almacenamiento de 300 l   |
|   |  | El cultivo celular recogido se complementa con EDTA 10 mM, Tris 10 mM a un pH de 7,5   |
| Concentración e intercambio de tampón antes de la cromatografía | Concentrado con 2 TFF con filtro de polietersulfona espiral de MWCO de 30 K Millipore  | Concentrado usando cuatro filtros de MWCO de 30 K TFF Sartorius Sartoslice   |
|   | Intercambio de tampón del concentrado 6x con HEPES 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0   | Intercambio de tampón del Concentrado 10x con Tris 10 mM, Na2SO4 20 mM, pH 7,5   |
|   | Bolsa de almacenamiento estéril de 20 l  | Bolsa de almacenamiento estéril de 50 l  |
| Inactivación viral antes de la cromatografía                    | Ninguna  | Inactivación viral realizada con la adición de un Triton X-100 1 %, Tributill Fosfato 0,3 %, pH 7,5  |
| 1 <sup>a</sup> Etapa de purificación (Q sepharose)              | Sin lectura de absorbancia   | Mediciones A280 al comienzo y al final   |
| Filtración viral después de la cromatografía                    | Filtro Pall DV-20 (20 nm)  | Filtro Vilosart Sartorius (20 nm)  |

| Tabla 30  |  |   |
|---|--|---|
| Diferencia de Proceso   | rHuPH20 soluble de Gen1                | rHuPH20 soluble de Gen2                     |
| Concentración e intercambio de tampón después de la cromatografía | Tampón de HEPES/solución salina pH 7,0 | Tampón de histidina/solución salina, pH 6,0 |
|   | Proteína concentrada a 1 mg/ml         | Proteína concentrada a 10 mg/ml             |

### Ejemplo 7

#### Determinación del contenido de ácido siálico y monosacáridos

5 El contenido de ácido siálico y monosacáridos de rHuPH20 soluble puede evaluarse por cromatografía líquida de fase inversa (RPLC) después de hidrólisis con ácido trifluoroacético. En un ejemplo, se determinó el contenido de ácido siálico y monosacáridos del lote de hialuronidasa purificada N° HUB0701E (1,2 mg/ml; producido y purificado esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 6). Brevemente, se hidrolizaron 100 µg de muestra con ácido trifluoroacético al 40 % (v/v) a 100 °C durante 4 horas por duplicado. Después de la hidrólisis, las muestras se secaron y se resuspendieron en 300 µl de agua. Se transfirió una alícuota de 45 µl de cada muestra resuspendida a un nuevo tubo y se secó, y se añadió a cada una 10 µl de una solución de acetato sódico 10 mg/ml. Los monosacáridos liberados se marcaron con fluorescencia mediante la adición de 50 µl de una solución que contenía ácido 2-aminobenzoico 30 mg/ml, cianoborohidruro sódico 20 mg/ml, acetato sódico aproximadamente 40 mg/ml y ácido bórico 20 mg/ml en metanol. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 80 °C en la oscuridad. La reacción de derivatización se detuvo por la adición de 440 µl de fase móvil A (*n*-butilamina 0,2 % (v/v), ácido fosfórico 0,5 % (v/v), tetrahidrofurano 1 % (v/v)). También se hidrolizó un blanco de agua de matriz y se derivatizó como se ha descrito para la muestra de hialuronidasa como control negativo. Los monosacáridos liberados se separaron por RPLC usando una columna de fase inversa de Octadecilo (C<sub>18</sub>) (4,6 x 250 mm, tamaño de partícula de 5 µm; J.T. Baker) y se controló por detección de fluorescencia (excitación a 360 nm, emisión a 425 nm). Se realizó la cuantificación del contenido de monosacáridos por comparación de los cromatogramas de la muestra de hialuronidasa con cromatogramas de patrones de monosacáridos incluyendo *N*-D-glucosamina (GlcN), *N*-D-galactosamina (GalN), galactosa, fucosa y manosa. La Tabla 31 presenta la relación molar de cada monosacárido por molécula de hialuronidasa.

25 **Tabla 31. Contenido de monosacáridos de rHuPH20 soluble**

| Lote     | Repetición | GlcN  | GalN  | Galactosa | Manosa | Fucosa |
|----------|------------|-------|-------|-----------|--------|--------|
| HUB0701E | 1          | 14,28 | 0,07* | 6,19      | 25,28  | 2,69   |
|          | 2          | 13,66 | 0,08* | 6,00      | 24,34  | 2,61   |
|          | Media      | 13,97 | 0,08* | 6,10      | 24,81  | 2,65   |

\*Los resultados de GalN estuvieron por debajo del límite de detección

### Ejemplo 8

#### 30 Heterogeneidad C terminal de rHuPH20 soluble de células 3D35M y 2B2

Se realizó la secuenciación C terminal en dos lotes de sHuPH20 producida y purificada de células 3D35M en un volumen de biorreactor de 100 l (Lote HUA0505MA) y células 2B2 en un volumen de biorreactor de 300 l (Lote HUB0701EB). Los lotes se digirieron por separado con endoproteinasa Asp-N, que escinde específicamente enlaces peptídicos en el extremo N terminal en ácido aspártico y cisteico. Esto libera la parte C terminal de la rHuPH20 soluble en el ácido aspártico en la posición 431 de SEC ID N°: 4. Los fragmentos C terminales se separaron y se caracterizaron para determinar la secuencia y abundancia de cada población en el Lote HUA0505MA y el Lote HUB0701EB.

40 Se ha observado que las preparaciones de rHuPH20 soluble de células 3D35M y células 2B2 presentaban heterogeneidad, y contenían polipéptidos que diferían entre sí en su secuencia C terminal (Tablas 27 y 28). Esta heterogeneidad probablemente sea el resultado de la escisión C terminal del polipéptido de 447 aminoácidos expresado (SEC ID N°: 4) por peptidasas presentes en el medio de cultivo celular u otras soluciones durante el proceso de producción y purificación. Los polipéptidos en las preparaciones de rHuPH20 soluble tienen secuencias de aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1-447, 1-446, 1-445, 1-444 y 1-443 de la secuencia de rHuPH20 soluble expuesta en SEC ID N°: 4. La secuencia de aminoácidos completa de cada uno de estos polipéptidos se expone en SEC ID N°: 4 a 8, respectivamente. Como se indica en las Tablas 32 y 33, la abundancia de cada polipéptido en las preparaciones de rHuPH20 soluble de células 3D35M y células 2B2 difiere.

50

Tabla 32. Análisis de fragmentos C terminales del Lote HUA0505MA

| Fragmento | Posición de aminoácido (en relación con SEC ID N°: 4) | Secuencia                        | Masa teórica | Masa Exp. | Error | tiempo de elución | Abundancia |
|-----------|---|----------------------------------|--------------|-----------|-------|-------------------|------------|
| D28a      | 431-447   | DAFKLPPMETEEPQIFY(SEC ID N°: 57) | 2053,97      | 2054,42   | 0,45  | 99,87             | 0,2 %      |
| D28b      | 431-446   | DAFKLPPMETEEPQIF(SEC ID N°: 58)  | 1890,91      | 1891,28   | 0,37  | 97,02             | 18,4 %     |
| D28c      | 431-445   | DAFKLPPMETEEPQI(SEC ID N°: 59)   | 1743,84      | 1744,17   | 0,33  | 86,4              | 11,8 %     |
| D28d      | 431-444   | DAFKLPPMETEEPQ(SEC ID N°: 60)    | 1630,70      | 1631,07   | 0,32  | 74,15             | 56,1 %     |
| D28e      | 431-443   | DAFKLPPMETEEP (SEC ID N°: 61)    | 1502,70      | 1502,98   | 0,28  | 77,36             | 13,6 %     |
| D28f      | 431-442   | DAFKLPPMETEE (SEC ID N°: 62)     | 1405,64      | ND        | N/D   | N/D               | 0,0 %      |

Tabla 33. Análisis de fragmentos C terminales del Lote HUB0701EB

| Fragmento | Posición de aminoácido (en relación con SEC ID N°: 4) | Secuencia                        | Masa teórica | Masa Exp. | Error | Tiempo de elución | Abundancia |
|-----------|---|----------------------------------|--------------|-----------|-------|-------------------|------------|
| D28a      | 431-477   | DAFKLPPMETEEPQIFY(SEC ID N°: 57) | 2053,97      | 2054,42   | 0,45  | 99,89             | 1,9 %      |
| D28b      | 431-446   | DAFKLPPMETEEPQIF(SEC ID N°: 58)  | 1890,91      | 1891,36   | 0,45  | 96,92             | 46,7 %     |
| D28c      | 431-445   | DAFKLPPMETEEPQI(SEC ID N°: 59)   | 1743,84      | 1744,24   | 0,40  | 85,98             | 16,7 %     |
| D28d      | 431-444   | DAFKLPPMETEEPQ(SEC ID N°: 60)    | 1630,70      | 1631,14   | 0,39  | 73,9              | 27,8 %     |
| D28e      | 431-443   | DAFKLPPMETEEP (SEC ID N°: 61)    | 1502,70      | 1503,03   | 0,33  | 77,02             | 6,9 %      |
| D28f      | 431-442   | DAFKLPPMETEE (SEC ID N°: 62)     | 1405,64      | ND        | N/D   | N/D               | 0,0 %      |

## 5 Ejemplo 9

### Comparación de la actividad de dispersión de diferentes enzimas degradantes de hialuronano

La capacidad de diferentes enzimas degradantes de hialuronano para actuar como un agente de dispersión se evaluó *in vivo*. Se usó un ensayo de dispersión en ratones para evaluar la capacidad de diferentes enzimas degradantes de hialuronano para actuar como agentes de dispersión de azul de tripano, y también para evaluar la capacidad de las enzimas para potenciar la eficacia de la insulina co-administrada en la reducción de los niveles de glucosa en sangre. Las enzimas degradantes de hialuronano ensayadas incluyeron rHuPH20, PH20 pegilada (PEG PH20), Hyal 1, Condroitinasa ABC, Condroitinasa AC y liasa de *Streptomyces hyalurolyticus*. Estas se mezclaron con azul de tripano e insulina Humulin® en un tampón neutro (fosfato sódico 10 mM, pH 7,4, NaCl 145,5, albúmina en suero humano 1 mg/ml) y se suministraron a ratones anestesiados. Se midió después tanto el área de dispersión del azul de tripano como los niveles de glucosa en sangre. Se usaron el tampón de pH neutro solo y la insulina Humulin® sola como controles negativos. También se examinó la capacidad de un tampón de pH bajo (pH 4,5) para actuar como un agente de dispersión.

Se anestesiaron nueve grupos de ratones homocigotos nu/nu NCr, de aproximadamente 10 semanas de edad y con pesos corporales de 21-25 g, con 3 ratones por grupo, por inyección intraperitoneal de ketamina/xilazina (mezcla 10:1 en solución salina). A continuación, se administró a los ratones 40 µl de una enzima degradante de hialuronano e insulina Humulin® 5 Unidades/ml con colorante Azul de Tripano al 0,4 % por inyección intradérmica en la línea media sobre el extremo caudal de la caja torácica. También se incluyeron grupos de control a los que se administró insulina Humulin® solamente, tampón solamente o tampón e insulina Humulin®. Específicamente, los ratones del grupo 1 fueron el control negativo y recibieron azul de tripano con un tampón de pH neutro; los ratones del grupo 2 recibieron azul de tripano con insulina Humulin® 5 Unidades/ml en un tampón de pH bajo; los ratones del grupo 3 recibieron azul de tripano con insulina Humulin® 5 Unidades/ml y rHuPH20 10 Unidades/ml; los ratones del grupo 4 recibieron azul de tripano con insulina Humulin® 5 Unidades/ml y PEG PH20 10 Unidades/ml (generadas como se

describe en el Ejemplo 10, posterior); los ratones del grupo 5 recibieron azul de tripano con insulina Humulin® 5 Unidades/ml y Hyal 1 10 Unidades/ml; los ratones del grupo 6 recibieron azul de tripano con insulina Humulin® 5 Unidades/ml y Condroitinasa ABC 10 Unidades/ml (Associates of Cape Cod, E. Falmouth; MA); los ratones del grupo 7 recibieron azul de tripano con insulina Humulin® 5 Unidades/ml y Condroitinasa AC 1 Unidad/ml (Associates of Cape Cod, E. Falmouth; MA); los ratones del grupo 8 recibieron azul de tripano con insulina Humulin® 5 Unidades/ml y liasa de *Streptomyces hyalurolyticus* 100 Unidades/ml (Calbiochem); los ratones del grupo 9 recibieron azul de tripano con insulina Humulin® 5 Unidades/ml. La dispersión del colorante de azul de tripano se midió después por un calibrador a los 2,5, 5, 10, 15 y 20 minutos después de la inyección. El área de dispersión del colorante (mm<sup>2</sup>) se calculó multiplicando el eje más largo M1 (longitud del frente de colorante) y M2 (anchura del frente de colorante) por  $\frac{1}{2} \pi$  (M1M2  $\times$   $\frac{1}{4} \pi$ ). Se midieron los niveles de glucosa en sangre usando un glucómetro a los 0, 5, 10, 15 y 20 minutos.

### 1. Dispersión de colorante

La Tabla 34 expone el área de dispersión de colorante media después de la administración de cada uno de los artículos de ensayo. El colorante azul de tripano en tampón de pH neutro y tampón de pH bajo muestra propagación mínima, variando el área de dispersión de un promedio de aproximadamente 36 mm<sup>2</sup> a los 2,5 minutos después de la inyección hasta aproximadamente 51 mm<sup>2</sup> a los 20 minutos después de la inyección. Cuando el colorante azul de tripano se mezcló y suministró con insulina Humulin®, Hyal 1 o PEG PH20, no hubo aumento estadísticamente significativo en el área de dispersión en comparación con la observada cuando el colorante se mezcló solamente con tampón. Por el contrario, se observó un aumento significativo en la dispersión del colorante cuando se mezcló y suministró con rHuPH20, Condroitinasa ABC, Condroitinasa AC o liasa de *Streptomyces hyalurolyticus*. El área de dispersión media del colorante de azul de tripano cuando se mezcló y suministró con rHuPH20 fue de aproximadamente 45 mm<sup>2</sup>, 66 mm<sup>2</sup>, 80 mm<sup>2</sup>, 86 mm<sup>2</sup> y 102 mm<sup>2</sup> a los 2,5, 5, 10, 15 y 20 minutos después de la inyección, respectivamente. El área de dispersión media del colorante azul de tripano cuando se mezcló y suministró con Condroitinasa AC fue de aproximadamente 76 mm<sup>2</sup>, 107 mm<sup>2</sup>, 107 mm<sup>2</sup>, 110 mm<sup>2</sup> y 116 mm<sup>2</sup> a los 2,5, 5, 10, 15 y 20 minutos después de la inyección, respectivamente. El área de dispersión media del colorante azul de tripano cuando se mezcló y suministró con Condroitinasa ABC fue de aproximadamente 57 mm<sup>2</sup>, 75 mm<sup>2</sup>, 79 mm<sup>2</sup>, 81 mm<sup>2</sup> y 88 mm<sup>2</sup> a 2,5, 5, 10, 15 y 20 minutos después de la inyección, respectivamente. El área de dispersión media del colorante azul de tripano cuando se mezcló y suministró con liasa de *Streptomyces hyalurolyticus* fue de aproximadamente 74 mm<sup>2</sup>, 76 mm<sup>2</sup>, 101 mm<sup>2</sup>, 103 mm<sup>2</sup> y 130 mm<sup>2</sup> a 2,5, 5, 10, 15 y 20 minutos después de la inyección, respectivamente.

**Tabla 34. Sumario de las medias de grupo de las áreas de dispersión de colorante (mm<sup>2</sup>)**

| Grupo | Artículo de Ensayo                      | Áreas de dispersión de colorante (mm <sup>2</sup> ) |        |        |        |        |
|-------|---|---|--------|--------|--------|--------|
|       |   | 2,5 min   | 5 min  | 10 min | 15 min | 20 min |
| 1     | Vehículo de tampón de pH neutro/control | 36,11   | 41,63  | 47,19  | 52,47  | 51,34  |
| 2     | Tampón de pH bajo                       | 33,34   | 34,47  | 41,88  | 44,91  | 51,18  |
| 3     | PEG PH20 (10 U/ml)                      | 37,28   | 47,08  | 52,40  | 54,94  | 58,17  |
| 4     | rHuPH20 (10 U/ml)                       | 44,58   | 66,02  | 79,46  | 86,24  | 101,90 |
| 5     | Hyal I (10 U/ml)                        | 31,53   | 36,27  | 39,60  | 46,41  | 48,21  |
| 6     | Condroitinasa ABC (10 U/ml)             | 56,85   | 75,06  | 78,60  | 81,44  | 87,85  |
| 7     | Condroitinasa AC (1 U/ml)               | 75,67   | 106,56 | 106,49 | 110,43 | 115,82 |
| 8     | Liasa Strep (100 U/ml)                  | 73,97   | 75,58  | 101,03 | 102,69 | 129,56 |
| 9     | Humulin R                               | 38,22   | 43,94  | 50,76  | 52,49  | 58,41  |

### 2. Niveles de glucosa en sangre

La Tabla 35 expone los niveles de glucosa en sangre medios (mg/dl) después de la administración de cada artículo de ensayo. Los niveles de glucosa en sangre en ratones a los que se administró colorante y tampón solamente aumentó de un promedio de aproximadamente 212 mg/dl antes de la inyección a aproximadamente 332 mg/dl a los 5 minutos después de la inyección. A continuación, los niveles aumentaron gradualmente hasta aproximadamente 367 mg/dl a los 20 minutos después de la inyección. Este aumento de la glucosa en sangre en ausencia de insulina se debe a un efecto bien conocido de la anestesia en la glucosa en sangre en roedores (véase, por ejemplo, Saha et al., (2005) Exp. Biol. Med. 230:777-784). Cuando se administró insulina Humulin®, los niveles de glucosa en sangre aumentaron brevemente hasta un promedio de aproximadamente 292 mg/dl a los 5 minutos después de la inyección (del promedio de aproximadamente 226 mg/dl antes de la inyección) antes de descender a un promedio de aproximadamente 171 mg/dl, 122 mg/dl y 97 mg/dl a los 10, 15 y 20 minutos después de la inyección, respectivamente. Aunque todas las enzimas degradantes de hialuronano redujeron los niveles de glucosa en sangre cuando se administraron con insulina Humulin®, la co-administración de rHuPH20, PEG PH20, Condroitinasa ABC y liasa de *Streptomyces hyalurolyticus* pareció reducir los niveles aún más rápido que lo observado con insulina Humulin® sola.

Tabla 35. Sumario de las medias de grupo del nivel de glucosa en sangre (mg/dl)

| Grupo | Artículo de ensayo                      | Nivel de glucosa en sangre (mg/dl) |        |        |        |        |
|-------|---|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
|       |   | 0 min                              | 5 min  | 10 min | 15 min | 20 min |
| 1     | Vehículo de tampón de pH neutro/control | 212,00                             | 332,00 | 344,00 | 361,33 | 367,67 |
| 2     | Tampón de pH bajo                       | 196,67                             | 259,67 | 249,33 | 231,33 | 220,67 |
| 3     | PEG PH20 (10 U/ml)                      | 170,00                             | 196,67 | 110,00 | 68,33  | 46,67  |
| 4     | rHuPH20 (10 U/ml)                       | 165,67                             | 173,00 | 96,00  | 63,67  | 39,00  |
| 5     | Hyal I (10 U/ml)                        | 155,67                             | 201,33 | 144,33 | 77,00  | 52,67  |
| 6     | Condroitinasa ABC (10 U/ml)             | 129,67                             | 123,67 | 65,00  | 44,67  | 21,00  |
| 7     | Condroitinasa AC (1 U/ml)               | 174,33                             | 248,67 | 204,67 | 165,33 | 133,67 |
| 8     | Liasa Strep (100 U/ml)                  | 140,33                             | 120,67 | 68,67  | 41,00  | 27,67  |
| 9     | Humulin R                               | 226,33                             | 292,00 | 171,33 | 122,33 | 96,67  |

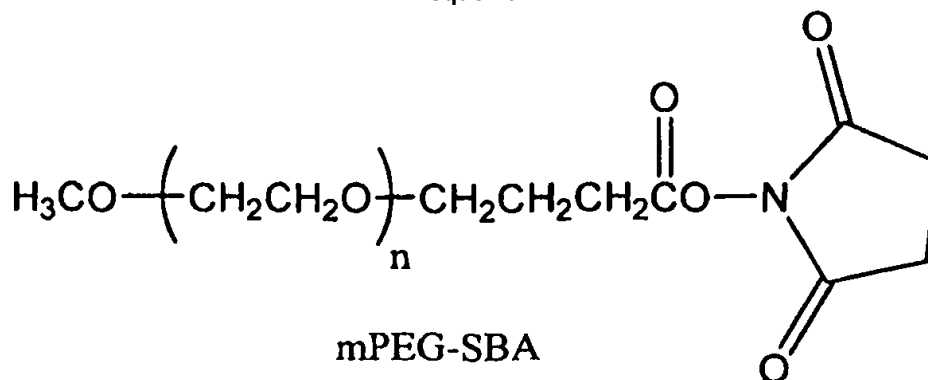
## Ejemplo 10

## 5 PEGilación de rHuPH20

## A. Conjugación de mPEG-SBA-30K con rHuPH20

- 10 Para generar una hialuronidasa humana soluble PEGilada, se conjugó covalentemente el rHuPH20 (que es de aproximadamente 60 kDa de tamaño) con un *N*-hidroxisuccinimidil éster lineal de ácido metoxi poli(etilenglicol) butanoico (mPEG-SBA-30K) que tiene un peso molecular aproximado de 30 kDa. La estructura de mPEG-SBA se muestra en el esquema 2, a continuación:

Esquema 2



- 15 Se describen métodos para preparar el mPEG-SBA-30K que se usó para PEGilar rHuPH20, por ejemplo, en el documento U.S. 5.672.662. Brevemente, el mPEG-SBA-30K se realiza de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- 20 Se añade una solución de etil malonato (2 equivalentes) disuelto en dioxano gota a gota a hidruro sódico (2 equivalentes) y tolueno en una atmósfera de nitrógeno. Se disuelve mPEG metano sulfonato (1 equivalente, PM 30 kDa, Shearwater) en tolueno y se añade a la mezcla anterior. La mezcla resultante se refluye durante aproximadamente 18 horas. La mezcla de reacción se concentra hasta la mitad de su volumen original, se extrae con solución de NaCl acuoso al 10 %, se extrae con ácido clorhídrico acuoso al 1 %, y se combinan los extractos
- 25 acuosos. Las capas acuosas recogidas se extraen con diclorometano (3x) y la capa orgánica se seca con sulfato de magnesio, se filtra y se evapora hasta su sequedad. El residuo resultante se disuelve en hidróxido sódico 1 N que contiene cloruro sódico y la mezcla se agita durante 1 hora. El pH de la mezcla se ajusta a aproximadamente 3 por la adición de ácido clorhídrico 6 N. La mezcla se extrae con diclorometano (2x).

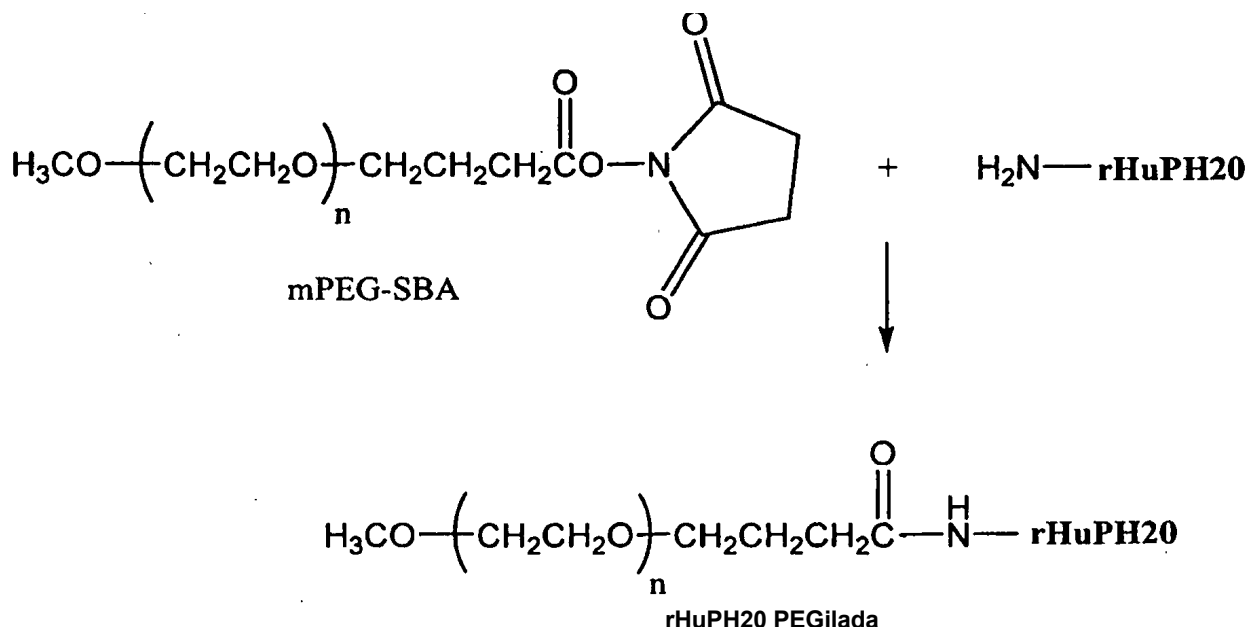
- 30 La capa orgánica se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra, se concentra y se vierte en dietil éter frío. El precipitado se recoge por filtración y se seca al vacío. El compuesto resultante se disuelve en dioxano y se refluye durante 8 horas y después se concentra hasta su sequedad. El residuo resultante se disuelve en agua y se extrae con diclorometano (2x), se seca sobre sulfato de magnesio, y la solución se concentra por evaporación rotatoria y después se vierte en dietil éter frío. El precipitado se recoge por filtración y se seca al vacío. El compuesto resultante
- 35 (1 equivalente) se disuelve en diclorometano y se añade *N*-hidroxisuccinimida (2,1 equivalentes). La solución se enfría a 0 °C y se añade en gotas una solución de dicitohexilcarbodiimida (2,1 equivalentes) en diclorometano. La solución se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 18 horas. La mezcla de reacción se filtra, se concentra y se precipita en dietil éter. El precipitado se recoge por filtración y se seca al vacío para producir mPEG-SBA-30K.

40



Para preparar el rHuPH20 PEGilado, se acopla mPEG-SBA-30K al grupo o los grupos amino de rHuPH20 por conjugación covalente, proporcionando enlaces de amida estables entre rHuPH20 y mPEG, como se muestra en el Esquema 3.

5 **Esquema 3:**



10 Para la conjugación, se añade el mPEG-SBA-30K en forma de polvo a rHuPH20 (a una concentración de 10 mg/ml en NaCl 130 mM / HEPES 10 mM; pH 7). La relación de PEG:rHuPH20 fue de 10:1 (relación molar). Después de haberse disuelto el PEG en el tampón, la solución se esterilizó por filtración (filtro superior de Tubo de 50 ml de Corning, poliestireno, membrana de acetato de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$ ). La conjugación se llevó a cabo durante una noche, con agitación, a 4 °C en una habitación fría.

15 Después de la conjugación, la solución se concentró, usando una membrana de TFF de 100.000 de MWCO, y se intercambió el tampón frente a NaCl 130 mM/HEPES 10 mM a pH 6,8. El material resultante, que se ensayó con respecto a actividad enzimática, como se ha descrito en el Ejemplo 2, anterior, se diluyó usando NaCl 130 mM/HEPES 10 mM a pH 6,8 para obtener una actividad enzimática final de 100.000 U/ml (correspondiente a aproximadamente 2,5 mg de péptido/ml). Este material de rHuPH20 PEGilado se cargó, en volúmenes de 1ml, en un frasco de vidrio de Tipo 1 de 13 mm con sello de brombutilo, y se almacenó congelado (congelado durante una noche en un congelador a -80 °C, después colocado en un congelador a -20 °C para almacenamiento más largo).

25 **B. Análisis de rHuPH20 PEGilada**

El material de rHuPH20 PEGilada se ensayó por electroforesis en gel. Tres lotes de rHuPH20 PEGilada preparada como en el Ejemplo 7A anterior, revelaron un patrón idéntico de múltiples bandas, que representan PEG que no ha reaccionado y múltiples especies de conjugados de mPEG-rHuPH20, que migraron a diferentes distancias. Basándose en la comparación con la migración de un marcador de peso molecular, las bandas que representan la especie variaron de aproximadamente 90 kDa a 300 kDa, migrando tres bandas oscuras por encima del marcador de 240 kDa. Estos datos indicaron que la rHuPH20 PEGilada, generada por conjugación covalente de mPEG-SBA-30K, contenía una mezcla heterogénea de especies de rHuPH20 PEGilada, probablemente incluyendo proteínas mono, di y tri-PEGiladas. La falta de una banda visible a 60 kDa sugirió que toda la proteína había reaccionado con el PEG, y que no estaba presente ninguna rHuPH20 nativa detectable en la mezcla.

35 **Ejemplo 11**

**Efecto de rHuPH20 en la farmacocinética de la insulina después de administración subcutánea en cerdos**

40 Para determinar si un modelo de cerdo sería adecuado para modelar la farmacocinética de insulinas prandiales coadministradas con hialuronidasa recombinante (por ejemplo rHuPH20), se evaluó la farmacocinética de insulina lispro Humalog<sup>®</sup> e insulina Humulin<sup>®</sup> R después de inyección subcutánea con o sin rHuPH20 en cerdos. Los resultados se compararon después con los observados en seres humanos (véase Ejemplo 1), para determinar si el modelo de cerdo refleja con precisión lo visto en seres humanos.

45

Brevemente, se administró insulina lispro Humalog® e insulina Humulin® R con o sin rHuPH20, por vía subcutánea a seis cerdos en un estudio cruzado de 4 vías, aleatorio. Cada animal recibió tres ciclos de tratamiento con los cuatro artículos de ensayo para facilitar la comparación de la reproducibilidad de la farmacocinética de insulina sobre una serie de ciclos de dosificación. Se recogieron muestras de sangre y se evaluó el suero para determinar los niveles de insulina inmunorreactiva (IRI). Se determinaron después diversos parámetros farmacocinéticos, incluyendo  $t_{máx}$ ,  $C_{máx}$ ,  $t_{50\% \text{ temprano}}$ ,  $t_{50\% \text{ tardío}}$  y  $ABC_{máx}$ .

**A. Dosificación y toma de muestras**

Se prepararon soluciones de dosificación (o artículos de ensayo) de insulina lispro Humalog® o insulina Humulin® R 100 U/ml, con y sin rHuPH20 4800 U/ml, de la siguiente manera. Se prepararon las soluciones de insulina lispro Humalog® sola e insulina Humulin® R sola 100 a partir de lotes comerciales de insulina lispro Humalog® (10 U/ml; Lote A418976, Eli Lilly) e insulina Humulin® R (100 U/ml; Lote A393318, Eli Lilly), diluido 1:5 con Diluyente Estéril (Eli Lilly), respectivamente. Para preparar la solución de insulina lispro Humalog®/rHuPH20, se mezclaron 910 µl de insulina lispro Humalog® 100 U/ml (Eli Lilly, Lote A418976), 44,6 ml de HYLENEX recombinante (inyección humana de hialuronidasa) (Baxter, Lote 903646) y 45,4 µl de rHuPH20 API 1 mg/ml (Halozyme Therapeutics, Lote HUA0703MA) para una concentración de insulina lispro Humalog® final de 91 U/ml y una actividad hialuronidasa de 5454 U/ml). Para preparar la solución de insulina Humulin® R/rHuPH20, se mezclaron 200 µl de insulina Humulin® R (Eli Lilly, Lote A393318) y 800 µl de Producto Farmacológico de rHuPH20 6000 U/ml (Halozyme, Lote 288004; el Producto Farmacológico de rHuPH20 contenía 50 µg de rHuPH20 en NaCl 145 mM, Fosfato Sódico Dibásico 10 mM, Cloruro Cálculo 2,7 mM, Sal Disódica de EDTA 2,7 mM, Albúmina de Suero Humano 1 mg/ml, pH 7,4) para una concentración de insulina final de 100 U/ml y actividad hialuronidasa de rHuPH20 de 4800 U/ml.

Las soluciones que contenían rHuPH20 se esterilizaron por filtración y se cargaron en frascos de vidrio de Tipo I de 2 ml (Wheaton) y se sellaron con tapones de goma de 13 mm (Stelmi). Las soluciones que contenían rHuPH20 se dividieron después en dos conjuntos; uno se mantuvo como un control refrigerado hasta que se ensayó y el otro se usó para administración a los animales en el presente estudio. Todas las soluciones de dosificación se mantuvieron refrigeradas en todo momento y después se devolvieron para ensayar. Cada conjunto de soluciones se ensayó con respecto a actividad enzimática de rHuPH20 en la misma fecha, en un periodo de 1-6 días después de haberse formulado.

Se equipó a seis cerdos Yucatán macho adultos (S&S Farms, Ramona, CA), que pesaban cada uno entre 21 y 25 kg al inicio del estudio, con catéteres de la vena yugular o la arteria carótida implantados de forma quirúrgica con orificios de acceso vascular exterior instalados para fácil toma de muestras sanguíneas durante todo el estudio. Los animales se sometieron a cuarentena durante 7 días antes de su instrumentación y tratamiento. Se seleccionaron aleatoriamente seis animales para dos grupos de estudio como se muestra en la Tabla 36, posterior. Se asignó a los animales a uno de dos grupos conteniendo cada uno 3 animales por grupo y la asignación se mantuvo para los ciclos 1 y 2. Para un tercer ciclo de dosificación, se retiraron dos animales debido a no permeabilidad de las cánulas, y los cuatro animales restantes se reasignaron con solamente 2 animales por grupo. Los números de ID de los animales del grupo 1 fueron 540, 541 y 542 para los ciclos 1 y 2; y 542 y 544 para el ciclo 3. Los números de ID de los animales del grupo 2: 544, 545 y 546 para los ciclos 1 y 2; 545 y 546 para el ciclo 3.

Las soluciones de dosificación se administraron por vía subcutánea (SC) en el flanco izquierdo de cada cerdo detrás de la línea media del cuerpo. Antes de la administración del artículo de ensayo, se obtuvo una muestra de sangre pre-tratamiento. Los animales recibieron una única dosis SC del artículo de ensayo apropiado (0,2 U/kg; con el animal medido antes de cada administración para determinar con precisión la dosis correcta) en un protocolo cada dos días. Cada animal recibió una única dosis de embolada SC de la insulina indicada (es decir, insulina o lispro) a 2,0 U/kg en un vehículo o en una co-formulación nueva de rHuPH20. Después de la administración del artículo de ensayo, se retiraron en serie al menos 0,7-1,0 ml de sangre a los 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos. También se tomó una muestra de sangre pre-tratamiento (presangrado) antes de la administración. Las muestras de sangre se colocaron inmediatamente en tubos con suero que no contenían anticoagulante, se colocaron en hielo durante un mínimo de 30 minutos, después se centrifugaron a 9500 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El suero se transfirió después a un tubo pre-etiquetado, se congelaron y se almacenaron a -80 °C, hasta que todas las muestras se enviaron a Millipore para bioanálisis con respecto a los niveles de insulina inmunorreactiva (IRI).

**Tabla 36. Protocolo de dosificación para la validación del modelo de cerdo**

| Ciclo | Día de Dosificación | Día del Estudio | Tratamiento de grupo nº 1        | Tratamiento de grupo nº 2        |
|-------|---------------------|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 1     | 1                   | 0               | insulina lispro Humalog®         | insulina Humulin® R              |
|       | 2                   | 2               | insulina Humulin® R/rHuPH20      | insulina lispro Humalog®/rHuPH20 |
|       | 3                   | 4               | insulina Humulin® R              | insulina lispro Humalog®         |
|       | 4                   | 6               | insulina lispro Humalog®/rHuPH20 | insulina Humulin® R/rHuPH20      |

| Ciclo | Día de Dosificación | Día del Estudio | Tratamiento de grupo nº 1        | Tratamiento de grupo nº 2        |
|-------|---------------------|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 2     | 5                   | 8               | insulina lispro Humalog®         | insulina Humulin® R              |
|       | 6                   | 10              | insulina Humulin® R/rHuPH20      | insulina lispro Humalog®/rHuPH20 |
|       | 7                   | 12              | insulina Humulin® R              | insulina lispro Humalog®         |
|       | 8                   | 14              | insulina lispro Humalog®/rHuPH20 | insulina Humulin® R/rHuPH20      |
| 3     | 9                   | 26              | insulina lispro Humalog®         | insulina Humulin® R              |
|       | 10                  | 28              | insulina Humulin® R/rHuPH20      | insulina lispro Humalog®/rHuPH20 |
|       | 11                  | 30              | insulina lispro Humalog®/rHuPH20 | insulina Humulin® R/rHuPH20      |
|       | 12                  | 32              | insulina Humulin® R              | insulina lispro Humalog®         |

### B. Niveles de insulina en suero

Se determinaron las concentraciones de IRI en suero para cada muestra de suero por interpolación de una curva patrón usando el software de análisis de ensayo StatLIA® (Brendan Technologies, Carlsbad, CA). La Tabla 37 proporciona una concentración de IRI después de la administración de insulina lispro Humalog®, insulina lispro Humalog®/rHuPH20, insulina Humulin® R o insulina Humulin® R/rHuPH20. La Tabla 37 expone los niveles de IRI de línea basal, como se miden en las muestras de presangrados. Estas líneas basales se restaron después de las concentraciones de IRI reales medidas en cada punto temporal para determinar la concentración de IRI ajustado a línea basal.

Los perfiles de concentración de IRI en suero media-tiempo para cada tratamiento (como se ve cuando se representa en una gráfica con la concentración de IRI en el eje Y frente al tiempo en el eje X) fue similar durante múltiples ciclos. En todos los ciclos de dosificación, la farmacocinética de insulina lispro Humalog® e insulina Humulin® R se aceleró cuando se coadministraron por vía subcutánea en la formulación de rHuPH20. Cualquier diferencia observada entre los tratamientos fue sustancialmente igual entre los ciclos de tratamiento, lo que indica que las diferencias observadas se debieron al tratamiento y fueron estables entre los ciclos, sobre aproximadamente 5 semanas de ensayo.

20

**Tabla 37. Perfiles de concentración de IRI en suero-tiempo**

| Tiempo (minutos)                                      | Concentración de IRI media (pM) y desviación típica (DT) |       |                                  |       |                     |       |                             |       |
|---|--|-------|----------------------------------|-------|---------------------|-------|-----------------------------|-------|
|   | insulina lispro Humalog®                                 |       | insulina lispro Humalog®/rHuPH20 |       | insulina Humulin® R |       | insulina Humulin® R/rHuPH20 |       |
|   | Media  | DT    | Media                            | DT    | Media               | DT    | Media                       | DT    |
| 0 (línea basal de presangrado)                        | 37,0   | 52,3  | 45,0                             | 37,5  | 20,9                | 27,3  | 19,2                        | 23,8  |
| <i>Concentraciones de IRI ajustadas a línea basal</i> |  |       |                                  |       |                     |       |                             |       |
| 0   |  | 0     | 0                                | 0     | 0                   | 0     | 0                           | 0     |
| 3   | 8,1  | 25,2  | 65,5                             | 79,3  | 0,7                 | 3,0   | 113,0                       | 109,7 |
| 6   | 20,6   | 46,1  | 110,3                            | 84,6  | 2,9                 | 7,1   | 161,6                       | 119,4 |
| 9   | 21,5   | 40,9  | 166,0                            | 122,5 | 3,7                 | 10,9  | 168,1                       | 136,2 |
| 12  | 40,6   | 71,6  | 143,0                            | 99,0  | 7,3                 | 20,7  | 166,0                       | 118,0 |
| 15  | 52,3   | 78,4  | 262,2                            | 215,5 | 11,2                | 32,8  | 155,6                       | 114,8 |
| 20  | 80,4   | 125,6 | 265,3                            | 169,2 | 22,6                | 33,7  | 210,8                       | 172,4 |
| 25  | 93,6   | 92,5  | 263,3                            | 190,0 | 40,7                | 48,2  | 253,0                       | 171,9 |
| 30  | 119,7  | 116,7 | 335,2                            | 220,4 | 61,3                | 55,1  | 224,1                       | 146,5 |
| 45  | 193,9  | 139,7 | 296,1                            | 183,3 | 105,6               | 103,8 | 253,1                       | 188,1 |
| 60  | 164,0  | 106,8 | 206,5                            | 150,3 | 107,0               | 91,4  | 172,4                       | 115,3 |

| Tiempo (minutos) | Concentración de IRI media (pM) y desviación típica (DT) |      |                                  |       |                     |       |                              |       |
|------------------|--|------|----------------------------------|-------|---------------------|-------|------------------------------|-------|
|                  | insulina lispro Humalog®                                 |      | insulina lispro Humalog®/rHuPH20 |       | insulina Humulin® R |       | insulina Humulin® R/ rHuPH20 |       |
|                  | Media  | DT   | Media                            | DT    | Media               | DT    | Media                        | DT    |
| 90               | 115,2  | 76,4 | 101,8                            | 74,4  | 100,4               | 95,4  | 137,0                        | 110,0 |
| 120              | 95,7   | 68,9 | 72,3                             | 63,6  | 105,5               | 57,6  | 93,9                         | 63,4  |
| 180              | 24,6   | 23,6 | 38,5                             | 45,4  | 105,5               | 81,7  | 50,5                         | 49,7  |
| 240              | 15,2   | 21,7 | 65,8                             | 106,5 | 81,8                | 126,3 | 33,8                         | 50,9  |

**C. Farmacocinética de insulina**

5 Se usó el perfil de concentración de insulina-tiempo después de restar la concentración de insulina de línea basal (Tabla 37, anterior) para calcular los siguientes parámetros PK, incluyendo  $t_{m\acute{a}x}$ ,  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{50\%}$  Temprano,  $t_{50\%}$  Tardío y  $ABC_{intervalo}$ . Los parámetros PK se derivaron por análisis no compartimental usando el modelo 200 en WinNonlin Professional versión 5.2 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). Se realizaron cálculos de estadística usando SAS versión 9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC). Todos los análisis se realizaron usando un modelo mixto con efectos fijos para el tratamiento. Se asumió una matriz de covarianza simétrica del compuesto entre observaciones repetidas para cada animal. Se realizaron análisis con respecto a  $C_{m\acute{a}x}$  y todos los criterios de valoración de ABC usando valores transformados de forma logarítmica con valores de cero reemplazados por 1 antes de la transformación logarítmica (cero en la escala logarítmica). Los criterios de valoración basados en el tiempo se analizaron en la escala lineal original.

15 Se proporciona un sumario de la farmacocinética de la insulina después de la administración subcutánea de insulina lispro Humalog® o insulina Humulin® R, suministrada sola (control) o con rHuPH20, en la Tabla 38. Los diversos parámetros PK para cada insulina suministrada sola o con rHuPH20 se muestran como media  $\pm$  DT. El % de control para cada parámetro (% de control calculado por [media (geométrica o aritmética) del valor de PK para insulina con rHuPH20] / [media (geométrica o aritmética) del valor de PK para insulina sola] x 100) también se proporciona en la tabla. Los cálculos del % de control se basaron en la medida geométrica y el p valor para los datos transformados de forma logarítmica para los parámetros  $C_{m\acute{a}x}$  y ABC, basándose a la vez en la media aritmética y valores no transformados para  $t_{m\acute{a}x}$  y  $t_{50\%}$  Temprano y Tardío. N =16 cerdos a no ser que se indique otra cosa.

25 La Tabla 39 expone una comparación de parámetros PK de insulina lispro Humalog® sola con insulina Humulin® R con rHuPH20. Los valores PK se proporcionan como media  $\pm$  DT. También se proporciona el % de insulina lispro Humalog® (es decir [media (geométrica o aritmética) del valor de PK para insulina lispro Humalog® con rHuPH20] / [media (geométrica o aritmética) del valor de PK para insulina lispro Humalog® sola] x 100). Los cálculos del % de control se basaron en la Media Geométrica y el p valor para los datos transformados de forma logarítmica para los parámetros  $C_{m\acute{a}x}$  y ABC, o basándose en la media aritmética y los valores no transformados para  $t_{m\acute{a}x}$  y  $t_{50\%}$  Temprano y Tardío. N =16 a no ser que se indique otra cosa.

**Tabla 38. Parámetros PK de insulina después de administración subcutánea con o sin rHuPH20**

|  | insulina lispro Humalog® |                 |           |            | insulina Humulin® R |                 |           |            |
|--|--------------------------|-----------------|-----------|------------|---------------------|-----------------|-----------|------------|
|  | sola                     | con rHuPH20     | % control | de P valor | sola                | con rHuPH20     | % control | de P valor |
| <b><math>C_{m\acute{a}x}</math> (pmol/l)</b> | 250 $\pm$ 140            | 417 $\pm$ 229   | 163       | 0,0251     | 214 $\pm$ 122       | 360 $\pm$ 180   | 165       | 0,0218     |
| <b><math>t_{50\%}</math> Temprano (min)</b>  | 36 $\pm$ 20 a            | 11 $\pm$ 6a     | 32        | 0,0182     | 61 $\pm$ 49         | 10 $\pm$ 8a     | 17        | <0,0001    |
| <b><math>t_{m\acute{a}x}</math> (min)</b>    | 58 $\pm$ 26              | 39 $\pm$ 39     | 67        | 0,1963     | 94 $\pm$ 61         | 38 $\pm$ 41     | 40        | 0,0004     |
| <b><math>t_{50\%}</math> Tardío (min)</b>    | 110 $\pm$ 42 a           | 52 $\pm$ 24a    | 47        | 0,0002     | 170 $\pm$ 49 b      | 70 $\pm$ 41 a   | 42        | <0,0001    |
| <b>Intervalo de ABC (min x nmol/l)</b>       |                          |                 |           |            |                     |                 |           |            |
| <b>0-15 min</b>                              | 0,35 $\pm$ 0,64          | 1,77 $\pm$ 1,24 | 1961      | 0,0004     | 0,06 $\pm$ 0,17     | 2,06 $\pm$ 1,28 | 43542     | <0,0001    |

|                   | insulina lispro Humalog® |                          |              |         | insulina Humulin® R      |                          |              |         |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|---------|--------------------------|--------------------------|--------------|---------|
|                   | soía                     | con rHuPH20              | % de control | P valor | soía                     | con rHuPH20              | % de control | P valor |
| <b>0-30 min</b>   | 1,65 ± 2,07              | 5,84 ± 3,59              | 763          | 0,0198  | 0,56 ± 0,73              | 5,33 ± 3,30              | 1429         | 0,0027  |
| <b>0-1 h</b>      | 6,7 ± 4,8                | 14,2 ± 8,6               | 214          | 0,2776  | 3,4 ± 2,5                | 12,1 ± 7,3               | 246          | 0,2003  |
| <b>0-última</b>   | 18,0 ± 8,8               | 26,6 ± 14,6              | 146          | 0,1195  | 21,3 ± 12,1              | 26,9 ± 16,0              | 116          | 0,5312  |
| <b>0-infinito</b> | 24,3 ± 8,6 <sup>c</sup>  | 32,2 ± 17,1 <sup>a</sup> | 117          | 0,5176  | 45,0 ± 41,2 <sup>c</sup> | 32,6 ± 16,7 <sup>a</sup> | 88           | 0,6118  |
| <b>1-4 h</b>      | 12,2 ± 6,8               | 12,9 ± 7,8               | 106          | 0,8410  | 18,2 ± 10,3              | 15,0 ± 10,1              | 72           | 0,2259  |
| <b>2-4 h</b>      | 4,9 ± 3,2                | 6,0 ± 4,9                | 215          | 0,3763  | 12,0 ± 7,8               | 6,8 ± 5,4                | 32           | 0,1930  |

a N = 15  
b N = 4  
c N = 13

**Tabla 39. Parámetros PK de insulina después de administración subcutánea de insulina lispro Humalog® solo o insulina Humulin® R con rHuPH20.**

|  | insulina Humalog® lispro | insulina Humulin® R con rHuPH20 | % de insulina lispro Humalog® | P valor |
|--|--------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------|
| <b>C<sub>máx</sub> (pmol/l)</b>        | 250 ± 140                | 360 ± 180                       | 143                           | 0,0944  |
| <b>t<sub>50</sub> % Temprano (min)</b> | 36 ± 20 <sup>a</sup>     | 10 ± 8 <sup>a</sup> 29          | 0,0141                        |         |
| <b>t<sub>máx</sub> (min)</b>           | 58 ± 26                  | 38 ± 41                         | 64                            | 0,1631  |
| <b>t<sub>50</sub> % Tardío (min)</b>   | 110 ± 42 <sup>a</sup>    | 70 ± 41 <sup>a</sup>            | 64                            | 0,0092  |
| <b>Intervalo de ABC (min x nmol/l)</b> |                          |                                 |                               |         |
| <b>0-15 min</b>                        | 0,35 ± 0,64              | 2,06 ± 1,28                     | 2698                          | <0,0001 |
| <b>0-30 min</b>                        | 1,65 ± 2,07              | 5,33 ± 3,32                     | 744                           | 0,0212  |
| <b>0-1 h</b>                           | 6,7 ± 4,8                | 12,1 ± 7,3                      | 189                           | 0,3646  |
| <b>0-última</b>                        | 18,0 ± 8,8               | 26,9 ± 16,0                     | 146                           | 0,1196  |
| <b>0-infinito</b>                      | 24,3 ± 8,6 <sup>b</sup>  | 32,6 ± 16,6 <sup>a</sup>        | 128                           | 0,3179  |
| <b>1-4 h</b>                           | 12,2 ± 6,8               | 15,0 ± 10,1                     | 121                           | 0,4801  |
| <b>2-4 h</b>                           | 4,9 ± 3,2                | 6,9 ± 5,4                       | 290                           | 0,2203  |

a N= 15  
b N= 13

**5 D. Sumario**

La coadministración de insulina Humulin® R o insulina lispro Humalog® con rHuPH20 en cerdos alteró significativamente los parámetros PK específicos en relación con inyecciones de control (es decir insulina Humulin® R o insulina lispro Humalog® sola). Específicamente, la exposición máxima (C<sub>máx</sub>) se aumentó 163 % para insulina lispro Humalog® (p = 0,0251) y 165 % para insulina Humulin® R (p = 0,0218) cuando se administró con rHuPH20 en relación con los controles respectivos. El inicio de la acción (t<sub>50</sub> % Temprano) se aceleró de 36 a 11 minutos para insulina lispro Humalog® (p = 0,0182) y 61 a 10 minutos para insulina Humulin® R (p <0,0001). El tiempo de efecto máximo (t<sub>máx</sub>) se aceleró de 58 a 39 minutos para insulina lispro Humalog® (p = 0,1963) y de 94 a 38 minutos para insulina Humulin® R (p = 0,0004). El t<sub>50</sub> % Tardío se aceleró de 110 a 52 minutos para insulina lispro Humalog® (p = 0,0002) y de 170 a 70 minutos para insulina Humulin® R (p <0,0001). La exposición total (ABC<sub>inf</sub>) no se alteró de

forma significativa para insulina lispro Humalog® (117 % de control;  $p = 0,5176$ ) o insulina Humulin® R (88 % de control;  $p = 0,6118$ ). La exposición acumulativa se desplazó a ventanas temporales más tempranas tanto para insulina lispro Humalog® ( $ABC_{0-30}$  aumentó 763 % en comparación con cuando se administró insulina lispro Humalog® sola;  $p = 0,0198$ ) como para insulina Humulin® R ( $ABC_{0-30}$  aumentó 1429 % en comparación con cuando se administró insulina Humulin® R sola;  $p = 0,0027$ ). La coadministración de insulina Humulin® R con rHuPH20 o insulina lispro Humalog® con rHuPH20 aumentó la velocidad de absorción de la insulina al compartimento vascular (en comparación con cuando la insulina respectiva se suministró sola) como se demuestra por una reducción en el tiempo hasta las concentraciones de IRI en suero máximas ( $t_{máx}$ ,  $t_{50}$  % Temprano,  $t_{50}$  % Tardío), y un aumento en las concentraciones de exposición máximas ( $C_{máx}$ ) en comparación con insulina Humulin® R o insulina lispro Humalog® sola. Además, la exposición acumulativa temprana ( $ABC_{0-30}$ ) aumentó tanto para insulina lispro Humalog® como para insulina Humulin® R cuando se coadministró con rHuPH20, en comparación con cuando se administró sola.

El aumento en exposición máxima y aceleración de exposición tras la administración de insulina lispro Humalog® e insulina Humulin® R con coadministración de hialuronidasa se observaron ampliamente sin influencia significativa en animal, secuencia o ciclo y refleja estrechamente los estudios humanos previos (véase Ejemplo 1). Por lo tanto, el cerdo es un modelo adecuado para estudiar el efecto de la hialuronidasa en la absorción de preparaciones de insulina prandial.

### Ejemplo 12.

#### Farmacocinética de insulina regular a dos dosis administradas con y sin rHuPH20 por vía subcutánea

La farmacocinética (PK) de la insulina regular, cuando se administra por vía subcutánea a dos concentraciones diferentes, tanto sola como coadministrada con rHuPH20, se evaluó en el modelo porcino descrito en el Ejemplo 10 anterior. Se realizó un estudio de diseño de cruce de 4 vías de dosis múltiple para comparar la PK de la insulina regular a concentraciones de 20 y 100 U/ml, cuando se administra sola, a las mismas dos concentraciones después de la coadministración con rHuPH20. En cada caso, se administró un total de 0,2 U/kg de insulina.

#### A. Dosificación y toma de muestras

Se prepararon cuatro artículos de ensayo para dosificación. Dos artículos de ensayo contenían insulina regular 20 U/ml y 100 U/ml (insulina Humulin® R; Eli Lilly), respectivamente (designada Insulina U20 e Insulina U100, respectivamente). Los dos artículos de ensayo restantes contenían insulina regular 20 U/ml y 100 U/ml (Diosynth Biotechnologies (una división de Schering-Plough)), respectivamente, con rHuPH20 20  $\mu$ g/ml (aproximadamente 2400 U/ml) (designada Insulina-PH20 U20 e Insulina-PH20 U100, respectivamente). El artículo de ensayo de Insulina U20 se preparó diluyendo insulina Humulin® R (100 U/ml; Lote A390566A; Eli Lilly) 1:5 con diluyente estéril (Eli Lilly). El artículo de ensayo Insulina U100 era insulina Humulin® R no diluida (100 U/ml; Lote A509721; Eli Lilly). El artículo de ensayo Insulina-PH20 U20 contenía insulina regular 0,74 mg/ml (20 U/ml) (Lote N° SIHR107; Diosynth Biotechnologies) y rHuPH20 20  $\mu$ g/ml (aproximadamente 2400 U/ml) en Tris 25 mM, NaCl 120 mM, Polisorbato 80 0,01 %, pH 7,3. El artículo de ensayo Insulina-PH20 U100 contenía insulina regular 3,69 mg/ml (100 U/ml) (Lote N° SIHR107; Diosynth Biotechnologies) y rHuPH20 20  $\mu$ g/ml (aproximadamente 2400 U/ml) en Tris 25 mM, NaCl 120 mM, Polisorbato 80 0,01 %, pH 7,3.

Se implantó quirúrgicamente un catéter en seis cerdos enanos de Yucatán machos adultos (S&S Farms, Ramona, CA), que pesaban cada uno entre 21 y 25 kg al inicio del estudio, en la vena yugular o la arteria carótida para permitir extraer muestras de sangre en serie durante el transcurso del estudio. Los animales se seleccionaron aleatoriamente en dos grupos de estudio, que contenían cada uno 3 animales/grupo como se muestra en la Tabla 40. La asignación de grupo se mantuvo para los ciclos 1 y 2. Cada animal recibió dos ciclos de tratamiento con los cuatro artículos de ensayo para facilitar la comparación de la reproducibilidad de la farmacocinética de insulina sobre una serie de ciclos de dosificación.

Se administraron por vía subcutánea (SC) artículos de ensayo en el flanco izquierdo de cada cerdo detrás de la línea media del cuerpo. Cada animal recibió una única dosis de embolada SC de la insulina indicada a 0,2 U/kg en un protocolo cada dos días. Para los artículos de ensayo Insulina U20 e Insulina-PH20 U20, se administraron 10,0  $\mu$ l/kg. Para los artículos de ensayo Insulina U100 e Insulina-PH20 U100, se administraron, 2,0  $\mu$ l/kg. Se recogieron muestras de sangre (0,7-1,0 ml de volumen) antes de la administración (presangrado), después a los 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos después de la administración. Las muestras de sangre se colocaron en tubos de suero que no contenían anticoagulante, se colocaron en hielo durante un mínimo de 30 minutos, después se centrifugaron a 9500 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El suero se transfirió después a un tubo preetiquetado, se congeló y se almacenó a -80 °C hasta que las muestras se enviaron a Millipore BioPharma Services (St. Charles, MO) para determinar los niveles de insulina inmunorreactiva (IRI).

Tabla 40. Protocolo de dosificación

| Ciclo | Dosis | Día | Grupo 1            | Grupo 2            |
|-------|-------|-----|--------------------|--------------------|
| 1     | 1     | 0   | Insulina-PH20 U100 | Insulina U20       |
|       | 2     | 2   | Insulina-PH20 U20  | Insulina U100      |
|       | 3     | 4   | Insulina U100      | Insulina-PH20 U20  |
|       | 4     | 6   | Insulina U20       | Insulina-PH20 U100 |
| 2     | 5     | 8   | Insulina-PH20 U20  | Insulina U100      |
|       | 6     | 10  | Insulina U20       | Insulina-PH20 U100 |
|       | 7     | 12  | Insulina-PH20 U100 | Insulina U20       |
|       | 8     | 14  | Insulina U100      | Insulina-PH20 U20  |

### B. Niveles de insulina en suero

- 5 Las concentraciones de IRI en suero se determinaron para cada muestra de suero por interpolación de una curva patrón usando software de análisis de ensayo StatLIA® (Brendan Technologies, Carlsbad, CA). La Tabla 41 proporciona la concentración de IRI en suero media después de la administración de Insulina U20, Insulina U100, Insulina-PH20 U20 e Insulina-PH20 U100. La Tabla 41 expone los niveles de IRI de línea basal, como se mide en las muestras de presangrado. Estas líneas basales se restaron después de las concentraciones de IRI reales
- 10 medidas en cada punto temporal para determinar la concentración de IRI ajustada a línea basal.

Se compararon los perfiles de concentración de insulina-tiempo después de cada ciclo de dosificación para cada grupo de tratamiento. Los perfiles de concentración de IRI en suero media-tiempo para cada artículo de ensayo, como se observa cuando se representa en una gráfica con la concentración de IRI en el eje Y frente al tiempo en el eje X, fue similar sobre ambos ciclos. En ambos ciclos de dosificación, la PK de la insulina se aceleró cuando se coadministró por vía subcutánea con la formulación de rHuPH20 para ambas concentraciones. Se construyeron modelos estadísticos adicionales que incluían efectos fijos para el tratamiento, secuencia, ciclo, la interacción de tratamiento por ciclo, y animal dentro de la secuencia para los datos de los ciclos 1 y 2 para parámetros PK primarios y secundarios (los parámetros PK primarios incluyeron: Área Bajo la Curva (ABC) para ventanas de tiempo asignadas,  $C_{máx}$ ,  $t_{máx}$ ,  $t_{50\%}$  Temprano y  $t_{50\%}$  Tardío; los parámetros PK secundarios incluían ventanas de tiempo más detalladas para ABC, MRT (último e infinito), Lambda z, HL Lambda z, Eliminación y Volumen de Distribución) y mostraron que no había efectos sistemático de secuencia, ciclo o animal, ni había una interacción entre el ciclo y el tratamiento para ninguna de estas variables.

25

Tabla 41. Perfiles de concentración de IRI en suero-tiempo

| Tiempo (minutos)                                      | Concentración de IRI media (pM) y desviación típica (DT) |       |               |       |                   |       |                    |       |
|---|--|-------|---------------|-------|-------------------|-------|--------------------|-------|
|   | Insulina U20   |       | Insulina U100 |       | Insulina-PH20 U20 |       | Insulina-PH20 U100 |       |
|   | Media  | DT    | Media         | DT    | Media             | DT    | Media              | DT    |
| 0 (línea basal de presangrado)                        | 91,6   | 53,0  | 89,0          | 49,6  | 114,3             | 55,8  | 71,8               | 48,4  |
| <i>Concentraciones de IRI ajustadas a línea basal</i> |  |       |               |       |                   |       |                    |       |
| 0   | 0,0  | 0,0   | 0,0           | 0,0   | 0,0               | 0,0   | 0,0                | 0,0   |
| 3   | 139,7  | 472,2 | 63,1          | 73,4  | 2,2               | 5,6   | 49,4               | 41,3  |
| 6   | 74,2   | 234,6 | 178,7         | 269,3 | 8,1               | 17,6  | 88,8               | 73,7  |
| 9   | 206,3  | 594,2 | 122,0         | 101,3 | 12,9              | 30,9  | 144,5              | 85,0  |
| 12  | 93,0   | 166,7 | 181,5         | 150,5 | 36,9              | 58,0  | 182,1              | 138,6 |
| 15  | 83,1   | 116,2 | 214,4         | 151,5 | 58,6              | 76,9  | 225,3              | 165,6 |
| 20  | 136,3  | 180,8 | 367,1         | 590,3 | 85,1              | 109,6 | 251,8              | 133,3 |
| 25  | 139,1  | 147,7 | 247,3         | 161,1 | 174,5             | 262,2 | 285,7              | 142,8 |
| 30  | 238,0  | 292,2 | 294,1         | 183,9 | 169,2             | 224,9 | 357,3              | 199,9 |

| Tiempo (minutos) | Concentración de IRI media (pM) y desviación típica (DT) |       |               |       |                   |       |                    |       |
|------------------|--|-------|---------------|-------|-------------------|-------|--------------------|-------|
|                  | Insulina U20   |       | Insulina U100 |       | Insulina-PH20 U20 |       | Insulina-PH20 U100 |       |
|                  | Media  | DT    | Media         | DT    | Media             | DT    | Media              | DT    |
| 45               | 203,3  | 117,5 | 249,0         | 133,5 | 134,3             | 147,6 | 234,7              | 115,8 |
| 60               | 185,5  | 127,6 | 174,8         | 101,8 | 102,5             | 65,1  | 252,1              | 169,1 |
| 90               | 106,1  | 67,7  | 131,2         | 128,1 | 85,4              | 87,8  | 222,7              | 144,7 |
| 120              | 70,8   | 71,9  | 73,0          | 47,0  | 70,9              | 61,7  | 153,7              | 54,8  |
| 180              | 78,0   | 92,3  | 64,2          | 119,3 | 87,4              | 101,3 | 69,4               | 59,1  |
| 240              | 25,7   | 32,2  | 26,0          | 44,7  | 23,0              | 36,9  | 23,3               | 26,5  |

**C. Farmacocinética de insulina**

- 5 Se usó el perfil de concentración de insulina-tiempo después de restar la concentración de insulina de línea basal (Tabla 41, anterior) para calcular los siguientes parámetros PK: incluyendo  $t_{m\acute{a}x}$ ,  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{50\%}$  Temprano,  $t_{50\%}$  Tardío y  $ABC_{intervalo}$ . Se moderaron los datos de IRI en suero frente al tiempo por análisis no compartimental usando el WinNonlin Professional modelo 200 (versión 5.2 Pharsight Corp., Mountain View, CA) y los parámetros PK calculados. Se realizaron cálculos de estadística y comparaciones estadísticas entre grupos usando SAS versión 9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC). Todos los análisis se realizaron usando un modelo mixto con efectos fijos para el tratamiento. Se asumió una matriz de covarianza simétrica de compuestos entre observaciones repetidas para cada animal. Se realizaron análisis para  $C_{m\acute{a}x}$  y todos los criterios de valoración de ABC usando valores transformados de forma logarítmica con valores de cero reemplazados por 1 antes de la transformación logarítmica (cero en la escala logarítmica). Los criterios de valoración basados en el tiempo se analizaron en la escala lineal original.
- 10
- 15 Se proporciona un sumario de la farmacocinética de la insulina después de administración subcutánea de Insulina U20, Insulina U100, Insulina-PH20 U20 e Insulina-PH20 U100, en la Tabla 42. Los diversos parámetros PK para cada insulina suministrada sola o con rHuPH20 se muestran como la media  $\pm$  DT. El % de control para cada parámetro (% de control = [valor PK para la insulina con rHuPH20] / [valor PK para insulina sola] x 100) también se proporciona en la tabla. Los cálculos del % de control se basaron en la media geométrica y p valor para datos transformados de forma logarítmica para parámetros  $C_{m\acute{a}x}$  y ABC, mientras que los cálculos del % de control se basaron en la media aritmética y los valores no transformados para  $t_{m\acute{a}x}$  y  $t_{50\%}$  Temprano y Tardío. N =16 cerdos a no ser que se indique otra cosa.
- 20

**Tabla 42. Parámetros PK de insulina después de la administración subcutánea con o sin rHuPH20**

|  | Insulina 20 U/ml         |                      |              |         | Insulina 100 U/ml         |                       |              |         |
|--|--------------------------|----------------------|--------------|---------|---------------------------|-----------------------|--------------|---------|
|  | Insulina 20U             | Insulina-rHuPH20 20U | % de control | P valor | Insulina 100U             | Insulina-rHuPH20 100U | % de control | P valor |
| $C_{m\acute{a}x}$ (pmol/l)             | 429 $\pm$ 508            | 462 $\pm$ 567        | 106          | 0,8439  | 238 $\pm$ 237             | 420 $\pm$ 208         | 237          | 0,0095  |
| $t_{50\%}$ % Temprano (min)            | 23 $\pm$ 14 <sub>b</sub> | 12 $\pm$ 5           | 52           | 0,1622  | 35 $\pm$ 38 <sub>c</sub>  | 12 $\pm$ 7            | 34           | 0,0063  |
| $t_{m\acute{a}x}$ (min)                | 57 $\pm$ 42              | 39 $\pm$ 21          | 68           | 0,2462  | 64 $\pm$ 49               | 47 $\pm$ 29           | 74           | 0,2775  |
| $t_{50\%}$ % Tardío (min)              | 84 $\pm$ 38 <sub>b</sub> | 77 $\pm$ 45          | 92           | 0,7689  | 109 $\pm$ 64 <sub>c</sub> | 112 $\pm$ 53          | 103          | 0,9315  |
| <b>Intervalo de ABC (min x nmol/l)</b> |                          |                      |              |         |                           |                       |              |         |
| <b>0-15 min</b>                        | 1,61 $\pm$ 4,37          | 1,95 $\pm$ 1,73      | 1920         | 0,0045  | 0,27 $\pm$ 0,40           | 1,75 $\pm$ 1,02       | 7104         | <0,0001 |
| <b>0-30 min</b>                        | 0,79 $\pm$ 6,24          | 6,35 $\pm$ 5,90      | 623          | 0,0567  | 2,14 $\pm$ 2,83           | 5,89 $\pm$ 2,89       | 2400         | 0,0015  |
| <b>0-1 h</b>                           | 10,02 $\pm$ 8,60         | 13,75 $\pm$ 8,92     | 179          | 0,2073  | 6,19 $\pm$ 6,78           | 13,98 $\pm$ 6,0       | 489          | 0,0012  |



|  | Insulina 20 U/ml         |                      |              |         | Insulina 100 U/ml        |                          |              |         |
|--|--------------------------|----------------------|--------------|---------|--------------------------|--------------------------|--------------|---------|
|  | Insulina 20U             | Insulina-rHuPH20 20U | % de control | P valor | Insulina 100U            | Insulina-rHuPH20 100U    | % de control | P valor |
| <b>0-última</b>  | 24,4 ± 11,6              | 27,5 ± 20,5          | 107          | 0,8777  | 18,5 ± 16,0              | 34,7 ± 14,6              | 354          | 0,0038  |
| <b>0-infinito</b>  | 30,1 ± 10,3 <sub>d</sub> | 29,8 ± 22,1          | 89           | 0,7027  | 27,8 ± 19,1 <sub>e</sub> | 44,8 ± 13,2 <sub>c</sub> | 214          | 0,0161  |
| <b>1-4 h</b>   | 14,6 ± 9,6               | 14,2 ± 12,2          | 97           | 0,9436  | 13,2 ± 11,3              | 22,2 ± 11,2              | 270          | 0,0204  |
| <b>2-4 h</b>   | 7,6 ± 6,5                | 6,5 ± 9,1            | 104          | 0,9720  | 8,1 ± 8,2                | 9,5 ± 5,4                | 398          | 0,1832  |
| <sub>b</sub> N=11 animales<br><sub>c</sub> N=10 animales<br><sub>d</sub> N=8 animales<br><sub>e</sub> N=9 animales |                          |                      |              |         |                          |                          |              |         |

#### D. Sumario

5 Este estudio examinó el efecto de la administración por vía subcutánea de la misma dosis de insulina total a diferentes concentraciones, con y sin rHuPH20.

10 En ausencia de la coadministración con rHuPH20, la reducción de la concentración de insulina de 100 U/ml a 20 U/ml dio como resultado absorción de insulina más rápida con un aumento de la concentración de insulina máxima y mayor exposición de insulina acumulativa tanto temprano como, en menor grado, en general. En relación con las inyecciones de control de 100 U/ml, la reducción de la concentración a 20 U/ml 1) aumentó la C<sub>máx</sub> 91 % de una media geométrica de 158 a 302 pmol/l; 2) redujo t<sub>50 %</sub> temprano medio de 35 a 23 minutos, t<sub>máx</sub> de 64 a 57 minutos y t<sub>50 %</sub> Tardío de 109 a 84 minutos; y 3) aumentó la media geométrica de ABC<sub>0-15</sub> 300 % de 20 a 80, ABC<sub>0-30</sub> 256 % de 222 a 791 y ABC<sub>última</sub> 131 % de 9.021 a 20.820 todo en unidades de pmol x min/l.

15 La coadministración de insulina regular a cualquiera de las concentraciones con rHuPH20 también dio como resultado absorción más rápida después de inyección subcutánea en relación con insulina sola. Sin embargo, a la menor concentración de insulina de 20 U/ml, los aumentos relativos sobre la insulina administrada sola no fueron tan drásticos ya que la insulina ya se había absorbido más rápido a 20 U/ml cuando se suministró sola (como se ha descrito anteriormente).

20 A la concentración de 100 U/ml, que se usa más típicamente por pacientes diabéticos, la coinfección con rHuPH20 1) aumentó la C<sub>máx</sub> 137 % de una media geométrica de 158 a 375 pmol/l (p=0,0095); 2) redujo el t<sub>50 %</sub> Temprano medio de 35 a 12 minutos (p=0,0063), mientras que t<sub>máx</sub> y T<sub>50 %</sub> Tardío no cambiaron significativamente; y 3) aumentó la mediana geométrica de ABC<sub>0-15</sub> 70 veces de 20 a 1438 (p<0,0001), ABC<sub>0-30</sub> 23 veces de 222 a 5337 (p=0,0015) y ABC<sub>última</sub> 250 % de 9.021 a 31.905 (p=0,0038) todos en unidades de pmol x min/l, en comparación con la administración de insulina sola a la concentración de 100 U/ml.

30 A la concentración de insulina menor de 20 U/ml, la coadministración con rHuPH20 dio como resultado los siguientes efectos en la PK de insulina, en comparación con la administración de insulina sola: 1) no se alteró significativamente la C<sub>máx</sub> con medias geométricas de 302 y 322 pmol/l (p=0,84); 2) t<sub>50 %</sub> temprano medio tuvo la tendencia menor de 23 a 12 minutos (p=0,16), mientras que t<sub>máx</sub> y t<sub>50 %</sub> Tardío no cambiaron significativamente; y 3) la medida geométrica de ABC<sub>0-15</sub> aumentó 18 veces de 80 a 1533 (p=0,0045), ABC<sub>0-30</sub> 5 veces de 791 a 4934 (p=0,0567) y ABC<sub>última</sub> no cambió a 20.820 y 22.184 (p=0,88) todos en unidades de pmol x min/l.

35 El aumento en la exposición máxima y aceleración de exposición tras la administración de rHuPH20 e insulina regular a 100 U/ml en relación con la inyección de insulina de control sin rHuPH20, se asemeja estrechamente a los estudios humanos previos (Ejemplo 1) y estudio de cerdo (Ejemplo 10). Estos resultados demuestran además que la cinética de insulina también puede acelerarse por administración a una concentración menor, que es coherente con una etapa de disociación del hexámero de insulina limitante de la velocidad que depende de la concentración (es decir cuando la insulina se administra por vía subcutánea sola, se absorbe cuando se disocia de un hexámero a monómeros, un proceso que se produce a concentraciones menores de insulina). Cuando se coadministra con rHuPH20, esta dependencia de la concentración de insulina se reduce en gran medida o incluso se elimina. Por lo tanto, el efecto dispersante de la hialuronidasa de la coadministración de rHuPH20 con insulina puede reducir la ralentización no deseada en la farmacocinética de insulina que se observa con la inyección de insulina a  
 45 concentraciones mayores.

**Ejemplo 13****Efecto de la concentración salina en rHuPH20 en presencia de metilparabeno**

5 Se evaluó el efecto de NaCl en la estabilidad de rHuPH20 con y sin el conservante metilparabeno, a temperatura acelerada (40 °C). Se prepararon doce formulaciones diferentes combinando rHuPH20 (10 mg/ml en histidina/HCl, pH 6,5, NaCl 130 mM) con seis concentraciones diferentes de NaCl, con o sin Metilparabeno (Fluka). Cada formulación contenía rHuPH20 10 mg/ml, Tris 25 mM, pH 7,3, Tween 80 0,01 % y NaCl 0,50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM o 250 mM con o sin metilparabeno 0,2 %. Las soluciones se separaron en alícuotas en frascos de vidrio de tipo I de 2 ml con tapones de goma y se sellaron con tapas de alúmina durante el estudio. Se almacenó un conjunto de frascos a 40 °C durante cuatro días y el otro conjunto se mantuvo en la nevera a 2-8 °C para actuar como un control positivo. Las muestras se ensayaron después con respecto a actividad hialuronidasa (enzimática). Para evaluar el nivel de agregados, se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando una columna G2000 SWXL (Tosoh Bioscience) con las siguientes condiciones con PBS 1 X como tampón de ejecución y un caudal establecido en 1 ml/minuto.

En la Tabla 43 se exponen los resultados del estudio, incluyendo actividad hialuronidasa (enzimática), % de pico principal (es decir el porcentaje de rHuPH20 que estaba contenido en el pico principal) y % de pico agregado (es decir el porcentaje de rHuPH20 que estaba contenido en el pico atribuido a los agregados). Se observó que la estabilidad de rHuPH20 era sensible a la concentración de NaCl. En general, cuando las formulaciones se incubaron a 40 °C, a medida que se reducía la concentración de NaCl, la actividad enzimática de rHuPH20 se redujo. Sin embargo, cuando se almacenó en nevera a 2-8 °C, la rHuPH20 conservó la actividad enzimática independientemente de la formulación. A temperatura elevada, cuando NaCl se eliminó completamente de la solución, se perdió la actividad completa de rHuPH20, tanto si hubo metilparabeno como si no. La pérdida de actividad enzimática se redujo a medida que aumentaba la concentración de NaCl. Hubo una diferencia significativa en la actividad enzimática (ensayo de t de muestras relacionadas, P=0,0228) entre muestras con y sin metilparabeno añadido.

Se observó una correlación similar de la concentración de NaCl y los niveles agregados de rHuPH20. Los niveles agregados aumentaron con la concentración de NaCl decreciente cuando las muestras se almacenaron a temperatura elevada. No hubo esencialmente ningún cambio con o sin metilparabeno añadido cuando se almacenó a 2-8 °C. Las formulaciones almacenadas a -40 °C que contenían metilparabeno formaron significativamente más agregado que las formulaciones que no contenían metilparabeno (ensayo de t de muestras relacionadas, P=0,0058).

Por lo tanto, tanto la actividad enzimática como el porcentaje de monómero de rHuPH20 como se evaluó por SEC se redujeron significativamente en formulaciones que contenían metilparabeno en comparación con las formulaciones que no contenían metilparabeno. Además, dentro del intervalo de concentración de NaCl ensayado (0-250 mM), hubo una relación directa entre la concentración de NaCl y el aumento de la estabilidad de rHuPH20.

**Tabla 43. Actividades enzimáticas y resultados de SEC de las muestras almacenadas 4 días a 40 °C y 4 °C.**

| Formulación           | Actividad enzimática (U/ml) |       | % de pico principal |       | % de pico agregado |       |
|-----------------------|-----------------------------|-------|---------------------|-------|--------------------|-------|
|                       | 4 °C                        | 40 °C | 4 °C                | 40 °C | 4 °C               | 40 °C |
| Sin NaCl, MP 0,2 %    | 12410                       | <LOD  | 99,65               | 0     | 0,35               | 100   |
| NaCl 50 mM, MP 0,2%   | 12470                       | 2990  | 99,22               | 2,86  | 0,78               | 97,14 |
| NaCl 100 mM, MP 0,2 % | 12380                       | 3530  | 100                 | 13,32 | 0                  | 86,68 |
| NaCl 150 mM, MP 0,2 % | 13510                       | 6200  | 100                 | 26,31 | 0                  | 73,69 |
| NaCl 200 mM, MP 0,2 % | 11250                       | 6220  | 99,49               | 51,84 | 0,51               | 48,16 |
| NaCl 250 mM, MP 0,2 % | 10740                       | 7340  | 100                 | 65,55 | 0                  | 34,45 |
| Sin NaCl, sin MP      | 10430                       | <LOD  | 99,4                | 0     | 0,6                | 100   |
| NaCl 50 mM, sin MP    | 12370                       | 3070  | 99,34               | 22,05 | 0,66               | 77,95 |
| NaCl 100 mM, sin MP   | 12580                       | 9930  | 99,47               | 72,81 | 0,53               | 27,19 |
| NaCl 150 mM, sin MP   | 12750                       | 11180 | 99,48               | 88,16 | 0,52               | 11,84 |
| NaCl 200 mM, sin MP   | 13660                       | 13340 | 99,64               | 96,22 | 0,36               | 3,78  |
| NaCl 250 mM, sin MP   | 11370                       | 11090 | 100                 | 98,05 | 0                  | 1,95  |

LOD= límite de detección

**Ejemplo 14.****Coformulaciones de insulina y rHuPH20**

5 Se realizó una serie de estudios para evaluar la estabilidad de rHuPH20 e insulina en diversas condiciones, tales como diversas temperaturas y pH, y formulaciones.

**1. Efecto de la osmolaridad y pH en rHuPH20**

- 10 En el primer estudio, se evaluó el efecto de osmolaridad y pH en la estabilidad de rHuPH20 (formulado como recombinante de Hylenex (Inyección Humana de Hialuronidasa)) preparando formulaciones con diversas concentraciones salinas y valores de pH, y evaluando cualquier pérdida de actividad después de almacenamiento en condiciones refrigeradas (5 °C), aceleradas (25 °C) y de tensión (25 °C, 35 °C y 40 °C) durante hasta 3 meses. Hylenex recombinante (Inyección Humana de Hialuronidasa) contiene rHuPH20 150 U/ml, NaCl 144 mM, fosfato sódico dibásico 10 mM, albúmina humana 1 mg/ml, Edetato disódico 2,7 mM, CaCl 2,7 mM y tiene un intervalo de osmolaridad de 290 a 350 mOsm y un pH de 7,4. Esta formulación se ajustó para preparar las 8 formulaciones (y Hylenex de control) expuestas en la Tabla 44. La actividad enzimática (es decir actividad hialuronidasa se determinó como se ha descrito anteriormente. El contenido de rHuPH20 también se determinó por RP-HPLC.
- 20 No se observaron cambios significativos en las condiciones de almacenamiento recomendadas (5 °C) o aceleradas (25 °C o 30 °C) para las cuatro soluciones preparadas en los límites de especificación de pH y osmolaridad o la solución de control en las condiciones de almacenamiento recomendadas. Se observó que rHuPH20 era estable a pH 7,4 y generalmente más estable en condiciones ácidas que básicas, como se evaluó por pérdida de actividad enzimática y pérdida de contenido de rHuPH20. El efecto de la fuerza iónica fue más modesto. A temperaturas elevadas, las formulaciones que contenían mayor fuerza iónica parecían ser ligeramente más estables que las de menor fuerza iónica. Hubo una reducción significativa en la estabilidad entre 35 °C y 40 °C.
- 25

**Tabla 44. Formulaciones de rHuPH20**

| Formulación (ajuste realizado)          | NaCl       |            | % de Hylenex | Osmolaridad (mOsm/kg) | pH         |
|---|------------|------------|--------------|-----------------------|------------|
|   | mM         | mg/ml      |              |                       |            |
| Más 21 % de volumen de H <sub>2</sub> O | 120        | 7,0        | 83           | 267                   | 7,5        |
| Más 10 % de volumen de H <sub>2</sub> O | 132        | 7,7        | 91           | 290                   | 7,5        |
| Más NaCl 19 mM                          | 164        | 9,6        | 100          | 350                   | 7,4        |
| Más NaCl 91 mM                          | 236        | 13,8       | 98           | 450                   | 7,3        |
| <b>Control</b>                          | <b>145</b> | <b>8,5</b> | <b>100</b>   | <b>325</b>            | <b>7,4</b> |
| Más HCl 5 mM                            | 150        | 8,8        | 100          | 328                   | 6,5        |
| Más HCl 8 mM                            | 153        | 8,9        | 99           | 331                   | 5,5        |
| Más NaOH 1,9 mM                         | 145        | 8,5        | 100          | 324                   | 8,6        |
| Más NaOH 2,2 mM                         | 145        | 8,5        | 100          | 323                   | 9,5        |

**30 2. Efecto del pH en rHuPH20**

Se evalúa el efecto de variar el pH del sistema de tampón en la estabilidad de rHuPH20. Se formuló rHuPH20 (1.200.000 U/ml, 10 mg/ml) en NaCl 130 mM, histidina 10 mM, con un pH de 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 o 7,0. Las formulaciones se almacenaron después a 5 °C durante 0, 3, 6, 9 y 12 meses; 25 °C en humedad relativa del 60 % durante 0, 3, 6, 9 y 12 meses, y 35 °C durante 0, 1, 2, 3 y 6 meses. A temperaturas refrigeradas, todas las formulaciones fueron estables durante todos los periodos de tiempo. La rHuPH20 permaneció dentro de los límites de la tendencia durante 12 meses a 5 °C, 6 meses a 25 °C y 3 meses a 35 °C para los artículos de ensayo a pH 6,0, 6,5 y 7,0. Las formulaciones preparadas de pH 5,0 y 5,5 fueron más sensibles a temperatura elevada, dando como resultado una reducción significativa de la actividad enzimática.

35

40

**3. Efecto del pH y conservante en rHuPH20 formulada con análogos de insulina**

Para evaluar el impacto del pH y conservante en la estabilidad de rHuPH20 formulada con análogos de insulina en condiciones de almacenamiento refrigeradas (5 °C), aceleradas (30 °C y 35 °C) y de agitación (25 °C) durante hasta 4 semanas, se combinó rHuPH20 con insulina lispro Humalog® o insulina aspart Novolog® y se evaluó la actividad enzimática y la estabilidad. La estabilidad de insulina se evaluó por RP-HPLC. Los artículos de ensayo se prepararon con rHuPH20 10 µg/ml, análogo de insulina 100 U/ml, NaCl 140 mM, Tris HCl 20 mM con fenol 0,2 %; m-

45

- 5 Cresol 0,2 %; parabeno 0,2 %; fenol 0,2 % y F68 0,1 %; o fenol 0,2 % y benzoato 1 mM. Cada una de estas formulaciones se preparó a pH 7, 7,25 y 7,5, dando como resultado un total de 30 artículos de ensayo (15 artículos de ensayo insulina lispro Humalog®/rHuPH20 y 15 artículos de ensayo insulina aspart Novolog®/rHuPH20). Los artículos de ensayo se almacenaron después a 5 °C, 30 °C, 35 °C y 25 °C con agitación durante 4 semanas. La actividad enzimática de rHuPH20 se evaluó en todas las condiciones. La solubilidad de la insulina se evaluó por RP-HPLC para artículos de ensayo almacenados a 5 °C y 25 °C con agitación.
- 10 Se observó que la actividad de rHuPH20 no se vio afectada por conservante o pH después de 4 semanas a 5 °C. En condiciones de tensión de agitación (20 °C), la actividad de rHuPH20 no se vio afectada cuando se coformuló con insulina aspart Novolog® y cualquiera de los conservantes a cualquiera de los pH ensayados. Por el contrario, en algunas formulaciones con insulina lispro Humalog®, tal como cuando se formula con fenol 0,02 %, m-cresol o fenol/benzoato, la actividad de rHuPH20 después de 6 horas se redujo en hasta el 75 %, más típicamente a medida que aumentaba el pH. Esta pérdida de actividad se correlacionó con la precipitación de insulina lispro Humalog®.
- 15 La Tabla 45 expone la actividad de rHuPH20 conservada en cada uno de los artículos de ensayo después de incubación a 30 °C y 35 °C. Se observó una ligera pérdida de actividad de rHuPH20 a un promedio de aproximadamente 85 % de actividad original a 30 °C. Se observó una pérdida mayor a 35 °C, particularmente, por ejemplo, en artículos de ensayo que contenían m-Cresol 0,2 % o parabeno 0,2 % a medida que aumentaba el pH.
- 20 La insulina aspart Novolog® permaneció estable y soluble en todas las formulaciones en todas las condiciones de almacenamiento. Aunque la solubilidad de insulina lispro Humalog® se conservó a pH 7,5 después de 4 semanas a 5 °C, la insulina lispro Humalog® se precipitó a pH menor (7,0 y 7,25) a esta temperatura. También se observó precipitación en condiciones de tensión de agitación después de 6 horas.
- 25 **Tabla 45. Actividad de rHuPH20 que permanece después de 4 semanas a 30 °C y 35 °C en formulaciones de análogo de insulina/rHuPH20**

| Formulación    | pH   | Actividad de rHuPH20 restante (%) |        |                   |        |                   |        |                   |        |
|----------------|------|-----------------------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|
|                |      | 30 °C                             |        |                   |        | 35 °C             |        |                   |        |
|                |      | insulina Humalog®                 | lispro | insulina Novolog® | aspart | insulina Humalog® | lispro | insulina Novolog® | aspart |
| Fenol          | 7,0  | 92                                |        | 92                |        | 77                |        | 74                |        |
|                | 7,25 | 89                                |        | 92                |        | 71                |        | 69                |        |
|                | 7,5  | 91                                |        | 92                |        | 69                |        | 60                |        |
| m-Cresol       | 7,0  | 82                                |        | 78                |        | 40                |        | 29                |        |
|                | 7,25 | 85                                |        | 81                |        | 29                |        | 21                |        |
|                | 7,5  | 77                                |        | 71                |        | 11                |        | 9                 |        |
| Parabeno       | 7,0  | 90                                |        | 89                |        | 29                |        | 34                |        |
|                | 7,25 | 90                                |        | 89                |        | 20                |        | 22                |        |
|                | 7,5  | 81                                |        | 79                |        | 8                 |        | 10                |        |
| Fenol/F68      | 7,0  | 93                                |        | 94                |        | 81                |        | 68                |        |
|                | 7,25 | 91                                |        | 92                |        | 75                |        | 61                |        |
|                | 7,5  | 90                                |        | 73                |        | 63                |        | 13                |        |
| Fenol/benzoato | 7,0  | 90                                |        | 88                |        | 73                |        | 67                |        |
|                | 7,25 | 91                                |        | 87                |        | 71                |        | 63                |        |
|                | 7,5  | 88                                |        | 86                |        | 64                |        | 58                |        |

Ya que resultarán evidentes para los expertos en la materia modificaciones, se pretende que la presente invención se limite solamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Halozyme, Inc. Frost, Gregory Bilinsky, Igor Vaughn, Daniel Sugarman, Barry
- 5 <120> Composiciones de insulina de acción súper rápida
- <130> 0119374-00100/3063PC
- <140> No asignado todavía
- 10 <141> Con la presente
- <150> US 61/125.835
- <151> 28-04-2008
- 15 <150> US 61/127.044
- <151> 09-05-2008
- <160> 273
- 20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 509
- <212> PRT
- 25 <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <223> PH20 humana precursora
- 30 <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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu  
 500 505

ES 2 531 630 T3

<210> 2  
<211> 474  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<220>  
<223> PH20 madura

10

<400> 2

```
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
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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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

<210> 3  
 <211> 482  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> rHuPH20 soluble precursora

10 <400> 3



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 |
|     |     |     | 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<211> 447  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>  
 <223> rHuPH20 soluble 1-447

<400> 4

```

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
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
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
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
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
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
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
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
    
```

10

Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp  
 290 295 300  
 Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp  
 305 310 315  
 Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu  
 325 330 335  
 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  
 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  
 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  
 435 440 445

<210> 5  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> rHuPH20 soluble 1-446

10

<400> 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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

ES 2 531 630 T3

```

      210              215              220
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
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
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
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
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
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
      435              440              445

```

<210> 6  
 <211> 445  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> rHuPH20 soluble 1-445

10 <400> 6

```

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
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
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
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

```

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 435 440 445

<210> 7  
 <211> 444  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> rHuPH20 soluble 1-444

10 <400> 7

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  
 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  
 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  |     |
| 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 |
|     |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |
|     |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| Pro | Asp | Ala | Lys | Ser | Pro | Leu | Pro | Val | Phe | Ala | Tyr | Thr | Arg | Ile | Vai |
|     |     |     | 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 |
|     |     |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |     |
|     |     |     | 435 |     |     |     | 440 |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 8  
 <211> 443  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> rHuPH20 soluble 1-443

10

<400> 8

ES 2 531 630 T3

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 435 440

<210> 9  
 <211> 442  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> rHuPH20 soluble 1-442

<400> 9

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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

435

440

5

<210> 10  
 <211> 450



ES 2 531 630 T3

<212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<220>  
 <223> hialuronidasa

5

<400> 10

```

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

Ala Gly Ala Gly Asp Pro Lys Leu Pro Val Leu Pro Tyr Met Gln Leu  
 290 295 300  
 Phe Tyr Asp Met Thr Asn His Phe Leu Pro Ala Glu Leu Glu His  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Gly Glu Ser Ala Ala Gln Gly Ala Ala Gly Val Val Leu Trp  
 325 330 335  
 Val Ser Trp Leu Ser Thr Ser Thr Lys Glu Ser Cys Gln Ala Ile Lys  
 340 345 350  
 Glu Tyr Val Asp Thr Thr Leu Gly Pro Ser Ile Leu Asn Val Thr Ser  
 355 360 365  
 Gly Ala Arg Leu Cys Ser Gln Val Leu Cys Ser Gly His Gly Arg Cys  
 370 375 380  
 Ala Arg Arg Pro Ser Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ile Leu Asn Ser Thr  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Ser Ile Lys Pro Thr Pro Gly Gly Gly Pro Leu Thr Leu Gln  
 405 410 415  
 Gly Ala Leu Ser Leu Glu Asp Arg Leu Arg Met Ala Val Glu Phe Glu  
 420 425 430  
 Cys Arg Cys Tyr Arg Gly Trp Arg Gly Thr Arg Cys Glu Gln Trp Gly  
 435 440 445  
 Met Trp  
 450

<210> 11  
 <211> 553  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

5

<220>  
 <223> PH20

10

<400> 11

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

Phe Glu Thr Ala Gly Lys Ser Phe Met Gln Glu Thr Leu Lys Leu Gly  
 195 200 205  
 Lys Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp  
 210 215 220  
 Cys Tyr Asn His Asn His Asn Gln Pro Thr Tyr Asn Gly Asn Cys Pro  
 225 230 235 240  
 Asp Val Glu Lys Arg Arg Asn Asp Asp Leu Glu Trp Leu Trp Lys Glu  
 245 250 255  
 Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Asn Ile Arg Leu Lys Ser  
 260 265 270  
 Thr Gln Asn Ala Ala Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Gln Glu Ala Ile  
 275 280 285  
 Arg Leu Ser Lys Ile Ala Ser Val Glu Ser Pro Leu Pro Val Phe Val  
 290 295 300  
 Tyr Ala Arg Pro Val Phe Thr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Leu Ser Gln  
 305 310 315 320  
 Gly Asp Leu Val Asn Ser Val Gly Glu Ile Val Ser Leu Gly Ala Ser  
 325 330 335  
 Gly Ile Ile Met Trp Gly Ser Leu Asn Leu Ser Leu Ser Met Gln Ser  
 340 345 350  
 Cys Met Asn Leu Gly Thr Tyr Leu Asn Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile  
 355 360 365  
 Ile Asn Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys His  
 370 375 380  
 Asn Glu Gly Val Cys Thr Arg Lys His Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu  
 385 390 395 400  
 His Leu Asn Pro Met Asn Phe Ala Ile Gln Thr Gly Glu Gly Gly Lys  
 405 410 415  
 Tyr Thr Val Pro Gly Thr Val Thr Leu Glu Asp Leu Gln Lys Phe Ser  
 420 425 430  
 Asp Thr Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ala Asn Ile His Cys Lys Lys Arg  
 435 440 445  
 Val Asp Ile Lys Asn Val His Ser Val Asn Val Cys Met Ala Glu Asp  
 450 455 460  
 Ile Cys Ile Asp Ser Pro Val Lys Leu Gln Pro Ser Asp His Ser Ser  
 465 470 475 480  
 Ser Gln Glu Ala Ser Thr Thr Thr Phe Ser Ser Ile Ser Pro Ser Thr  
 485 490 495  
 Thr Thr Ala Thr Val Ser Pro Cys Thr Pro Glu Lys His Ser Pro Glu  
 500 505 510  
 Cys Leu Lys Val Arg Cys Ser Glu Val Ile Pro Asn Val Thr Gln Lys  
 515 520 525  
 Ala Cys Gln Ser Val Lys Leu Lys Asn Ile Ser Tyr Gln Ser Pro Ile  
 530 535 540  
 Gln Asn Ile Lys Asn Gln Thr Thr Tyr  
 545 550

<210> 12  
 <211> 331  
 <212> PRT  
 <213> *Vespula vulgaris*

5

<220>  
 <223> hialuronidasa A

10

<400> 12

Ser Glu Arg Pro Lys Arg Val Phe Asn Ile Tyr Trp Asn Val Pro Thr

```

1           5           10           15
Phe Met Cys His Gln Tyr Asp Leu Tyr Phe Asp Glu Val Thr Asn Phe
20
Asn Ile Lys Arg Asn Ser Lys Asp Asp Phe Gln Gly Asp Lys Ile Ala
35
Ile Phe Tyr Asp Pro Gly Glu Phe Pro Ala Leu Leu Ser Leu Lys Asp
50
Gly Lys Tyr Lys Lys Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln Glu Gly Asn Ile
65
Thr Ile His Leu Gln Lys Phe Ile Glu Asn Leu Asp Lys Ile Tyr Pro
85
Asn Arg Asn Phe Ser Gly Ile Gly Val Ile Asp Phe Glu Arg Trp Arg
100
Pro Ile Phe Arg Gln Asn Trp Gly Asn Met Lys Ile His Lys Asn Phe
115
Ser Ile Asp Leu Val Arg Asn Glu His Pro Thr Trp Asn Lys Lys Met
130
Ile Glu Leu Glu Ala Ser Lys Arg Phe Glu Lys Tyr Ala Arg Phe Phe
145
Met Glu Glu Thr Leu Lys Leu Ala Lys Lys Thr Arg Lys Gln Ala Asp
165
Trp Gly Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Cys Phe Asn Met Ser Pro Asn Asn
180
Leu Val Pro Glu Cys Asp Val Thr Ala Met His Glu Asn Asp Lys Met
195
Ser Trp Leu Phe Asn Asn Gln Asn Val Leu Leu Pro Ser Val Tyr Val
210
Arg Gln Glu Leu Thr Pro Asp Gln Arg Ile Gly Leu Val Gln Gly Arg
225
Val Lys Glu Ala Val Arg Ile Ser Asn Asn Leu Lys His Ser Pro Lys
245
Val Leu Ser Tyr Trp Trp Tyr Val Tyr Gln Asp Glu Thr Asn Thr Phe
260
Leu Thr Glu Thr Asp Val Lys Lys Thr Phe Gln Glu Ile Val Ile Asn
275
Gly Gly Asp Gly Ile Ile Ile Trp Gly Ser Ser Ser Asp Val Asn Ser
290
Leu Ser Lys Cys Lys Arg Leu Gln Asp Tyr Leu Leu Thr Val Leu Gly
305
Pro Ile Ala Ile Asn Val Thr Glu Ala Val Asn
325
330

```

<210> 13  
 <211> 340  
 <212> PRT  
 <213> *Vespula vulgaris*

<220>  
 <223> hialuronidasa B

<400> 13

```

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

```

ES 2 531 630 T3

Ile Ser Leu Phe Tyr Asp Pro Gly Asn Phe Pro Ser Met Val Leu Leu  
50 55 60  
Lys Asn Gly Thr Tyr Glu Ile Arg Asn Glu Gly Val Pro Gln Lys Gly  
65 70 75 80  
Asn Leu Thr Ile His Leu Glu Gln Phe Thr Lys Glu Leu Asp Glu Ile  
85 90 95  
Tyr Pro Lys Lys Ile Ala Gly Gly Ile Gly Val Ile His Phe His Asn  
100 105 110  
Trp Arg Pro Ile Phe Arg Arg Asn Val Asp Asn Leu Lys Ile Asn Lys  
115 120 125  
Asp Ile Ser Ile Asp Leu Val Arg Lys Glu His Pro Lys Trp Asp Lys  
130 135 140  
Ser Met Ile Glu Lys Glu Ala Ser Asn Arg Phe Glu Thr Ser Ala Lys  
145 150 155 160  
Ile Phe Met Glu Lys Thr Leu Lys Leu Ala Lys Glu Ile Arg Lys Lys  
165 170 175  
Thr Glu Trp Gly Tyr His Gly Tyr Pro His Cys Leu Ser Gly Ser Thr  
180 185 190  
Asp Lys Pro Ser Phe Asp Cys Asp Ala Leu Ser Met Ser Glu Asn Asp  
195 200 205  
Lys Met Ser Trp Leu Phe Asn Asn Gln Asn Val Leu Leu Pro Ser Ile  
210 215 220  
Tyr Leu Lys Asn Val Leu Lys Pro Asp Glu Lys Ile His Leu Val Gln  
225 230 235 240  
Glu Arg Leu Lys Glu Ala Ile Arg Ile Ser Lys Asn Phe Lys His Leu  
245 250 255  
Pro Lys Val Leu Pro Tyr Trp Trp Tyr Thr Tyr Gln Asp Lys Glu Ser  
260 265 270  
Ile Phe Leu Thr Glu Ala Asp Val Lys Asn Thr Phe Lys Glu Ile Leu  
275 280 285  
Thr Asn Gly Ala Asp Gly Ile Ile Ile Trp Gly Val Ser Tyr Glu Leu  
290 295 300  
Thr Asp Arg Lys Arg Cys Glu Lys Leu Lys Glu Tyr Leu Met Lys Ile  
305 310 315 320  
Leu Gly Pro Ile Ala Phe Lys Val Thr Lys Ala Val Lys Glu Asn Thr  
325 330 335  
Pro Leu Asn Phe  
340

<210> 14  
<211> 382  
5 <212> PRT  
<213> *Apis mellifera*

<220>  
10 <223> hialuronidasa

<400> 14

Met Ser Arg Pro Leu Val Ile Thr Glu Gly Met Met Ile Gly Val Leu  
1 5 10 15  
Leu Met Leu Ala Pro Ile Asn Ala Leu Leu Leu Gly Phe Val Gln Ser  
20 25 30  
Thr Pro Asp Asn Asn Lys Thr Val Arg Glu Phe Asn Val Tyr Trp Asn  
35 40 45  
Val Pro Thr Phe Met Cys His Lys Tyr Gly Leu Arg Phe Glu Glu Val  
50 55 60  
Ser Glu Lys Tyr Gly Ile Leu Gln Asn Trp Met Asp Lys Phe Arg Gly

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Glu | Glu | Ile | Ala | Ile | Leu | Tyr | Asp | Pro | Gly | Met | Phe | Pro | Ala | Leu | Leu |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Lys | Asp | Pro | Asn | Gly | Asn | Val | Val | Ala | Arg | Asn | Gly | Gly | Val | Pro | Gln |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Leu | Gly | Asn | Leu | Thr | Lys | His | Leu | Gln | Val | Phe | Arg | Asp | His | Leu | Ile |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Asn | Gln | Ile | Pro | Asp | Lys | Ser | Phe | Pro | Gly | Val | Gly | Val | Ile | Asp | Phe |
|     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |
| Glu | Ser | Trp | Arg | Pro | Ile | Phe | Arg | Gln | Asn | Trp | Ala | Ser | Leu | Gln | Pro |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Tyr | Lys | Lys | Leu | Ser | Val | Glu | Val | Val | Arg | Arg | Glu | His | Pro | Phe | Trp |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |
| Asp | Asp | Gln | Arg | Val | Glu | Gln | Glu | Ala | Lys | Arg | Arg | Phe | Glu | Lys | Tyr |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Gly | Gln | Leu | Phe | Met | Glu | Glu | Thr | Leu | Lys | Ala | Ala | Lys | Arg | Met | Arg |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |
| Pro | Ala | Ala | Asn | Trp | Gly | Tyr | Tyr | Ala | Tyr | Pro | Tyr | Cys | Tyr | Asn | Leu |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |
| Thr | Pro | Asn | Gln | Pro | Ser | Ala | Gln | Cys | Glu | Ala | Thr | Thr | Met | Gln | Glu |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Asn | Asp | Lys | Met | Ser | Trp | Leu | Phe | Glu | Ser | Glu | Asp | Val | Leu | Leu | Pro |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     | 255 |
| Ser | Val | Tyr | Leu | Arg | Trp | Asn | Leu | Thr | Ser | Gly | Glu | Arg | Val | Gly | Leu |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Val | Gly | Gly | Arg | Val | Lys | Glu | Ala | Leu | Arg | Ile | Ala | Arg | Gln | Met | Thr |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |
| Thr | Ser | Arg | Lys | Lys | Val | Leu | Pro | Tyr | Tyr | Trp | Tyr | Lys | Tyr | Gln | Asp |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |
| Arg | Arg | Asp | Thr | Asp | Leu | Ser | Arg | Ala | Asp | Leu | Glu | Ala | Thr | Leu | Arg |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Lys | Ile | Thr | Asp | Leu | Gly | Ala | Asp | Gly | Phe | Ile | Ile | Trp | Gly | Ser | Ser |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Asp | Asp | Ile | Asn | Thr | Lys | Ala | Lys | Cys | Leu | Gln | Phe | Arg | Glu | Tyr | Leu |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Asn | Asn | Glu | Leu | Gly | Pro | Ala | Val | Lys | Arg | Ile | Ala | Leu | Asn | Asn | Asn |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Ala | Asn | Asp | Arg | Leu | Thr | Val | Asp | Val | Ser | Val | Asp | Gln | Val |     |     |
|     | 370 |     |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |

<210> 15  
 <211> 331  
 <212> PRT  
 <213> *Dolichovespula maculata*

<220>  
 <223> hialuronidasa

<400> 15

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Glu | Arg | Pro | Lys | Arg | Val | Phe | Asn | Ile | Tyr | Trp | Asn | Val | Pro | Thr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Phe | Met | Cys | His | Gln | Tyr | Gly | Leu | Tyr | Phe | Asp | Glu | Val | Thr | Asn | Phe |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Asn | Ile | Lys | His | Asn | Ser | Lys | Asp | Asp | Phe | Gln | Gly | Asp | Lys | Ile | Ser |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ile | Phe | Tyr | Asp | Pro | Gly | Glu | Phe | Pro | Ala | Leu | Leu | Pro | Leu | Lys | Glu |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

Gly Asn Tyr Lys Ile Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln Glu Gly Asn Ile  
65 70 75 80  
Thr Ile His Leu Gln Arg Phe Ile Glu Asn Leu Asp Lys Thr Tyr Pro  
85 90 95  
Asn Arg Asn Phe Asn Gly Ile Gly Val Ile Asp Phe Glu Arg Trp Arg  
100 105 110  
Pro Ile Phe Arg Gln Asn Trp Gly Asn Met Met Ile His Lys Lys Phe  
115 120 125  
Ser Ile Asp Leu Val Arg Asn Glu His Pro Phe Trp Asp Lys Lys Met  
130 135 140  
Ile Glu Leu Glu Ala Ser Lys Arg Phe Glu Lys Tyr Ala Arg Leu Phe  
145 150 155 160  
Met Glu Glu Thr Leu Lys Leu Ala Lys Lys Thr Arg Lys Gln Ala Asp  
165 170 175  
Trp Gly Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Cys Phe Asn Met Ser Pro Asn Asn  
180 185 190  
Leu Val Pro Asp Cys Asp Ala Thr Ala Met Leu Glu Asn Asp Lys Met  
195 200 205  
Ser Trp Leu Phe Asn Asn Gln Asn Val Leu Leu Pro Ser Val Tyr Ile  
210 215 220  
Arg His Glu Leu Thr Pro Asp Gln Arg Val Gly Leu Val Gln Gly Arg  
225 230 235 240  
Val Lys Glu Ala Val Arg Ile Ser Asn Asn Leu Lys His Ser Pro Lys  
245 250 255  
Val Leu Ser Tyr Trp Trp Tyr Val Tyr Gln Asp Asp Thr Asn Thr Phe  
260 265 270  
Leu Thr Glu Thr Asp Val Lys Lys Thr Phe Gln Glu Ile Ala Ile Asn  
275 280 285  
Gly Gly Asp Gly Ile Ile Ile Trp Gly Ser Ser Ser Asp Val Asn Ser  
290 295 300  
Leu Ser Lys Cys Lys Arg Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Thr Val Leu Gly  
305 310 315 320  
Pro Ile Thr Val Asn Val Thr Glu Thr Val Asn  
325 330

<210> 16  
<211> 367  
5 <212> PRT  
<213> *Polistes annularis*

<220>  
10 <223> hialuronidasa

<400> 16

Tyr Val Ser Leu Ser Pro Asp Ser Val Phe Asn Ile Ile Thr Asp Asp  
1 5 10 15  
Ile Ser His Gln Ile Leu Ser Arg Ser Asn Cys Glu Arg Ser Lys Arg  
20 25 30  
Pro Lys Arg Val Phe Ser Ile Tyr Trp Asn Val Pro Thr Phe Met Cys  
35 40 45  
His Gln Tyr Gly Met Asn Phe Asp Glu Val Thr Asp Phe Asn Ile Lys  
50 55 60  
His Asn Ser Lys Asp Asn Phe Arg Gly Glu Thr Ile Ser Ile Tyr Tyr  
65 70 75 80  
Asp Pro Gly Lys Phe Pro Ala Leu Met Pro Leu Lys Asn Gly Asn Tyr  
85 90 95  
Glu Glu Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln Arg Gly Asn Ile Thr Ile His

```

                100                105                110
Leu Gln Gln Phe Asn Glu Asp Leu Asp Lys Met Thr Pro Asp Lys Asn
                115                120                125
Phe Gly Gly Ile Gly Val Ile Asp Phe Glu Arg Trp Lys Pro Ile Phe
                130                135                140
Arg Gln Asn Trp Gly Asn Thr Glu Ile His Lys Lys Tyr Ser Ile Glu
145                150                155
Leu Val Arg Lys Glu His Pro Lys Trp Ser Glu Ser Met Ile Glu Ala
                165                170                175
Glu Ala Thr Lys Lys Phe Glu Lys Tyr Ala Arg Tyr Phe Met Glu Glu
                180                185                190
Thr Leu Lys Leu Ala Lys Lys Thr Arg Lys Arg Ala Lys Trp Gly Tyr
195                200                205
Tyr Gly Phe Pro Tyr Cys Tyr Asn Val Thr Pro Asn Asn Pro Gly Pro
210                215                220
Asp Cys Asp Ala Lys Ala Thr Ile Glu Asn Asp Arg Leu Ser Trp Met
225                230                235
Tyr Asn Asn Gln Glu Ile Leu Phe Pro Ser Val Tyr Val Arg His Glu
                245                250                255
Gln Lys Pro Glu Glu Arg Val Tyr Leu Val Gln Gly Arg Ile Lys Glu
260                265                270
Ala Val Arg Ile Ser Asn Asn Leu Glu His Ser Pro Ser Val Leu Ala
275                280                285
Tyr Trp Trp Tyr Val Tyr Gln Asp Lys Met Asp Ile Tyr Leu Ser Glu
290                295                300
Thr Asp Val Glu Lys Thr Phe Gln Glu Ile Val Thr Asn Gly Gly Asp
305                310                315
Gly Ile Ile Ile Trp Gly Ser Ser Ser Asp Val Asn Ser Leu Ser Lys
                325                330                335
Cys Lys Arg Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Asn Thr Leu Gly Pro Phe Ala
                340                345                350
Val Asn Val Thr Glu Thr Val Asn Gly Arg Ser Ser Leu Asn Phe
                355                360                365

```

<210> 17  
 <211> 462  
 5 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<220>  
 <223> hialuronidasa

10 <400> 17

```

Met Leu Gly Leu Thr Gln His Ala Gln Lys Val Trp Arg Met Lys Pro
 1                5                10                15
Phe Ser Pro Glu Val Ser Pro Gly Ser Ser Pro Ala Thr Ala Gly His
                20                25                30
Leu Leu Arg Ile Ser Thr Leu Phe Leu Thr Leu Leu Glu Leu Ala Gln
35                40                45
Val Cys Arg Gly Ser Val Val Ser Asn Arg Pro Phe Ile Thr Val Trp
50                55                60
Asn Gly Asp Thr His Trp Cys Leu Thr Glu Tyr Gly Val Asp Val Asp
65                70                75                80
Val Ser Val Phe Asp Val Val Ala Asn Lys Glu Gln Ser Phe Gln Gly
                85                90                95
Ser Asn Met Thr Ile Phe Tyr Arg Glu Glu Leu Gly Thr Tyr Pro Tyr

```



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |
| Tyr | Thr | Pro | Thr | Gly | Glu | Pro | Val | Phe | Gly | Gly | Leu | Pro | Gln | Asn | Ala |
|     |     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |     | 125 |
| Ser | Leu | Val | Thr | His | Leu | Ala | His | Thr | Phe | Gln | Asp | Ile | Lys | Ala | Ala |
|     |     |     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     |     |     | 140 |
| Met | Pro | Glu | Pro | Asp | Phe | Ser | Gly | Leu | Ala | Val | Ile | Asp | Trp | Glu | Ala |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |
| Trp | Arg | Pro | Arg | Trp | Ala | Phe | Asn | Trp | Asp | Ser | Lys | Asp | Ile | Tyr | Arg |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 175 |
| Gln | Arg | Ser | Met | Glu | Leu | Val | Gln | Ala | Glu | His | Pro | Asp | Trp | Pro | Glu |
|     |     |     |     | 180 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 190 |
| Thr | Leu | Val | Glu | Ala | Ala | Ala | Lys | Asn | Gln | Phe | Gln | Glu | Ala | Ala | Glu |
|     |     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     |     | 205 |
| Ala | Trp | Met | Ala | Gly | Thr | Leu | Gln | Leu | Gly | Gln | Val | Leu | Arg | Pro | Arg |
|     |     |     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     |     | 220 |
| Gly | Leu | Trp | Gly | Tyr | Tyr | Gly | Phe | Pro | Asp | Cys | Tyr | Asn | Asn | Asp | Phe |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |
| Leu | Ser | Leu | Asn | Tyr | Thr | Gly | Gln | Cys | Pro | Val | Phe | Val | Arg | Asp | Gln |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |
| Asn | Asp | Gln | Leu | Gly | Trp | Leu | Trp | Asn | Gln | Ser | Tyr | Ala | Leu | Tyr | Pro |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     |     | 270 |
| Ser | Ile | Tyr | Leu | Pro | Ala | Ala | Leu | Met | Gly | Thr | Gly | Lys | Ser | Gln | Met |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     |     | 285 |
| Tyr | Val | Arg | His | Arg | Val | Gln | Glu | Ala | Leu | Arg | Val | Ala | Ile | Val | Ser |
|     |     |     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     |     | 300 |
| Arg | Asp | Pro | His | Val | Pro | Val | Met | Pro | Tyr | Val | Gln | Ile | Phe | Tyr | Glu |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |
| Met | Thr | Asp | Tyr | Leu | Leu | Pro | Leu | Glu | Glu | Leu | Glu | His | Ser | Leu | Gly |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |
| Glu | Ser | Ala | Ala | Gln | Gly | Val | Ala | Gly | Ala | Val | Leu | Trp | Leu | Ser | Ser |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 350 |
| Asp | Lys | Thr | Ser | Thr | Lys | Glu | Ser | Cys | Gln | Ala | Ile | Lys | Ala | Tyr | Met |
|     |     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     |     | 365 |
| Asp | Ser | Thr | Leu | Gly | Pro | Phe | Ile | Val | Asn | Val | Thr | Ser | Ala | Ala | Leu |
|     |     |     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     |     | 380 |
| Leu | Cys | Ser | Glu | Ala | Leu | Cys | Ser | Gly | His | Gly | Arg | Cys | Val | Arg | His |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     |     | 395 |     |     |     | 400 |
| Pro | Ser | Tyr | Pro | Glu | Ala | Leu | Leu | Thr | Leu | Asn | Pro | Ala | Ser | Phe | Ser |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     | 415 |
| Ile | Glu | Leu | Thr | His | Asp | Gly | Arg | Pro | Pro | Ser | Leu | Lys | Gly | Thr | Leu |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 420 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 430 |
| Ser | Leu | Lys | Asp | Arg | Ala | Gln | Met | Ala | Met | Lys | Phe | Arg | Cys | Arg | Cys |
|     |     |     |     | 435 |     |     |     | 440 |     |     |     |     |     |     | 445 |
| Tyr | Arg | Gly | Trp | Arg | Gly | Lys | Trp | Cys | Asp | Lys | Arg | Gly | Met |     |     |
|     |     |     |     | 450 |     |     | 455 |     |     |     |     |     |     |     | 460 |

<210> 18  
 <211> 473  
 5 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<220>  
 <223> Hialuronidasa 2

10 <400> 18

Met Arg Ala Gly Leu Gly Pro Ile Ile Thr Leu Ala Leu Val Leu Glu

ES 2 531 630 T3

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

465

470

<210> 19  
 <211> 412  
 <212> PRT

5

ES 2 531 630 T3

<213> *Mus musculus*

<220>

<223> hialuronidasa 3

5

<400> 19

```

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

```

10

<210> 20

<211> 435

<212> PRT

ES 2 531 630 T3

<213> *Sus scrofa*

<220>

<223> hialuronidasa

5

<400> 20

```

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

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

```

10

ES 2 531 630 T3

<210> 21  
 <211> 419  
 <212> PRT  
 <213> *Sus scrofa*

5

<220>  
 <223> hialuronidasa 3

<400> 21

10

```

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

ES 2 531 630 T3

<210> 22  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> *Rattus norvegicus*

5

<220>  
 <223> hialuronidasa 1

10

```

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

195 200 205  
Arg Pro Arg Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Gly Phe Pro Asp Cys Tyr Asn  
210 215 220  
Tyr Asp Phe Leu Ser Pro Asn Tyr Thr Gly Gln Cys Ser Leu Ser Ile  
225 230 235 240  
His Asp Gln Asn Asp Gln Leu Gly Trp Leu Trp Asn Gln Ser Tyr Ala  
245 250 255  
Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Pro Ala Ala Leu Met Gly Thr Gly Lys  
260 265 270  
Ser Gln Met Tyr Val Arg Tyr Arg Val Gln Glu Ala Phe Arg Leu Ala  
275 280 285  
Leu Val Ser Arg Asp Pro His Val Pro Ile Met Pro Tyr Val Gln Ile  
290 295 300  
Phe Tyr Glu Lys Thr Asp Tyr Leu Leu Pro Leu Glu Glu Leu Glu His  
305 310 315 320  
Ser Leu Gly Glu Ser Ala Ala Gln Gly Ala Ala Gly Ala Val Leu Trp  
325 330 335  
Ile Ser Ser Glu Lys Thr Ser Thr Lys Glu Ser Cys Gln Ala Ile Lys  
340 345 350  
Ala Tyr Met Asp Ser Thr Leu Gly Pro Phe Ile Leu Asn Val Thr Ser  
355 360 365  
Ala Ala Leu Leu Cys Ser Glu Ala Leu Cys Ser Gly Arg Gly Arg Cys  
370 375 380  
Val Arg His Pro Ser Tyr Pro Glu Ala Leu Leu Thr Leu Ser Pro Ala  
385 390 395 400  
Ser Phe Ser Ile Glu Pro Thr His Asp Gly Arg Pro Leu Ser Leu Lys  
405 410 415  
Gly Thr Leu Ser Leu Lys Asp Arg Ala Gln Met Ala Met Lys Phe Lys  
420 425 430  
Cys Arg Cys Tyr Arg Gly Trp Ser Gly Glu Trp Cys Lys Lys Gln Asp  
435 440 445  
Met

- <210> 23
- <211> 473
- 5 <212> PRT
- <213> *Rattus norvegicus*
  
- <220>
- <223> hialuronidasa 2
  
- 10 <400> 23

Met Arg Ala Gly Leu Gly Pro Ile Ile Thr Leu Ala Leu Val Leu Glu  
1 5 10 15  
Val Ala Trp Ala Ser Glu Leu Lys Pro Thr Ala Pro Pro Ile Phe Thr  
20 25 30  
Gly Arg Pro Phe Val Val Ala Trp Asn Val Pro Thr Gln Glu Cys Ala  
35 40 45  
Pro Arg His Lys Val Pro Leu Asp Leu Arg Ala Phe Asp Val Glu Ala  
50 55 60  
Thr Pro Asn Glu Gly Phe Phe Asn Gln Asn Ile Thr Thr Phe Tyr Tyr  
65 70 75 80  
Asp Arg Leu Gly Leu Tyr Pro Arg Phe Asp Ala Ala Gly Met Ser Val  
85 90 95  
His Gly Gly Val Pro Gln Asn Gly Ser Leu Cys Ala His Leu Pro Met  
100 105 110

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

<210> 24  
 <211> 412  
 5 <212> PRT  
 <213> *Rattus norvegicus*

<220>  
 <223> hialuronidasa 3

10 <400> 24

Met Ile Thr Gln Leu Gly Leu Thr Leu Val Val Gly Leu Thr Leu Cys



ES 2 531 630 T3

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

<210> 25  
 <211> 545  
 <212> PRT  
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5

<220>  
 <223> PH20

10

<400> 25

ES 2 531 630 T3

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

ES 2 531 630 T3

```

                420                425                430
Phe Ser Lys Asn Phe Gln Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Leu Asn Cys Lys
      435                440                445
Glu Arg Thr Asp Met Asn Asn Val Arg Thr Val Asn Val Cys Ala Val
      450                455                460
Glu Asn Val Cys Ile Asp Thr Asn Val Gly Pro Gln Ala Val Thr Tyr
465                470                475                480
Ala Pro Lys Glu Lys Lys Asp Val Ala His Ile Leu Ser Asn Thr Thr
      485                490                495
Ser Ile Asn Ser Ser Thr Thr Met Ser Leu Pro Phe Pro Arg Lys His
      500                505                510
Val Ser Gly Cys Leu Leu Val Leu Cys Met Tyr Ser Gln Tyr Leu Asn
      515                520                525
Ile Cys Tyr Arg Leu Val Ala Ile Gly Ile Gln His Gly Tyr Tyr Leu
      530                535                540
Lys
545

```

<210> 26  
 <211> 476  
 <212> PRT  
 <213> *Ovis aries*

5

<220>  
 <223> hialuronidasa 2

10

<400> 26

```

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

```

Leu Ser Trp Leu Trp Ala Glu Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr  
 245 250 255  
 Leu Glu Glu Thr Leu Ala Ser Ser Thr His Gly Arg Asn Phe Val Ser  
 260 265 270  
 Phe Arg Val Gln Glu Ala Leu Arg Val Ala Asp Val His His Ala Asn  
 275 280 285  
 His Ala Leu Pro Val Tyr Val Phe Thr Arg Pro Thr Tyr Ser Arg Gly  
 290 295 300  
 Leu Thr Gly Leu Ser Glu Met Asp Leu Ile Ser Thr Ile Gly Glu Ser  
 305 310 315 320  
 Ala Ala Leu Gly Ala Ala Gly Val Ile Leu Trp Gly Asp Ala Gly Phe  
 325 330 335  
 Thr Thr Ser Asn Glu Thr Cys Arg Arg Leu Lys Asp Tyr Leu Thr Arg  
 340 345 350  
 Ser Leu Val Pro Tyr Val Val Asn Val Ser Trp Ala Ala Gln Tyr Cys  
 355 360 365  
 Ser Trp Ala Gln Cys His Gly His Gly Arg Cys Val Arg Arg Asp Pro  
 370 375 380  
 Asn Ala His Thr Phe Leu His Leu Ser Ala Ser Ser Phe Arg Leu Val  
 385 390 395 400  
 Pro Ser His Ala Pro Asp Glu Pro Arg Leu Arg Pro Glu Gly Glu Leu  
 405 410 415  
 Ser Trp Ala Asp Arg Asn His Leu Gln Thr His Phe Arg Cys Gln Cys  
 420 425 430  
 Tyr Leu Gly Trp Gly Gly Glu Gln Cys Gln Trp Asp Arg Arg Arg Ala  
 435 440 445  
 Ala Gly Gly Ala Ser Gly Ala Trp Ala Gly Ser His Leu Thr Gly Leu  
 450 455 460  
 Leu Ala Val Ala Val Leu Ala Phe Thr Trp Thr Ser  
 465 470 475

5 <210> 27  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> *Ovis aries*

10 <220>  
 <223> secuencia parcial de PH20  
 <400> 27

Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Leu Ser Lys Ile  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Val Glu Ser Pro Leu Pro Val Phe Val Tyr His Arg Pro Val  
 20 25 30  
 Phe Thr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Leu Ser Gln Gly Asp Leu Val Asn  
 35 40 45  
 Ser Val Gly Glu Ile Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Ile Met Trp  
 50 55 60  
 Gly Ser Leu Asn Leu Ser Leu Thr Met Gln Ser Cys Met Asn Leu Gly  
 65 70 75 80  
 Asn Tyr Leu Asn Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu  
 85 90 95  
 Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys  
 100 105 110  
 Ile Arg

15 <210> 28  
 <211> 414  
 <212> PRT  
 <213> *Pongo pygmaeus*

20 <220>  
 <223> hialuronidasa 3

<400> 28

```

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

Gly Asp Trp Lys Ser Phe Ser Cys His Cys Tyr Trp Gly Trp Ala Gly
 385     390     395     400
Pro Thr Cys Gln Glu Pro Arg Leu Gly Pro Lys Glu Ala Val
 405     410

```

5 <210> 29  
 <211> 510  
 <212> PRT  
 <213> *Macaca fascicularis*

10 <220>  
 <223> PH20

<400> 29

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 | Ile | 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  |     |     |     |     |
| Asn | Glu | Pro | Leu | Asp | Met | Ser | Leu | Phe | Thr | Leu | Met | Gly | Ser | Pro | Arg |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ile | Asn | Val | Thr | Gly | Gln | Gly | Val | Thr | Ile | Phe | Tyr | Val | Asp | Arg | Leu |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Gly | Tyr | Tyr | Pro | Tyr | Ile | Asp | Leu | Thr | Thr | Gly | Val | Thr | Val | His | Gly |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gly | Ile | Pro | Gln | Lys | Val | Ser | Leu | Gln | Asp | His | Leu | Asp | Lys | Ser | Lys |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gln | Asp | Ile | Leu | 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 | Pro | Gln | Ala | Thr | Asp | Lys | Ala | Lys | Gln | Glu | Phe |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Glu | Lys | Ala | Gly | Lys | Asp | Phe | Met | Leu | Glu | Thr | Ile | Lys | Leu | Gly | Arg |
|     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Ser | Leu | Arg | Pro | Asn | His | Leu | Trp | Gly | Tyr | Tyr | Leu | Phe | Pro | Asp | Cys |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Tyr | Asn | His | His | Tyr | Arg | Lys | Pro | Gly | Tyr | Asn | Gly | Ser | Cys | Phe | Asp |
| 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 | Val | Val |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Val | 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 | Asn | Pro | Leu | Pro | Val | Phe | Val | Tyr | Ala |
|     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Arg | Leu | Val | Phe | Thr | Asp | Gln | Val | Leu | Lys | Phe | Leu | Ser | Arg | Glu | Glu |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Leu | Val | Ser | Thr | Leu | Gly | Glu | Thr | Val | Ala | Leu | Gly | Ala | Ser | Gly | Ile |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Val | Ile | Trp | Gly | Ser | Leu | Ser | Ile | Thr | Arg | Ser | Met | Lys | Ser | Cys | Leu |

```

          340                      345                      350
Leu Leu Asp Thr 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
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asp Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                      390                      395                      400
Asn Pro Asp Asn Phe Asp Ile Arg Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
          405                      410                      415
Val His Gly Lys Pro Thr Val Glu Asp Leu Glu Glu Phe Ser Glu Lys
          420                      425                      430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Thr Asn 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 Ser Leu Lys Pro Pro Val Glu Thr Glu Gly Ser Pro Pro
465                      470                      475                      480
Ile Phe Tyr Asn Thr Ser Ser Ser Thr Val Ser Thr Thr Met Phe Ile
          485                      490                      495
Val Asn Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
          500                      505                      510

```

<210> 30  
 <211> 529  
 <212> PRT  
 <213> *Cavia porcellus*

<220>  
 <223> PH20

<400> 30

```

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

```

ES 2 531 630 T3

Leu Arg Pro Ser Ser Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr  
 210 215 220  
 Asn Thr His Phe Thr Lys Pro Asn Tyr Asp Gly His Cys Pro Pro Ile  
 225 230 235 240  
 Glu Leu Gln Arg Asn Asn Asp Leu Gln Trp Leu Trp Asn Asp Ser Thr  
 245 250 255  
 Ala Leu Tyr Pro Ser Val Tyr Leu Thr Ser Arg Val Arg Ser Ser Gln  
 260 265 270  
 Asn Gly Ala Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val His Glu Ser Ile Arg Val  
 275 280 285  
 Ser Lys Leu Met Asp Asp Lys Asn Pro Leu Pro Ile Tyr Val Tyr Ile  
 290 295 300  
 Arg Leu Val Phe Thr Asp Gln Thr Thr Thr Phe Leu Glu Leu Asp Asp  
 305 310 315 320  
 Leu Val His Ser Val Gly Glu Ile Val Pro Leu Gly Val Ser Gly Ile  
 325 330 335  
 Ile Ile Trp Gly Ser Leu Ser Leu Thr Arg Ser Leu Val Ser Cys Ile  
 340 345 350  
 Gly Leu Glu Asn Tyr Met Lys Gly Thr Leu Leu Pro Tyr Leu Ile Asn  
 355 360 365  
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Gly Gln Val Leu Cys Lys Asn Gln  
 370 375 380  
 Gly Ile Cys Thr Arg Lys Asp Trp Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His Leu  
 385 390 395 400  
 Asn Ala Thr Asn Phe Asp Ile Glu Leu Gln Gln Asn Gly Lys Phe Val  
 405 410 415  
 Val His Gly Lys Pro Ser Leu Glu Asp Leu Gln Glu Phe Ser Lys Asn  
 420 425 430  
 Phe His Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Val Ala Cys Lys Asp Arg Leu Asp  
 435 440 445  
 Val His Asn Val Arg Ser Val Asn Val Cys Thr Ala Asn Asn Ile Cys  
 450 455 460  
 Ile Asp Ala Val Leu Asn Phe Pro Ser Leu Asp Asp Asp Asp Glu Pro  
 465 470 475 480  
 Pro Ile Thr Asp Asp Thr Ser Gln Asn Gln Asp Ser Ile Ser Asp Ile  
 485 490 495  
 Thr Ser Ser Ala Pro Pro Ser Ser His Ile Leu Pro Lys Asp Leu Ser  
 500 505 510  
 Trp Cys Leu Phe Leu Leu Ser Ile Phe Ser Gln His Trp Lys Tyr Leu  
 515 520 525  
 Leu

- <210> 31
- <211> 512
- 5 <212> PRT
- <213> *Rattus norvegicus*
- <220>
- <223> PH20
- 10 <400> 31

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



ES 2 531 630 T3

Phe Val Trp Val Trp Asn Val Pro Thr Glu Ala Cys Val Glu Asn Val  
 50 55 60  
 Thr Glu Pro Ile Asp Leu Ser Phe Phe Ser Leu Ile Gly Ser Pro Arg  
 65 70 75 80  
 Lys Thr Ala Ile Gly Gln Pro Val Thr Leu Phe Tyr Val Asp Arg Leu  
 85 90 95  
 Gly Asn Tyr Pro His Ile Asp Ala Gln Gln Thr Glu His His Gly Gly  
 100 105 110  
 Ile Pro Gln Lys Gly Asp Leu Thr Thr His Leu Val Lys Ala Lys Glu  
 115 120 125  
 Asp Val Glu Arg Tyr Ile Pro Thr Asp Lys Leu Gly Leu Ala Ile Ile  
 130 135 140  
 Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Met Arg Asn Trp Thr Pro Lys  
 145 150 155 160  
 Asp Ile Tyr Arg Asn Lys Ser Ile Glu Leu Val Gln Ala Ala Asp Pro  
 165 170 175  
 Ala Ile Asn Ile Thr Glu Ala Thr Val Arg Ala Lys Ala Gln Phe Glu  
 180 185 190  
 Gly Ala Ala Lys Glu Phe Met Glu Gly Thr Leu Lys Leu Gly Lys His  
 195 200 205  
 Ile Arg Pro Lys His Leu Trp Gly Phe Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr  
 210 215 220  
 Asn Asn Lys Phe Gln Val Asp Asn Tyr Asp Gly Gln Cys Pro Asp Val  
 225 230 235 240  
 Glu Lys Lys Arg Asn Asp Asp Leu Asp Trp Leu Trp Lys Glu Ser Thr  
 245 250 255  
 Gly Leu Tyr Pro Ser Val Tyr Leu Lys Lys Asp Leu Lys Ser Ser Arg  
 260 265 270  
 Lys Ala Thr Leu Tyr Val Arg Tyr Arg Val Leu Glu Ser Ile Arg Val  
 275 280 285  
 Ser Lys Val Ser Asp Glu Ser Asn Pro Val Pro Ile Phe Val Tyr Ile  
 290 295 300  
 Arg Leu Val Phe Thr Asp His Val Ser Glu Tyr Leu Leu Glu Asp Asp  
 305 310 315 320  
 Leu Val Asn Thr Ile Gly Glu Ile Val Ala Gln Gly Thr Ser Gly Ile  
 325 330 335  
 Ile Ile Trp Asp Ala Met Ser Leu Ala Gln Arg Ser Ala Gly Cys Pro  
 340 345 350  
 Ile Leu Arg Gln Tyr Met Lys Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile Val Asn  
 355 360 365  
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Thr Leu Cys Lys Glu Lys  
 370 375 380  
 Gly Met Cys Ser Arg Lys Thr Glu Ser Ser Asp Ala Tyr Leu His Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Pro Ser Ser Phe Ser Ile Asn Val Thr Glu Ala Gly Lys Tyr Glu  
 405 410 415  
 Val Leu Gly Lys Pro Glu Val Lys Asp Leu Glu Tyr Phe Ser Glu His  
 420 425 430  
 Phe Lys Cys Ser Cys Phe Ser Lys Met Thr Cys Glu Glu Thr Ser Asp  
 435 440 445  
 Met Arg Ser Ile Gln Asp Val Asn Val Cys Met Gly Asp Asn Val Cys  
 450 455 460  
 Ile Lys Ala Thr Leu Gly Pro Asn Ser Ala Phe His Leu Leu Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Lys Gly Leu Leu Leu Met Thr Thr Leu Ala His Ile Leu His His Leu  
 485 490 495  
 Pro His Asp Ile Phe Val Phe Pro Trp Lys Met Leu Val Ser Thr Pro  
 500 505 510

<210> 32  
 <211> 512  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<220>  
 <223> PH20

<400> 32

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

```

Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Thr Leu Cys Asn Glu Lys
  370                               375                               380
Gly Met Cys Ser Arg Arg Lys Glu Ser Ser Asp Val Tyr Leu His Leu
  385                               390                               395                               400
Asn Pro Ser His Phe Asp Ile Met Leu Thr Glu Thr Gly Lys Tyr Glu
                               405                               410                               415
Val Leu Gly Asn Pro Arg Val Gly Asp Leu Glu Tyr Phe Ser Glu His
  420                               425                               430
Phe Lys Cys Ser Cys Phe Ser Arg Met Thr Cys Lys Glu Thr Ser Asp
  435                               440                               445
Val Lys Asn Val Gln Asp Val Asn Val Cys Val Gly Asp Asn Val Cys
  450                               455                               460
Ile Lys Ala Lys Val Glu Pro Asn Pro Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly
  465                               470                               475                               480
Lys Ser Leu Leu Phe Met Thr Thr Leu Gly His Val Leu Tyr His Leu
  485                               490                               495
Pro Gln Asp Ile Phe Val Phe Pro Arg Lys Thr Leu Val Ser Thr Pro
  500                               505                               510
    
```

<210> 33  
 <211> 807  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*

5

<220>  
 <223> hialuronidasa

10

<400> 33

```

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

Lys Asn Thr Asn Leu Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr Pro Lys
  180                              185                              190
Ser Leu Thr Asn Thr Leu Ile Leu Leu Asn Asp Gln Phe Ser Asn Glu
  195                              200                              205
Glu Lys Lys Lys Phe Thr Ala Pro Ile Lys Thr Phe Ala Pro Asp Ser
  210                              215                              220
    
```

Asp Lys Ile Leu Ser Ser Val Gly Lys Ala Glu Leu Ala Lys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Asn Leu Val Asp Ile Ser Lys Val Lys Leu Leu Glu Cys Ile Ile Glu  
 245 250 255  
 Glu Asp Lys Asp Met Met Lys Lys Ser Ile Asp Ser Phe Asn Lys Val  
 260 265 270  
 Phe Thr Tyr Val Gln Asp Ser Ala Thr Gly Lys Glu Arg Asn Gly Phe  
 275 280 285  
 Tyr Lys Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Gln Asp Val Pro Tyr Thr Gly  
 290 295 300  
 Ala Tyr Gly Val Val Leu Leu Glu Gly Ile Ser Gln Met Met Pro Met  
 305 310 315 320  
 Ile Lys Glu Thr Pro Phe Asn Asp Lys Thr Gln Asn Asp Thr Thr Leu  
 325 330 335  
 Lys Ser Trp Ile Asp Asp Gly Phe Met Pro Leu Ile Tyr Lys Gly Glu  
 340 345 350  
 Met Met Asp Leu Ser Arg Gly Arg Ala Ile Ser Arg Glu Asn Glu Thr  
 355 360 365  
 Ser His Ser Ala Ser Ala Thr Val Met Lys Ser Leu Leu Arg Leu Ser  
 370 375 380  
 Asp Ala Met Asp Asp Ser Thr Lys Ala Lys Tyr Lys Lys Ile Val Lys  
 385 390 395 400  
 Ser Ser Val Glu Ser Asp Ser Ser Tyr Lys Gln Asn Asp Tyr Leu Asn  
 405 410 415  
 Ser Tyr Ser Asp Ile Asp Lys Met Lys Ser Leu Met Thr Asp Asn Ser  
 420 425 430  
 Ile Ser Lys Asn Gly Leu Thr Gln Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Asp Met  
 435 440 445  
 Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Asp Leu Asp Phe Ala Phe Gly Leu  
 450 455 460  
 Ser Met Thr Ser Lys Asn Val Ala Arg Tyr Glu Ser Ile Asn Gly Glu  
 465 470 475 480  
 Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn  
 485 490 495  
 Ser Asp Val Lys His Tyr His Asp Asn Phe Trp Val Thr Ala Asp Met  
 500 505 510  
 Lys Arg Leu Ser Gly Thr Thr Thr Leu Asp Asn Glu Ile Leu Lys Asp  
 515 520 525  
 Thr Asp Asp Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly Gly Thr Lys Val  
 530 535 540  
 Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val  
 565 570 575  
 Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro Val  
 580 585 590  
 Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Leu Tyr Thr Asp  
 595 600 605  
 Asp Lys Gln Thr Thr Asn Ser Asp Asn Gln Glu Asn Asn Ser Val Phe  
 610 615 620  
 Leu Glu Ser Thr Asp Thr Lys Lys Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu Asn  
 625 630 635 640  
 Lys Pro Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp Lys  
 645 650 655  
 Glu Ile Asn Lys Ser Gln Lys Asp Thr Gln Lys Thr Asp Glu Tyr Tyr  
 660 665 670  
 Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Ser Asp Asn Lys Tyr Gly Tyr Val

ES 2 531 630 T3

```

          675                      680                      685
Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Asp Val Phe Lys Thr Lys Lys Asp Glu
      690                      695                      700
Val Thr Val Val Lys Gln Glu Asp Asp Phe His Val Val Lys Asp Asn
705                      710                      715
Glu Ser Val Trp Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asn Ser Thr Gln Thr Phe
      725                      730                      735
Asp Ile Asn Asn Thr Lys Val Glu Val Lys Ala Lys Gly Met Phe Ile
      740                      745                      750
Leu Lys Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr Asn Pro
      755                      760                      765
Glu Ser Thr Asn Ser Ala Ser Asp Ile Glu Ser Lys Ile Ser Met Thr
      770                      775                      780
Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Lys Asn Thr Ser Thr Ser Asn Glu Ser Gly
785                      790                      795                      800
Val His Phe Glu Leu Thr Lys
          805
    
```

<210> 34  
 <211> 371  
 <212> PRT  
 <213> Bacteriófago de *Streptococcus pyogenes* H4489A

<220>  
 <223> hialuronidasa

<400> 34

```

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

Glu Gly Gly Ser Ala Met Gln Ile Arg Gly Val Glu Lys Ala Leu Gly  
 245 250 255  
 Thr Leu Lys Ile Thr His Glu Asn Pro Asn Val Glu Ala Lys Tyr Asp  
 260 265 270  
 Glu Asn Ala Ala Ala Leu Ser Ile Asp Ile Val Lys Lys Gln Lys Gly  
 275 280 285  
 Gly Lys Gly Thr Ala Ala Gln Gly Ile Tyr Ile Asn Ser Thr Ser Gly  
 290 295 300  
 Thr Ala Gly Lys Met Leu Arg Ile Arg Asn Lys Asn Glu Asp Lys Phe  
 305 310 315 320  
 Tyr Val Gly Pro Asp Gly Gly Phe His Ser Gly Ala Asn Ser Thr Val  
 325 330 335  
 Ala Gly Asn Leu Thr Val Lys Asp Pro Thr Ser Gly Lys His Ala Ala  
 340 345 350  
 Thr Lys Asp Tyr Val Asp Glu Lys Ile Ala Glu Leu Lys Lys Leu Ile  
 355 360 365  
 Leu Lys Lys  
 370

<210> 35  
 <211> 1628  
 <212> PRT  
 <213> *Clostridium perfringens*

5

<220>  
 <223> hialuronidasa

10

<400> 35

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 225 |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |
| Leu | Ser | Glu | Ile | Lys | Lys | Leu | Ala | Gln | Val | Gly | Asn | Glu | Thr | Lys | Asn |     |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     | 255 |     |
| Arg | Tyr | Val | Tyr | Ala | Leu | His | Pro | Phe | Met | Asn | Asn | Pro | Val | Arg | Phe |     |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Asp | Thr | Glu | Glu | Asn | Tyr | Gln | Asn | Asp | Leu | Gly | Val | Ile | Lys | Ala | Lys |     |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     |
| Phe | Thr | Gln | Leu | Leu | Glu | Asn | Asp | Val | Arg | Gln | Phe | Ala | Ile | Leu | Ala |     |
|     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |
| Asp | Asp | Ala | Ser | Ala | Pro | Ala | Gln | Gly | Ala | Ser | Met | Tyr | Val | Lys | Leu |     |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |
| Leu | Thr | Asp | Leu | Thr | Arg | Trp | Leu | Glu | Glu | Gln | Gln | Ser | Thr | Tyr | Pro |     |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |     |
| Asp | Leu | Lys | Thr | Asp | Leu | Met | Phe | Cys | Pro | Ser | Asp | Tyr | Tyr | Gly | Asn |     |
|     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     | 350 |     |     |     |
| Gly | Ser | Ser | Ala | Gln | Leu | Lys | Glu | Leu | Asn | Lys | Ala | Glu | Asp | Asn | Val |     |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |     |
| Ser | Ile | Val | Met | Thr | Gly | Gly | Arg | Ile | Trp | Gly | Glu | Val | Asp | Glu | Asn |     |
|     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |     |
| Phe | Ala | Asn | Asn | Phe | Met | Asn | Asn | Ile | Ser | Thr | Glu | Gly | His | Pro | Gly |     |
| 385 |     |     |     | 390 |     |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |     |
| Arg | Ala | Pro | Phe | Phe | Trp | Ile | Asn | Trp | Pro | Cys | Ser | Asp | Asn | Ser | Lys |     |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |     |
| Gln | His | Leu | Ile | Met | Gly | Gly | Asn | Asp | Thr | Phe | Leu | His | Pro | Gly | Val |     |
|     |     | 420 |     |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |     |
| Asp | Pro | Ser | Lys | Ile | Asp | Gly | Ile | Val | Leu | Asn | Pro | Met | Gln | Gln | Ala |     |
|     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     |     | 445 |     |     |     |     |
| Glu | Ala | Asn | Lys | Ser | Ala | Leu | Phe | Ala | Ile | Ala | Asp | Tyr | Ala | Trp | Asn |     |
|     | 450 |     |     |     | 455 |     |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |     |
| Ile | Trp | Asp | Asn | Lys | Glu | Glu | Ala | Asp | Glu | Asn | Trp | Asn | Asp | Ser | Phe |     |
| 465 |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     |     | 480 |     |
| Lys | Tyr | Met | Asp | His | Gly | Thr | Ala | Glu | Glu | Thr | Asn | Ser | Ser | Leu | Ala |     |
|     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     |     | 495 |     |     |
| Leu | Arg | Glu | Ile | Ser | Lys | His | Met | Ile | Asn | Gln | Asn | Met | Asp | Gly | Arg |     |
|     |     | 500 |     |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |     |
| Val | Arg | Pro | Leu | Gln | Glu | Ser | Val | Glu | Leu | Ala | Pro | Lys | Leu | Glu | Ala |     |
|     | 515 |     |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Phe | Lys | Gln | Lys | Tyr | Asp | Ser | Gly | Ala | Ser | Ile | Lys | Glu | Asp | Ala | Leu |     |
|     | 530 |     |     |     | 535 |     |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |     |
| Glu | Leu | Ile | Ala | Glu | Phe | Thr | Asn | Leu | Gln | Lys | Ala | Ala | Asp | Tyr | Tyr |     |
| 545 |     |     |     | 550 |     |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |     |
| Lys | Asn | Asn | Pro | Gly | Asn | Glu | Arg | Thr | Arg | Asp | Gln | Ile | Ile | Tyr | Trp |     |
|     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     |     | 575 |     |     |
| Leu | Asn | Cys | Trp | Glu | Asp | Thr | Met | Asp | Ala | Ala | Ile | Gly | Tyr | Leu | Lys |     |
|     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     |     | 590 |     |     |     |
| Ser | Ala | Ile | Ala | Ile | Glu | Glu | Gly | Asp | Asp | Glu | Ala | Ala | Trp | Ala | Asn |     |
|     | 595 |     |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |     |
| Tyr | Ser | Glu | Ala | Gln | Gly | Ala | Phe | Glu | Lys | Ser | Lys | Thr | Tyr | Gly | Phe |     |
|     | 610 |     |     |     | 615 |     |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |     |
| His | Tyr | Val | Asp | His | Thr | Glu | Tyr | Ala | Glu | Val | Gly | Val | Gln | His | Ile |     |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |     |
| Val | Pro | Phe | Ile | Lys | Ser | Met | Gly | Gln | Asn | Leu | Ser | Val | Val | Ile | Gly |     |
|     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     |     | 655 |     |     |
| Ser | Ile | Val | Asp | Pro | Asn | Arg | Ile | Ile | Ala | Thr | Tyr | Ile | Ser | Asn | Arg |     |
|     | 660 |     |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |     |     |
| Gln | Asp | Ala | Pro | Thr | Gly | Asn | Pro | Asp | Asn | Ile | Phe | Asp | Asn | Asn | Ala |     |
|     | 675 |     |     |     | 680 |     |     |     |     |     | 685 |     |     |     |     |     |
| Ser | Thr | Glu | Leu | Val | Tyr | Lys | Asn | Pro | Asn | Arg | Ile | Asp | Val | Gly | Thr |     |

|      |     |      |      |      |      |     |      |      |      |      |     |      |      |      |      |  |  |  |  |
|------|-----|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|--|--|--|--|
| 690  |     |      |      |      | 695  |     |      |      |      |      | 700 |      |      |      |      |  |  |  |  |
| Tyr  | Val | Gly  | Val  | Lys  | Tyr  | Ser | Asn  | Pro  | Ile  | Thr  | Leu | Asn  | Asn  | Val  | Glu  |  |  |  |  |
| 705  |     |      |      |      | 710  |     |      |      |      | 715  |     |      |      |      | 720  |  |  |  |  |
| Phe  | Leu | Met  | Gly  | Ala  | Asn  | Ser | Asn  | Pro  | Asn  | Asp  | Thr | Met  | Gln  | Lys  | Ala  |  |  |  |  |
|      |     |      |      | 725  |      |     |      |      | 730  |      |     |      |      | 735  |      |  |  |  |  |
| Lys  | Ile | Gln  | Tyr  | Thr  | Val  | Asp | Gly  | Arg  | Glu  | Trp  | Ile | Asp  | Leu  | Glu  | Glu  |  |  |  |  |
|      |     |      | 740  |      |      |     | 745  |      |      |      |     |      | 750  |      |      |  |  |  |  |
| Gly  | Val | Glu  | Tyr  | Thr  | Met  | Pro | Gly  | Ala  | Ile  | Lys  | Val | Glu  | Asn  | Leu  | Asp  |  |  |  |  |
|      |     | 755  |      |      |      |     | 760  |      |      |      |     | 765  |      |      |      |  |  |  |  |
| Leu  | Lys | Val  | Arg  | Gly  | Val  | Arg | Leu  | Ile  | Ala  | Thr  | Glu | Ala  | Arg  | Glu  | Asn  |  |  |  |  |
|      | 770 |      |      |      |      | 775 |      |      |      |      | 780 |      |      |      |      |  |  |  |  |
| Thr  | Trp | Leu  | Gly  | Val  | Arg  | Asp | Ile  | Asn  | Val  | Asn  | Lys | Lys  | Glu  | Asp  | Ser  |  |  |  |  |
| 785  |     |      |      |      | 790  |     |      |      |      | 795  |     |      |      |      | 800  |  |  |  |  |
| Asn  | Ser | Gly  | Val  | Glu  | Phe  | Asn | Pro  | Ser  | Leu  | Ile  | Arg | Ser  | Glu  | Ser  | Trp  |  |  |  |  |
|      |     |      |      | 805  |      |     |      |      | 810  |      |     |      |      | 815  |      |  |  |  |  |
| Gln  | Val | Tyr  | Glu  | Gly  | Asn  | Glu | Ala  | Asn  | Leu  | Leu  | Asp | Gly  | Asp  | Asp  | Asn  |  |  |  |  |
|      |     |      | 820  |      |      |     |      | 825  |      |      |     |      | 830  |      |      |  |  |  |  |
| Thr  | Gly | Val  | Trp  | Tyr  | Lys  | Thr | Leu  | Asn  | Gly  | Asp  | Thr | Ser  | Leu  | Ala  | Gly  |  |  |  |  |
|      |     | 835  |      |      |      |     | 840  |      |      |      |     | 845  |      |      |      |  |  |  |  |
| Glu  | Phe | Ile  | Gly  | Leu  | Asp  | Leu | Gly  | Lys  | Glu  | Ile  | Lys | Leu  | Asp  | Gly  | Ile  |  |  |  |  |
|      | 850 |      |      |      |      | 855 |      |      |      |      | 860 |      |      |      |      |  |  |  |  |
| Arg  | Phe | Val  | Ile  | Gly  | Lys  | Asn | Gly  | Gly  | Gly  | Ser  | Ser | Asp  | Lys  | Trp  | Asn  |  |  |  |  |
| 865  |     |      |      |      | 870  |     |      |      |      | 875  |     |      |      |      | 880  |  |  |  |  |
| Lys  | Phe | Lys  | Leu  | Glu  | Tyr  | Ser | Leu  | Asp  | Asn  | Glu  | Ser | Trp  | Thr  | Thr  | Ile  |  |  |  |  |
|      |     |      |      | 885  |      |     |      |      | 890  |      |     |      |      | 895  |      |  |  |  |  |
| Lys  | Glu | Tyr  | Asp  | Lys  | Thr  | Gly | Ala  | Pro  | Ala  | Gly  | Lys | Asp  | Val  | Ile  | Glu  |  |  |  |  |
|      |     |      | 900  |      |      |     |      | 905  |      |      |     |      | 910  |      |      |  |  |  |  |
| Glu  | Ser | Phe  | Glu  | Thr  | Pro  | Ile | Ser  | Ala  | Lys  | Tyr  | Ile | Arg  | Leu  | Thr  | Asn  |  |  |  |  |
|      |     | 915  |      |      |      |     | 920  |      |      |      |     | 925  |      |      |      |  |  |  |  |
| Met  | Glu | Asn  | Ile  | Asn  | Lys  | Trp | Leu  | Thr  | Phe  | Ser  | Glu | Phe  | Ala  | Ile  | Ile  |  |  |  |  |
|      | 930 |      |      |      |      | 935 |      |      |      |      | 940 |      |      |      |      |  |  |  |  |
| Ser  | Asp | Glu  | Leu  | Glu  | Asn  | Ala | Gly  | Asn  | Lys  | Glu  | Asn | Val  | Tyr  | Thr  | Asn  |  |  |  |  |
| 945  |     |      |      |      | 950  |     |      |      |      | 955  |     |      |      |      | 960  |  |  |  |  |
| Thr  | Glu | Leu  | Asp  | Leu  | Leu  | Ser | Leu  | Ala  | Lys  | Glu  | Asp | Val  | Thr  | Lys  | Leu  |  |  |  |  |
|      |     |      |      | 965  |      |     |      |      | 970  |      |     |      |      | 975  |      |  |  |  |  |
| Ile  | Pro | Thr  | Asp  | Asp  | Ile  | Ser | Leu  | Asn  | His  | Gly  | Glu | Tyr  | Ile  | Gly  | Val  |  |  |  |  |
|      |     |      | 980  |      |      |     |      | 985  |      |      |     |      | 990  |      |      |  |  |  |  |
| Lys  | Leu | Asn  | Arg  | Ile  | Lys  | Asp | Leu  | Ser  | Asn  | Ile  | Asn | Leu  | Glu  | Ile  | Ser  |  |  |  |  |
|      |     | 995  |      |      |      |     | 1000 |      |      |      |     | 1005 |      |      |      |  |  |  |  |
| Asn  | Asp | Thr  | Gly  | Leu  | Lys  | Leu | Gln  | Ser  | Ser  | Met  | Asn | Gly  | Val  | Glu  | Trp  |  |  |  |  |
|      |     | 1010 |      |      |      |     | 1015 |      |      |      |     | 1020 |      |      |      |  |  |  |  |
| Thr  | Glu | Ile  | Thr  | Asp  | Lys  | Asn | Thr  | Leu  | Glu  | Asp  | Gly | Arg  | Tyr  | Val  | Arg  |  |  |  |  |
| 1025 |     |      |      |      | 1030 |     |      |      |      | 1035 |     |      |      |      | 1040 |  |  |  |  |
| Leu  | Ile | Asn  | Thr  | Ser  | Asn  | Glu | Ala  | Val  | Asn  | Phe  | Asn | Leu  | Thr  | Lys  | Phe  |  |  |  |  |
|      |     |      |      | 1045 |      |     |      |      | 1050 |      |     |      |      | 1055 |      |  |  |  |  |
| Glu  | Val | Asn  | Ser  | Asn  | Glu  | Val | Tyr  | Glu  | Pro  | Ser  | Leu | Val  | Asp  | Ala  | Tyr  |  |  |  |  |
|      |     |      |      | 1060 |      |     |      | 1065 |      |      |     |      | 1070 |      |      |  |  |  |  |
| Val  | Gly | Asp  | Asp  | Gly  | Ala  | Lys | Lys  | Ala  | Val  | Asp  | Gly | Asp  | Leu  | Lys  | Thr  |  |  |  |  |
|      |     | 1075 |      |      |      |     | 1080 |      |      |      |     | 1085 |      |      |      |  |  |  |  |
| Arg  | Val | Lys  | Phe  | Leu  | Gly  | Ala | Pro  | Ser  | Thr  | Gly  | Asp | Thr  | Ile  | Val  | Tyr  |  |  |  |  |
|      |     |      |      | 1090 |      |     | 1095 |      |      |      |     | 1100 |      |      |      |  |  |  |  |
| Asp  | Leu | Gly  | Gln  | Glu  | Ile  | Leu | Val  | Asp  | Asn  | Leu  | Lys | Tyr  | Val  | Val  | Leu  |  |  |  |  |
| 1105 |     |      |      |      | 1110 |     |      |      |      | 1115 |     |      |      |      | 1120 |  |  |  |  |
| Asp  | Thr | Glu  | Val  | Asp  | His  | Val | Arg  | Asp  | Gly  | Lys  | Ile | Gln  | Leu  | Ser  | Leu  |  |  |  |  |
|      |     |      |      | 1125 |      |     |      |      | 1130 |      |     |      |      | 1135 |      |  |  |  |  |
| Asp  | Gly | Glu  | Thr  | Trp  | Thr  | Asp | Ala  | Ile  | Thr  | Ile  | Gly | Asp  | Gly  | Val  | Glu  |  |  |  |  |
|      |     |      | 1140 |      |      |     |      |      | 1145 |      |     |      | 1150 |      |      |  |  |  |  |
| Asn  | Gly | Val  | Asp  | Asp  | Met  | Phe | Ser  | Thr  | Pro  | Leu  | Lys | Asn  | Gly  | Tyr  | Lys  |  |  |  |  |



|   |      |      |      |      |      |
|---|------|------|------|------|------|
|   | 1155 |      | 1160 |      | 1165 |
| His Gly Asn Gln Ser Gly Gly Ile Val Pro Ile Asp Ser Ala Tyr Val |      |      |      |      |      |
| 1170  |      | 1175 |      | 1180 |      |
| Glu Gly Asp Asn Leu Asn Gln Lys Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Phe |      |      |      |      |      |
| 1185  |      | 1190 |      | 1195 | 1200 |
| Thr Ala Pro Tyr Arg His Arg Trp Thr Val Ile Asn Glu Leu Met Ile |      |      |      |      |      |
|   | 1205 |      |      | 1210 | 1215 |
| Asn Asn Gly Glu Tyr Ile Ser Thr Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ile Ser |      |      |      |      |      |
|   | 1220 |      |      | 1225 | 1230 |
| Asn Pro Ile Glu Glu Arg Gly Phe Ala Pro Ser Asn Leu Arg Asp Gly |      |      |      |      |      |
|   | 1235 |      |      | 1240 | 1245 |
| Asn Leu Thr Thr Ser Tyr Lys Pro Asn Thr Asn Asn Gly Glu Ile Ser |      |      |      |      |      |
|   | 1250 |      |      | 1255 | 1260 |
| Glu Gly Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Ser Glu Lys Thr Asp Val Arg Lys |      |      |      |      |      |
| 1265  |      | 1270 |      | 1275 | 1280 |
| Val Thr Ile Val Gln Ser Gly Ser Ser Ile Ser Asn Ala Lys Val Met |      |      |      |      |      |
|   | 1285 |      |      | 1290 | 1295 |
| Ala Arg Val Gly Asp Gly Ser Glu Asn Val Thr Asp Gln Trp Val Gln |      |      |      |      |      |
|   | 1300 |      |      | 1305 | 1310 |
| Leu Gly Thr Leu Ser Asn Ser Leu Asn Glu Phe Ile Asn Arg Asp Tyr |      |      |      |      |      |
|   | 1315 |      |      | 1320 | 1325 |
| Asn Asn Ile Tyr Glu Ile Lys Ile Glu Trp Thr Asp Val Ala Pro Asn |      |      |      |      |      |
|   | 1330 |      |      | 1335 | 1340 |
| Ile Tyr Glu Ile Ile Thr Leu Asn Gln Glu Phe Glu Phe Pro Val Asn |      |      |      |      |      |
| 1345  |      | 1350 |      | 1355 | 1360 |
| Asp Ser Leu Lys Ala Lys Tyr Asp Glu Leu Ile Asn Leu Ser Gly Asp |      |      |      |      |      |
|   | 1365 |      |      | 1370 | 1375 |
| Glu Tyr Thr Leu Ser Ser Phe Glu Thr Leu Lys Glu Ala Leu Asn Glu |      |      |      |      |      |
|   | 1380 |      |      | 1385 | 1390 |
| Ala Lys Ser Ile Leu Asp Asp Ser Asn Ser Ser Gln Lys Lys Ile Asp |      |      |      |      |      |
|   | 1395 |      |      | 1400 | 1405 |
| Lys Ala Leu Glu Lys Leu Asn Lys Ala Glu Glu Arg Leu Asp Leu Arg |      |      |      |      |      |
|   | 1410 |      |      | 1415 | 1420 |
| Ala Thr Asp Phe Glu Asp Phe Asn Lys Val Leu Thr Leu Gly Asn Ser |      |      |      |      |      |
| 1425  |      | 1430 |      | 1435 | 1440 |
| Leu Val Glu Glu Glu Tyr Thr Ala Glu Ser Trp Ala Leu Phe Ser Glu |      |      |      |      |      |
|   | 1445 |      |      | 1450 | 1455 |
| Val Leu Glu Ala Ala Asn Glu Ala Asn Lys Asn Lys Ala Asp Tyr Thr |      |      |      |      |      |
|   | 1460 |      |      | 1465 | 1470 |
| Gln Asp Gln Ile Asn Gln Ile Val Ile Asp Leu Asp Ala Ser Ile Lys |      |      |      |      |      |
|   | 1475 |      |      | 1480 | 1485 |
| Ala Leu Val Lys Glu Thr Pro Glu Val Asp Lys Thr Asn Leu Gly Glu |      |      |      |      |      |
|   | 1490 |      |      | 1495 | 1500 |
| Leu Ile Asn Gln Gly Lys Ser Leu Leu Asp Glu Ser Val Glu Gly Phe |      |      |      |      |      |
| 1505  |      | 1510 |      | 1515 | 1520 |
| Asn Val Gly Glu Tyr His Lys Gly Ala Lys Asp Gly Leu Thr Val Glu |      |      |      |      |      |
|   | 1525 |      |      | 1530 | 1535 |
| Ile Asn Lys Ala Glu Glu Val Phe Asn Lys Glu Asp Ala Thr Glu Glu |      |      |      |      |      |
|   | 1540 |      |      | 1545 | 1550 |
| Glu Ile Asn Leu Ala Lys Glu Ser Leu Glu Gly Ala Ile Ala Arg Phe |      |      |      |      |      |
|   | 1555 |      |      | 1560 | 1565 |
| Asn Ser Leu Leu Ile Glu Glu Ser Thr Gly Asp Phe Asn Gly Asn Gly |      |      |      |      |      |
|   | 1570 |      |      | 1575 | 1580 |
| Lys Ile Asp Ile Gly Asp Leu Ala Met Val Ser Lys Asn Ile Gly Ser |      |      |      |      |      |
| 1585  |      | 1590 |      | 1595 | 1600 |
| Thr Thr Asn Thr Ser Leu Asp Leu Asn Lys Asp Gly Ser Ile Asp Glu |      |      |      |      |      |
|   | 1605 |      |      | 1610 | 1615 |
| Tyr Glu Ile Ser Phe Ile Asn His Arg Ile Leu Asn                 |      |      |      |      |      |

1620

1625

<210> 36  
 <211> 435  
 <212> PRT

ES 2 531 630 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Hialuronidasa-1 [Precursor]

5

<400> 36

```

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

Cys Val Arg Arg Thr Ser His Pro Lys Ala Leu Leu Leu Leu Asn Pro
 370          375          380
Ala Ser Phe Ser Ile Gln Leu Thr Pro Gly Gly Gly Pro Leu Ser Leu
 385          390          395          400
Arg Gly Ala Leu Ser Leu Glu Asp Gln Ala Gln Met Ala Val Glu Phe
 405          410          415
Lys Cys Arg Cys Tyr Pro Gly Trp Gln Ala Pro Trp Cys Glu Arg Lys
 420          425          430
Ser Met Trp
 435

```

<210> 37  
 <211> 473  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Hialuronidasa-2 [Precursor]

10

<400> 37

```

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

```

      290              295              300
Leu Ser Glu Met Asp Leu Ile Ser Thr Ile Gly Glu Ser Ala Ala Leu
305              310              315              320
Gly Ala Ala Gly Val Ile Leu Trp Gly Asp Ala Gly Tyr Thr Thr Ser
              325              330              335
Thr Glu Thr Cys Gln Tyr Leu Lys Asp Tyr Leu Thr Arg Leu Leu Val
              340              345              350
Pro Tyr Val Val Asn Val Ser Trp Ala Thr Gln Tyr Cys Ser Arg Ala
              355              360              365
Gln Cys His Gly His Gly Arg Cys Val Arg Arg Asn Pro Ser Ala Ser
              370              375              380
Thr Phe Leu His Leu Ser Thr Asn Ser Phe Arg Leu Val Pro Gly His
385              390              395              400
Ala Pro Gly Glu Pro Gln Leu Arg Pro Val Gly Glu Leu Ser Trp Ala
              405              410              415
Asp Ile Asp His Leu Gln Thr His Phe Arg Cys Gln Cys Tyr Leu Gly
              420              425              430
Trp Ser Gly Glu Gln Cys Gln Trp Asp His Arg Gln Ala Ala Gly Gly
              435              440              445
Ala Ser Glu Ala Trp Ala Gly Ser His Leu Thr Ser Leu Leu Ala Leu
              450              455              460
Ala Ala Leu Ala Phe Thr Trp Thr Leu
465              470

```

<210> 38  
 <211> 417  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Hialuronidasa-3 [Precursor]

<400> 38

```

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

```

ES 2 531 630 T3

Pro His Gly Leu Trp Gly Phe Tyr His Tyr Pro Ala Cys Gly Asn Gly  
 195 200 205  
 Trp His Ser Met Ala Ser Asn Tyr Thr Gly Arg Cys His Ala Ala Thr  
 210 215 220  
 Leu Ala Arg Asn Thr Gln Leu His Trp Leu Trp Ala Ala Ser Ser Ala  
 225 230 235 240  
 Leu Phe Pro Ser Ile Tyr Leu Pro Pro Arg Leu Pro Pro Ala His His  
 245 250 255  
 Gln Ala Phe Val Arg His Arg Leu Glu Glu Ala Phe Arg Val Ala Leu  
 260 265 270  
 Val Gly His Arg His Pro Leu Pro Val Leu Ala Tyr Val Arg Leu Thr  
 275 280 285  
 His Arg Arg Ser Gly Arg Phe Leu Ser Gln Asp Asp Leu Val Gln Ser  
 290 295 300  
 Ile Gly Val Ser Ala Ala Leu Gly Ala Ala Gly Val Val Leu Trp Gly  
 305 310 315 320  
 Asp Leu Ser Leu Ser Ser Ser Glu Glu Glu Cys Trp His Leu His Asp  
 325 330 335  
 Tyr Leu Val Asp Thr Leu Gly Pro Tyr Val Ile Asn Val Thr Arg Ala  
 340 345 350  
 Ala Met Ala Cys Ser His Gln Arg Cys His Gly His Gly Arg Cys Ala  
 355 360 365  
 Arg Arg Asp Pro Gly Gln Met Glu Ala Phe Leu His Leu Trp Pro Asp  
 370 375 380  
 Gly Ser Leu Gly Asp Trp Lys Ser Phe Ser Cys His Cys Tyr Trp Gly  
 385 390 395 400  
 Trp Ala Gly Pro Thr Cys Gln Glu Pro Arg Pro Gly Pro Lys Glu Ala  
 405 410 415  
 Val

<210> 39  
 <211> 481  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Hialuronidasa-4

10 <400> 39

Met Lys Val Leu Ser Glu Gly Gln Leu Lys Leu Cys Val Val Gln Pro  
 1 5 10 15  
 Val His Leu Thr Ser Trp Leu Leu Ile Phe Phe Ile Leu Lys Ser Ile  
 20 25 30  
 Ser Cys Leu Lys Pro Ala Arg Leu Pro Ile Tyr Gln Arg Lys Pro Phe  
 35 40 45  
 Ile Ala Ala Trp Asn Ala Pro Thr Asp Gln Cys Leu Ile Lys Tyr Asn  
 50 55 60  
 Leu Arg Leu Asn Leu Lys Met Phe Pro Val Ile Gly Ser Pro Leu Ala  
 65 70 75 80  
 Lys Ala Arg Gly Gln Asn Val Thr Ile Phe Tyr Val Asn Arg Leu Gly  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Pro Trp Tyr Thr Ser Gln Gly Val Pro Ile Asn Gly Gly Leu  
 100 105 110  
 Pro Gln Asn Ile Ser Leu Gln Val His Leu Glu Lys Ala Asp Gln Asp  
 115 120 125  
 Ile Asn Tyr Tyr Ile Pro Ala Glu Asp Phe Ser Gly Leu Ala Val Ile

ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Asp | Trp | Glu | Tyr | Trp | Arg | Pro | Gln | Trp | Ala | Arg | Asn | Trp | Asn | Ser | Lys |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Asp | Val | Tyr | Arg | Gln | Lys | Ser | Arg | Lys | Leu | Ile | Ser | Asp | Met | Gly | Lys |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Asn | Val | Ser | Ala | Thr | Asp | Ile | Glu | Tyr | Leu | Ala | Lys | Val | Thr | Phe | Glu |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Glu | Ser | Ala | Lys | Ala | Phe | Met | Lys | Glu | Thr | Ile | Lys | Leu | Gly | Ile | Lys |
|     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Ser | Arg | Pro | Lys | Gly | Leu | Trp | Gly | Tyr | Tyr | Leu | Tyr | Pro | Asp | Cys | His |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |
| Asn | Tyr | Asn | Val | Tyr | Ala | Pro | Asn | Tyr | Ser | Gly | Ser | Cys | Pro | Glu | Asp |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Glu | Val | Leu | Arg | Asn | Asn | Glu | Leu | Ser | Trp | Leu | Trp | Asn | Ser | Ser | Ala |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ala | Leu | Tyr | Pro | Ser | Ile | Gly | Val | Trp | Lys | Ser | Leu | Gly | Asp | Ser | Glu |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Asn | Ile | Leu | Arg | Phe | Ser | Lys | Phe | Arg | Val | His | Glu | Ser | Met | Arg | Ile |
|     | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |
| Ser | Thr | Met | Thr | Ser | His | Asp | Tyr | Ala | Leu | Pro | Val | Phe | Val | Tyr | Thr |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |
| Arg | Leu | Gly | Tyr | Arg | Asp | Glu | Pro | Leu | Phe | Phe | Leu | Ser | Lys | Gln | Asp |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Leu | Val | Ser | Thr | Ile | Gly | Glu | Ser | Ala | Ala | Leu | Gly | Ala | Ala | Gly | Ile |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Val | Ile | Trp | Gly | Asp | Met | Asn | Leu | Thr | Ala | Ser | Lys | Ala | Asn | Cys | Thr |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Lys | Val | Lys | Gln | Phe | Val | Ser | Ser | Asp | Leu | Gly | Ser | Tyr | Ile | Ala | Asn |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Val | Thr | Arg | Ala | Ala | Glu | Val | Cys | Ser | Leu | His | Leu | Cys | Arg | Asn | Asn |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     | 380 |     |     |     |
| Gly | Arg | Cys | Ile | Arg | Lys | Met | Trp | Asn | Ala | Pro | Ser | Tyr | Leu | His | Leu |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Asn | Pro | Ala | Ser | Tyr | His | Ile | Glu | Ala | Ser | Glu | Asp | Gly | Glu | Phe | Thr |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Val | Lys | Gly | Lys | Ala | Ser | Asp | Thr | Asp | Leu | Ala | Val | Met | Ala | Asp | Thr |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Phe | Ser | Cys | His | Cys | Tyr | Gln | Gly | Tyr | Glu | Gly | Ala | Asp | Cys | Arg | Glu |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Ile | Lys | Thr | Ala | Asp | Gly | Cys | Ser | Gly | Val | Ser | Pro | Ser | Pro | Gly | Ser |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Leu | Met | Thr | Leu | Cys | Leu | Leu | Leu | Leu | Ala | Ser | Tyr | Arg | Ser | Ile | Gln |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Leu |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 40  
 <211> 467  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> sHuPH20 precursora 1-467

10

<400> 40

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys  
 450 455 460  
 Ile Asp Ala

5  
 <210> 41  
 <211> 477  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <220>

ES 2 531 630 T3

<223> sHuPH20 precursor 1-477

<400> 41

```

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
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
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
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340      345      350

```



ES 2 531 630 T3

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  
 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  
 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  
 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  
 465 470 475

<210> 42  
 <211> 478  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> sHuPH20 precursor 1-478

10

<400> 42

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

ES 2 531 630 T3

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 465 470 475

<210> 43  
 <211> 479  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> sHuPH20 precursor 1-479

10 <400> 43

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 |
|     |     |     | 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 |     |     |     |     |
| 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 |
| 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 |     |     |     |
| 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 |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     |

<210> 44  
 <211> 480  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> sHuPH20 precursor 1-480

10

<400> 44

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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  |     |     |

ES 2 531 630 T3

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  
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  
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  
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  
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  
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  
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

<210> 45  
<211> 481  
5 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
10 <223> sHuPH20 precursor 1-481

<400> 45

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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

ES 2 531 630 T3

<210> 46  
 <211> 483  
 <212> PRT  
 5 <213> *Homo sapiens*  
  
 <220>  
 <223> sHuPH20 precursor 1-483  
  
 10 <400> 46

```

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
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
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                                310                                315
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
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
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
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

```

<210> 47  
 <211> 432  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> sHuPH20 madura 36-467

10 <400> 47

```

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
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
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
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
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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala  
 420 425 430

<210> 48  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> sHuPH20 madura 36-483

10

<400> 48

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  
 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  
 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  
 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 |     |     |  |  |  |  |
| 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 |     |  |  |  |  |
| 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 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| 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 |     |  |  |  |  |
| 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 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| 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 |     |  |  |  |  |
| 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 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| 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 |     |  |  |  |  |
| 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> 49  
 <211> 1446  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> ADN que codifica rHuPH20 "precursora" soluble

10

<400> 49

```

atgggagtgct taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaata aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ctttctgatt ccatgttgct tgactctgaa ttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaaag tgaattttgt 180
cttgaaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccca 240
    
```

ES 2 531 630 T3

ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300  
 tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360  
 caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatfff atagccagt agacaatttg 420  
 ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480  
 aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540  
 ctcacagagg ccaactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600  
 gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatcct 660  
 tttccggatt gttacaacca tcactataag aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720  
 gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgcctcttac 780  
 ccatccatff atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840  
 cgagtctggg aagccatcag agtttcctaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggtt 900  
 ttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagtttga aattcctttc tcaagatgaa 960  
 cttgtgtata catttggcga aactgttget ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020  
 accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080  
 atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgtt 1140  
 tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tottcacctc 1200  
 aaccagata attttgcctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260  
 ccgacacttg aagacctgga gcaatfttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320  
 ttgagttgta aggagaaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380  
 gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440  
 ttctac 1446

<210> 50  
 <211> 509  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> variante P48A de PH20

<400> 50

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

ES 2 531 630 T3

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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 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  
 Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu  
 500 505

<210> 51  
 <211> 509  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante L499W de PH20 precursora

10 <400> 51

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys  
 1 5 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  
 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 |
|     |     |     | 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |
| Ser | Ile | Trp | Phe | Leu | Ile | Ile | Ser | Ser | Val | Ala | Ser | Leu |     |     |     |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 52  
 <211> 6630  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Vector HZ24

10

<400> 52

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60  
 ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120  
 aatatgaccg coatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180  
 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taatggccc 240  
 gcctggctga ccgcccacg acccccggcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300  
 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtattttac ggtaaactgc 360  
 ccacttggca gtacatcaag tgtatcataat gccaaagtccg ccccttattg acgtcaatga 420  
 cggtaaatgg cccgcctggc attatgcccga gtacatgacc ttacgggact ttccctactg 480  
 gcagttacat tacgtattag tcacgtctat taccatgggtg atgdcggtttt ggcaatcac 540  
 caatgggagtt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600  
 caatgggagtt ttgttttggc accaaaatca accgggacttt ccaaaatgct gtaataaacc 660  
 cgccccgttg acgcaaatgg gcggtagggc tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc 720  
 tcgttttagtg aaccgtcaga tcactagaag ctttatttgc gtagttttac acagttaaat 780  
 tgctaacgca gtcagtgctt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagtgggtc 840  
 gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaagggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa 900  
 tactgggctt taagactctt gaagactctt gcgtttctga taggcacctt ttggtcttac 960  
 tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020  
 aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcatg ggagtgctaa aattcaagca 1080  
 catctttttc agaagctttg ttaaatacaag tggagtatcc cagatagttt tcaccttctt 1140  
 tctgattcca tgttgcttga ctctgaattt cagagcacct cctgttattc caaatgtgcc 1200  
 tttcctctgg gcctggaatg ccccaagtga attttgtctt ggaaaatttg atgagccact 1260  
 agatatgagc ctcttctctt tcataggaag cccccgaata aacgccaccg ggcaagggtg 1320  
 tacaatattt tatgttgata gacttggcta ctatccttac atagattcaa tcacaggtgt 1380  
 aactgtgaat ggaggaatcc cccagaagat ttctttacaa gaccatctgg acaaaagctaa 1440  
 gaaagacatt acattttata tgccagttag caatttggga atggctgtta ttgactggga 1500  
 agaatggaga cccacttggg caagaaactg gaaacctaaa gatgtttaca agaataggct 1560  
 tattgaattg gttcagcaac aaaatgtaca acttagtctc acagaggcca ctgagaaaagc 1620  
 aaaacaagaa tttgaaaagg cagggaaagga tttcctggta gagactataa aattgggaaa 1680  
 attacttcgg ccaaatcact tgtggggtta ttatctttt cgggattggt acaacctca 1740  
 ctataagaaa cccggttaca atggaagttg cttcaatgta gaaataaaaa gaaatgatga 1800  
 tctcagctgg ttgtggaatg aaagcactgc tctttaccca tccatttatt tgaacactca 1860  
 gcagttctct gtagctgcta cactctatgt gcgcaatcga gttcgggaag ccacagagt 1920  
 ttccaaaata cctgatgcaa aaagtccact tccggttttt gcatataccc gcatagtttt 1980  
 tactgatcaa gttttgaaat tcctttctca agatgaactt gtgtatacat ttggcgaaac 2040  
 gtttgcctcg ggtgcttctg gaattgtaat atggggaaacc ctcagataaa tgcgaagtat 2100  
 gaaatcttgc ttgctcctag acaattacat ggagactata ctgaatcctt acataatcaa 2160  
 cgtcacacta gcagccaaaa tgtgtagcca agtgctttgc caggagcaag gagtggtgat 2220  
 aaggaaaaac tggaaattcaa gtgactatct tcacctcaac ccagataatt ttgctattca 2280  
 acttgagaaa ggtggaaagt tcacagtacg tggaaaaccg acacttgaag acctggagca 2340  
 attttctgaa aaattttatt gcagctgtta tagcaccttg agttgtaagg agaaaagctga 2400  
 tgtaaaagac actgatgctg ttgatgtgtg tattgctgat ggtgtctgta tagatgcttt 2460  
 tctaaaacct cccatggaga cagaagaacc tcaaattttc tactgaggat ccatagctaa 2520  
 cgcccccttc cctccccccc cctaacggt actggccgaa gccgcttggg ataaggccgg 2580  
 tgtgcgtttg tctatatggt attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc 2640  
 cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa 2700  
 ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga 2760  
 caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaaacc cccacactgg cgacaggtgc 2820  
 ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgca aggcggcaca accccagttc 2880  
 cacgttgtga gttggatagt tgtggaagaa gtc aaatggc tctcctcaag cgtattcaac 2940

|            |             |            |             |             |             |      |
|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| aaggggctga | aggatgcccc  | gaaggtaccc | cattgtatgg  | gatctgatct  | ggggcctcgg  | 3000 |
| tgcacatgct | ttacatgtgt  | ttagtgcgag | ttaaaaaac   | gtctaggccc  | cccgaaccac  | 3060 |
| ggggacgtgg | ttttcctttg  | aaaaacacga | tgataagcct  | gccacaaccc  | acagcggccg  | 3120 |
| ctgccatcat | ggttcgacca  | ttgaactgca | tcgtcgccgt  | gtcccaaat   | atggggattg  | 3180 |
| gcaagaacgg | agacctacco  | tggcctccgc | tcaggaacga  | gttcaagtac  | ttccaaagaa  | 3240 |
| tgaccacaac | ctcttcagtg  | gaaggtaaac | agaatctggt  | gattatgggt  | aggaaaacct  | 3300 |
| ggttctccat | tcttgagaag  | aatcgacctt | taaaggacag  | aattaatata  | gttctcagta  | 3360 |
| gagaactcaa | agaaccacca  | cgaggagctc | atlttcttgc  | caaaagtttg  | gatgatgcct  | 3420 |
| taagacttat | tgaacaaccg  | gaattggcaa | gtaaagtaga  | catggtttgg  | atagtcggag  | 3480 |
| gcagttctgt | ttaccaggaa  | gccatgaatc | aaccaggcca  | cctcagactc  | tttgtgacaa  | 3540 |
| ggatcatgca | ggaatttgaa  | agtgcacagt | ttttcccgaa  | aattgatttg  | gggaaatata  | 3600 |
| aacttctccc | agaataccca  | ggcgtcctct | ctgaggtcca  | ggaggaaaa   | ggcatcaagt  | 3660 |
| ataagtttga | agtctacgag  | aagaaagact | aaacgcgtgg  | tacctctaga  | gtcgaccccg  | 3720 |
| gcggccgctt | cgagcagaca  | tgataagata | cattgatgag  | tttggacaaa  | ccacaactag  | 3780 |
| aatgcagtg  | aaaaaatgct  | ttatttgtga | aatltgtgat  | gctattgctt  | tatttghtaac | 3840 |
| cattataagc | tgcaataaac  | aagttaacaa | caacaattgc  | atcatttta   | tgtttcaggt  | 3900 |
| tcagggggag | atgtgggagg  | ttttttaaag | caagtaaaac  | ctctacaaat  | gtggtaaaat  | 3960 |
| cgataaggat | ccgggctggc  | gtaatagcga | agaggcccgc  | accgatcgcc  | cttcccaaca  | 4020 |
| gttgcgcagc | ctgaatggcg  | aatggacgcg | ccctgtagcg  | gcgcatlaag  | cgcggggggt  | 4080 |
| gtggtggtta | cgcgacgagt  | gaccgctaca | cttgccagcg  | ccctagcgcc  | cgctcctttc  | 4140 |
| gcttctctct | cttctctctc  | cgccaagtcc | ggcggtttc   | cccgtcaagg  | tctaaatcgg  | 4200 |
| gggtccctt  | tagggttccg  | athtagtgc  | ttccggcacc  | tcgaccccaa  | aaaacttgat  | 4260 |
| tagggtgatg | ggttcaegt   | tgggccatcg | ccctgataga  | cggttttcg   | ccctttgagc  | 4320 |
| ttggagtcca | cgttctttaa  | tagtggactc | ttgttccaaa  | ctggaacaac  | actcaacct   | 4380 |
| atctcggctc | attcttttga  | ttataaggg  | atlttgccga  | tttcggccta  | ttggttaaaa  | 4440 |
| aatgagctga | tttaacaaaa  | atltaacgcg | aatlttaaca  | aaatattaac  | gcttacaatt  | 4500 |
| tctgatgcg  | gtatlttctc  | cttacgcac  | tgtgcgggat  | ttcacaccgc  | atatggtgca  | 4560 |
| ctctcagtac | aatctgctct  | gatgcgcgat | agttaagcca  | gccccgacac  | ccgccaacac  | 4620 |
| ccgctgacgc | gcccctgacgg | gcttgtctgc | tcccggcacc  | cgcttacaga  | caagctgtga  | 4680 |
| ccgtctccgg | gagctgcatg  | tgtcagagg  | tttcaccgtc  | atcacccgaaa | cgcgcgagac  | 4740 |
| gaaaggccct | cgtgatacgc  | ctatltttat | aggltaatgt  | catgataata  | atggtttctt  | 4800 |
| agacgtcagg | tggaactttt  | cggggaaatg | tgcgcggaac  | ccctatltgt  | ttatltttct  | 4860 |
| aaatacattc | aaatatgtat  | ccgctcatga | gacaataacc  | ctgataaatg  | cttcaataat  | 4920 |
| attgaaaaag | gaagagtatg  | agtattcaac | atltccggtg  | cgcccttat   | ccctlttttg  | 4980 |
| cgcatlttg  | ccttctgtt   | tttgcctacc | cagaaaacgct | ggtgaaagta  | aaagatgctg  | 5040 |
| aagatcagtt | gggtgcacga  | gtgggttaca | tcgaactgga  | tctcaacagc  | ggtaagatcc  | 5100 |
| ttgagagttt | tcgccccgaa  | gaacgttttc | caatgatgag  | cactltttaa  | ggtctgctat  | 5160 |
| gtggcgcggt | attatcccgt  | attgacgccc | ggcaagagca  | actcggtcgc  | cgcatacact  | 5220 |
| attctcagaa | tgacttggtt  | gagtactcac | cagtcacaga  | aaagcatctt  | acggatggca  | 5280 |
| tgacagtaag | agaattatgc  | agtgtgccca | taaccatgag  | tgataaacat  | gcgccaact   | 5340 |
| tactctcgac | aacgatcgga  | ggaccgaagg | agctaaccgc  | ttttttgac   | aacatggggg  | 5400 |
| atcatgtaac | tcgccttgat  | cgttgggaac | cggaactgaa  | tgaagccata  | ccaacgagc   | 5460 |
| agcgtgacac | cacgatgcct  | gtagcaatgg | caacaacggt  | gcgcaaaacta | ttaactggcg  | 5520 |
| aactacttac | tctagcttcc  | cggaacaact | taatagactg  | gatggaggcg  | gataaagttg  | 5580 |
| caggaccact | tctgcgctcg  | gcccttccgg | ctggctgggt  | tattgctgat  | aaatctggag  | 5640 |
| ccggtgagcg | tggtctctgc  | ggtatcattg | cagcactggg  | gccagatggt  | aagccctccc  | 5700 |
| gtatcgtagt | tatctacacg  | acggggagtc | aggcaactat  | ggatgaacga  | aatagacaga  | 5760 |
| tcgctgagat | aggtgctca   | ctgattaagc | attggtaact  | gtcagaccaa  | glttactcat  | 5820 |
| ataactttaa | gattgattta  | aaacttcatt | tttaatttaa  | aaggatctag  | gtgaagatcc  | 5880 |
| tttttgataa | tctcatgacc  | aaaatccctt | aacgtgagtt  | ttcgttccac  | tgagcgtcag  | 5940 |
| accccgtaga | aaagatcaaa  | ggatcttctt | gagatccttt  | ttttctgcgc  | gtaatctgct  | 6000 |
| gcttgcaaac | aaaaaaacca  | ccgctaccag | cggtggtttg  | tttgccggat  | caagagctac  | 6060 |
| caactctttt | tccgaaggta  | actggcttca | gcagagcgca  | gataccaaat  | actgttcttc  | 6120 |
| tagtgtagcc | gtagttaggc  | caccacttca | agaactctgt  | agcaccgctt  | acatacctcg  | 6180 |
| ctctgctaat | cctgttacca  | gtggctgctg | ccagtgccga  | taagtctggt  | cttaccgggt  | 6240 |
| tgagctcaag | acgatagtta  | ccggataaag | cgcagcggtc  | gggctgaacg  | gggggtctgt  | 6300 |
| gcacacagcc | cagcttgag   | cgaacgacct | acaccgaact  | gagataccta  | cagcgtgagc  | 6360 |
| tatgagaaa  | cgccacgctt  | cccgaaggga | gaaaggcgga  | caggtatccg  | gtaagcggca  | 6420 |

|            |            |            |            |            |            |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| gggtcggaac | aggagagcgc | acgagggagc | ttccaggggg | aaacgcctgg | tatctttata | 6480 |
| gtcctgtcgg | gtttcgccac | ctctgacttg | agcgtcgatt | tttgtgatgc | tcgtcagggg | 6540 |
| ggcggagcct | atggaaaaac | gccagcaacg | cgcccttttt | acggttctcg | gccttttgc  | 6600 |
| ggccttttgc | tcacatgget | cgacagatct |            |            |            | 6630 |

ES 2 531 630 T3

<211> 186  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5 <220>  
 <223> dihidrofolato reductasa  
 <400> 53

```

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

10 <210> 54  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Marcador His

20 <400> 54

His His His His His His  
 1 5

25 <210> 55  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Marcador Flag

<400> 55

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 1 5

35 <210> 56  
 <211> 1449  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 531 630 T3

<220>  
<223> Secuencia de ARNm de Gen2

5 <400> 56

```

atgggagtg taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgcccacag tgaattttgt 180
cttgaaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccoga 240
ataaacgccca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacaatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaaagc taagaaagac attacatctt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc acaaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg cactcgagaa agcaaaaaca gaatttgaaa aggcaggaa ggatttcctg 600
ctagagacta taaaattggg aaaattactt oggcaaatc acttgtggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaataaa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggt 900
tttgcataaa ccogcatagt ttttactgat caagttttga aattccttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata ctttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctacagacca aatgtgtag tcaagtgttt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatcttct gaaaaatctt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctggtgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctactga
    
```

10 <210> 57  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

15 <220>  
<223> Péptido C terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-447  
<400> 57

```

Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
 1           5           10           15
Tyr
    
```

20 <210> 58  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

25 <220>  
<223> Péptido C terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-446  
<400> 58

```

Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
 1           5           10           15
    
```

35 <210> 59  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*



ES 2 531 630 T3

<220>

<223> Péptido C terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-445

<400> 59

5

Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile  
 1 5 10 15

<210> 60

<211> 14

10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Péptido C terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-444

15

<400> 60

Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln  
 1 5 10

20

<210> 61

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<220>

<223> Péptido C terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-443

<400> 61

Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro  
 1 5 10

30

<210> 62

<211> 12

<212> PRT

35

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Péptido C terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-442

40

<400> 62

Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu  
 1 5 10

45

<210> 63

<211> 520

<212> PRT

<213> *Ovis aries*

50

<400> 63

ES 2 531 630 T3

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Asn | Ser | Val | Gly | Glu | Ile | Val | Ala | Leu | Gly | Ala | Ser | Gly | Ile | Ile | Met |     |
|     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Trp | Gly | Ser | Leu | Asn | Leu | Ser | Leu | Thr | Met | Gln | Ser | Cys | Met | Asn | Leu |     |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |
| Gly | Asn | Tyr | Asn | Thr | Thr | Leu | Asn | Pro | Tyr | Ile | Ile | Asn | Val | Thr | Leu |     |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |     |
| Ala | Ala | Lys | Met | Cys | Ser | Gln | Val | Leu | Cys | His | Asp | Glu | Gly | Val | Cys |     |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |     |
| Thr | Arg | Lys | Gln | Trp | Asn | Ser | Ser | Asp | Tyr | Leu | His | Leu | Asn | Pro | Ile |     |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Met | Asn | Phe | Ala | Ile | Gln | Thr | Gly | Lys | Gly | Gly | Lys | Tyr | Thr | Val | Pro |     |
|     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |     |
| Gly | Lys | Val | Thr | Leu | Glu | Asp | Leu | Gln | Thr | Phe | Ser | Asp | Lys | Phe | Tyr |     |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |     |
| Cys | Ser | Cys | Tyr | Ala | Asn | Ile | Asn | Cys | Lys | Lys | Arg | Val | Asp | Ile | Lys |     |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |     |
| Asn | Val | His | Ser | Val | Asn | Val | Cys | Met | Ala | Glu | Asp | Ile | Cys | Ile | Glu |     |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |     |
| Gly | Pro | Val | Lys | Leu | Gln | Pro | Ser | Asp | His | Ser | Ser | Ser | Ser | Gln | Asn | Glu |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Ala | Ser | Thr | Thr | Thr | Val | Ser | Ser | Ile | Ser | Pro | Ser | Ser | Thr | Thr | Ala | Thr |
|     |     | 450 |     |     |     | 455 |     |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Thr | Val | Val | Ser | Pro | Cys | Thr | Pro | Glu | Lys | Gln | Ser | Pro | Glu | Cys | Leu |     |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |     |
| Lys | Val | Arg | Cys | Leu | Glu | Ala | Ile | Ala | Asn | Val | Thr | Gln | Thr | Gly | Cys |     |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |     |
| Gln | Gly | Val | Lys | Trp | Lys | Asn | Thr | Ser | Ser | Gln | Ser | Gln | Ser | Ser | Ile |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |     |
| Gln | Asn | Ile | Lys | Asn | Gln | Thr | Thr |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 64  
 <211> 474  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

5

<220>  
 <223> PH20

10

<400> 64

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Met | Phe | Arg | Arg | His | His | Ile | Ser | Phe | Arg | Ser | Phe | Ala | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Ser | Gly | Thr | Pro | Gln | Ala | Val | Phe | Thr | Phe | Leu | Leu | Leu | Pro | Cys |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Cys | Leu | Ala | Leu | Asp | Phe | Arg | Ala | Pro | Pro | Leu | Ile | Ser | Asn | Thr | Ser |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Phe | Leu | Trp | Ala | Trp | Asn | Ala | Pro | Val | Glu | Arg | Cys | Val | Asn | Arg | Arg |
|     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Phe | Gln | Leu | Pro | Pro | Asp | Leu | Arg | Leu | Phe | Ser | Val | Lys | Gly | Ser | Pro |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Gln | Lys | Ser | Ala | Thr | Gly | Gln | Phe | Ile | Thr | Leu | Phe | Tyr | Ala | Asp | Arg |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Leu | Gly | Tyr | Tyr | Pro | His | Ile | Asp | Glu | Lys | Thr | Gly | Lys | Thr | Val | Phe |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gly | Gly | Ile | Pro | Gln | Leu | Gly | Asn | Leu | Lys | Ser | His | Leu | Glu | Lys | Ala |

```

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

```

<210> 65  
 <211> 517  
 <212> PRT  
 <213> *Ovis aries*

<400> 65

```

Asp Phe Arg Ala Pro Pro Leu Ile Ser Asn Thr Ser Phe Leu Trp Ala
 1          5          10          15
Trp Asn Ala Pro Ala Glu Arg Cys Ile Lys Ile Phe Lys Leu Pro Pro
          20          25          30
Asp Leu Arg Leu Phe Ser Val Lys Gly Ser Pro Gln Lys Ser Ala Thr

```

5

10

ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gly | Gln | Phe | Ile | Thr | Leu | Phe | Tyr | Ala | Asp | Arg | Leu | Gly | Tyr | Tyr | Pro |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| His | Ile | Asp | Glu | Lys | Thr | Gly | Asn | Thr | Val | Tyr | Gly | Gly | Ile | Pro | Gln |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Leu | Gly | Asn | Leu | Lys | Asn | His | Leu | Glu | Lys | Ala | Lys | Lys | Asp | Ile | Ala |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Tyr | Tyr | Ile | Pro | Asn | Asp | Ser | Val | Gly | Leu | Ala | Val | Ile | Asp | Trp | Glu |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Asn | Trp | Arg | Pro | Thr | Trp | Ala | Arg | Asn | Trp | Lys | Pro | Lys | Asp | Val | Tyr |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |
| Arg | Asp | Glu | Ser | Val | Glu | Leu | Val | Leu | Gln | Lys | Asn | Pro | Gln | Leu | Ser |
|     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     |     | 140 |     |     |     |
| Phe | Pro | Glu | Ala | Ser | Lys | Ile | Ala | Lys | Val | Asp | Phe | Glu | Thr | Ala | Gly |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Lys | Ser | Phe | Met | Gln | Glu | Thr | Leu | Lys | Leu | Gly | Lys | Leu | Leu | Arg | Pro |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Asn | His | Leu | Trp | Gly | Tyr | Tyr | Leu | Phe | Pro | Asp | Cys | Tyr | Asn | His | Asn |
|     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Tyr | Asn | Gln | Pro | Thr | Tyr | Asn | Gly | Asn | Cys | Ser | Asp | Leu | Glu | Lys | Arg |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Arg | Asn | Asp | Asp | Leu | Asp | Trp | Leu | Trp | Lys | Glu | Ser | Thr | Ala | Leu | Phe |
|     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |
| Pro | Ser | Val | Tyr | Leu | Asn | Ile | Lys | Leu | Lys | Ser | Thr | Pro | Lys | Ala | Ala |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Phe | Tyr | Val | Arg | Asn | Arg | Val | Gln | Glu | Ala | Ile | Arg | Leu | Ser | Lys | Ile |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ala | Ser | Val | Glu | Ser | Pro | Leu | Pro | Val | Phe | Val | Tyr | His | Arg | Pro | Val |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Phe | Thr | Asp | Gly | Ser | Ser | Thr | Tyr | Leu | Ser | Gln | Gly | Asp | Leu | Val | Asn |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Ser | Val | Gly | Glu | Ile | Val | Ala | Leu | Gly | Ala | Ser | Gly | Ile | Ile | Met | Trp |
|     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Gly | Ser | Leu | Asn | Leu | Ser | Leu | Thr | Met | Gln | Ser | Cys | Met | Asn | Leu | Gly |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Asn | Tyr | Leu | Asn | Thr | Thr | Leu | Asn | Pro | Tyr | Ile | Ile | Asn | Val | Thr | Leu |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Ala | Ala | Lys | Met | Cys | Ser | Gln | Val | Leu | Cys | His | Asp | Glu | Gly | Val | Cys |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Thr | Arg | Lys | Gln | Trp | Asn | Ser | Ser | Asp | Tyr | Leu | His | Leu | Asn | Pro | Met |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Asn | Phe | Ala | Ile | Gln | Thr | Gly | Lys | Gly | Gly | Lys | Tyr | Thr | Val | Pro | Gly |
|     |     | 370 |     |     | 375 |     |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Lys | Val | Thr | Leu | Glu | Asp | Leu | Gln | Thr | Phe | Ser | Asp | Lys | Phe | Tyr | Cys |
| 385 |     |     |     | 390 |     |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Ser | Cys | Tyr | Ala | Asn | Ile | Asn | Cys | Lys | Lys | Arg | Val | Asp | Ile | Lys | Asn |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Val | His | Ser | Val | Asn | Val | Cys | Met | Ala | Glu | Asp | Ile | Cys | Ile | Glu | Gly |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Pro | Val | Lys | Leu | Gln | Pro | Ser | Asp | His | Ser | Ser | Ser | Gln | Asn | Glu | Ala |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     |     | 445 |     |     |
| Ser | Thr | Thr | Thr | Val | Ser | Ser | Ile | Ser | Pro | Ser | Thr | Thr | Ala | Thr | Thr |
|     |     | 450 |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Val | Ser | Pro | Cys | Thr | Pro | Glu | Lys | Gln | Ser | Pro | Glu | Cys | Leu | Lys | Val |
| 465 |     |     |     | 470 |     |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Arg | Cys | Leu | Glu | Ala | Ile | Ala | Asn | Val | Thr | Gln | Thr | Gly | Cys | Gln | Gly |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Val | Lys | Trp | Lys | Asn | Thr | Ser | Ser | Gln | Ser | Ser | Ile | Gln | Asn | Ile | Lys |

500  
Asn Gln Thr Thr Tyr  
515

505

510

<210> 66  
<211> 1620  
<212> ADN

ES 2 531 630 T3

<213> *Ovis aries*

<400> 66

```

ttttccgtgt tggttggctc tggacttcag agcaccocct ctcatttcaa acacttcttt 60
cctctgggcc tggaatgccc cagctgaacg ttgtattaaa atctttaaac tacctccaga 120
tctgagactc ttctctgtaa aaggaagccc ccaaaaaagt gctacgggac aatttattac 180
attatthtat gctgatagac ttggctacta tcctcatata gatgaaaaaa caggcaacac 240
tgtatatgga ggaattcccc agttgggaaa cttaaaaaat catttggaag aagccaaaaa 300
agacattgcc tattacatac caaatgacag cgtgggcttg gcggtcattg actgggaaaa 360
ctggaggcct acctgggcaa gaaactggaa acctaaagat gtttacaggg atgagtctgt 420
tgagttgggt ctgcaaaaaa atccacaact cagtttccca gaggcttcca agattgcaa 480
agtggatttt gagacagcag gaaagagttt catgcaagag actttaaaac tgggaaaatt 540
acttcggcca aatcacttat ggggttatta tcttttctct gattgttaca atcataatta 600
taaccagcct acttacaatg gaaattgctc tgatttagaa aaaaggagaa atgatgatct 660
cgactggttg tggaaaggaaa gcactgcctt ttcccttctt gtttatttga atatcaagtt 720
aaaatctact ccaaaagctg ccttctatgt tcgtaatcgt gtccaggaag ccattcgggt 780
gtctaaaata gcgagtgttg aaagtccact tcccgttttt gtatatcacc gtccagtttt 840
tactgatggg tcttcaacat acctttctca gggtgacctt gtgaattcgg ttggtgagat 900
cgttgctcta ggtgcctctg ggattataat gtggggcagt ctcaatctaa gcctaactat 960
gcaatcttgc atgaacctag gcaattactt gaacctaca ctgaatcctt acataatcaa 1020
cgtcacccta gcagccaaaa tgtgcagcca agtgctttgc cacgatgaag gagtgtgtac 1080
aaggaaacaa tggaaatcaa gcgactatct tcacctgaac ccaatgaatt ttgctattca 1140
aactgggaaa ggtggaaaat acacagtagc tgggaaagtc acacttgaag acctgcaaac 1200
gttttctgat aaatthtatt gcagttgtta tgccaacatc aactgtaaga agagagtga 1260
tataaaaaat gttcatagtg ttaatgtatg tatggcagaa gacatttcta tagagggcc 1320
tgtgaagtta caaccctagt atcattcctc tagccagaat gaggcactca ctaccacogt 1380
cagcagtatc tcaccctcta ctacagccac cacagtatct ccatgtactc ctgagaaaca 1440
gtcccctgag tgccctcaaa tcaggtgttt ggaagccatc gccaacgtca cccaaacggg 1500
gtgtcaaggt gttaaatgga agaacacttc cagtcagtca agtattcaaa atattaaaaa 1560
tcaacaacc tattaataa taaattcagt gcttataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620

```

5

<210> 67

<211> 793

<212> PRT

10 <213> *Arthrobacter* sp. (cepa FB24)

<220>

<223> hialuronano liasa

15 <400> 67

```

Met Thr Arg Glu Phe Ser Arg Arg Thr Ala Leu Lys Gly Ala Ala Leu
 1          5          10          15
Ser Gly Leu Leu Leu Ala Met Val His Gly Pro Ala His Ala Ala Ala
 20          25          30
Thr Ala Asn Ala Thr Leu Thr Pro Ala Asp Phe Ala Gly Leu Arg Gln
 35          40          45
Arg Trp Val Asp Gln Ile Thr Gly Arg Lys Val Leu Val Ala Gly Asp
 50          55          60
Asn Asp Phe Val Thr Ala Leu Ala Ala Leu Asp Lys Lys Ala Arg Thr

```

ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Ala | Ile | Asp | Leu | Leu | Glu | Arg | Ser | Ala | Gly | Arg | Leu | Thr | Val | Phe | Ser |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Asp | Leu | Ser | Leu | Ala | Lys | Asp | Thr | Asp | Leu | Val | Thr | Thr | His | Thr | Arg |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Leu | Ala | Thr | Met | Ala | Thr | Ala | Trp | Ala | Thr | Pro | Gly | Ser | Glu | His | Phe |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Ala | Asp | Ala | Gly | Leu | Leu | Ala | Ala | Ile | Arg | Ala | Gly | Leu | Ala | Asp | Ala |
|     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Asn | Ser | Leu | Cys | Tyr | Asn | Ala | Ser | Lys | Glu | Glu | Gln | Gly | Asn | Trp | Trp |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ser | Trp | Glu | Ile | Gly | Thr | Pro | Lys | Ala | Leu | Ala | Asp | Thr | Met | Val | Leu |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Leu | His | Ala | Glu | Leu | Thr | Ala | Ala | Glu | Arg | Ala | Ala | Tyr | Cys | Ala | Ala |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Ile | Asp | His | Phe | Val | Pro | Asp | Pro | Trp | Gln | Gln | Phe | Pro | Pro | Lys | Arg |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Gly | Lys | Ile | Thr | Ser | Val | Gly | Ala | Asn | Arg | Val | Asp | Leu | Cys | Gln | Ala |
|     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Val | Thr | Ile | Arg | Ser | Leu | Val | Asp | Glu | Asp | Ala | Glu | Lys | Leu | Thr | His |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Ala | Val | Ala | Gly | Leu | Ser | Glu | Val | Trp | Gln | Tyr | Val | Ser | Ala | Gly | Asn |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Gly | Phe | Phe | Thr | Asp | Gly | Ser | Phe | Ile | Gln | His | Ser | Thr | Thr | Pro | Tyr |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |
| Thr | Gly | Ser | Tyr | Gly | Val | Val | Leu | Leu | Thr | Gly | Leu | Ser | Lys | Leu | Phe |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Ala | Leu | Gly | Gly | Thr | Gly | Ala | Glu | Val | Ser | Asp | Pro | Ser | Arg | Asp |     |
|     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |
| Ile | Leu | Phe | Lys | Thr | Val | Glu | Gly | Ser | Phe | Ala | Pro | Phe | Met | Val | Ala |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Gly | Ala | Met | Ala | Asp | Ser | Val | Arg | Gly | Arg | Ser | Ile | Ser | Arg | Glu | Ser |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Asn | Thr | Gly | Phe | Asp | Leu | Gly | Ala | Ser | Thr | Ile | Glu | Ser | Ile | Leu | Leu |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |
| Leu | Ala | Arg | Ala | Val | Asp | Pro | Val | Thr | Ala | Arg | Arg | Trp | Arg | Ser | Leu |
|     |     | 355 |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Cys | Leu | Ala | Trp | Ile | Asn | Gln | Asn | Arg | Lys | Ala | Pro | Ile | Leu | Ala | Asp |
|     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Ala | Gly | Val | Gly | Arg | Thr | Ala | Leu | Val | Lys | Glu | Leu | Leu | Ala | Met | Gly |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Leu | Thr | Glu | Thr | Asp | Leu | Pro | Gly | Gly | His | Tyr | Leu | Phe | Pro | Ala | Met |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Asp | Arg | Thr | Met | His | His | Ser | Gln | Gly | Trp | Thr | Leu | Ser | Thr | Ala | Met |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     |     | 430 |     |
| Ala | Ser | Ser | Arg | Ile | Ala | Trp | Tyr | Glu | Cys | Gly | Asn | Gly | Glu | Asn | Asn |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Arg | Gly | Tyr | His | Thr | Gly | Ser | Gly | Met | Thr | Tyr | Val | Tyr | Asp | Gly | Asp |
|     |     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Leu | Gly | Gln | Tyr | Asp | Asp | Ala | Phe | Trp | Ala | Thr | Ala | Asn | His | Cys | Arg |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Leu | Pro | Gly | Ile | Thr | Val | Asp | Thr | Ser | Ser | Leu | Pro | Asp | Lys | Val | Glu |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     |     | 490 |     |     |     | 495 |     |
| Gly | Glu | Trp | Gly | Ala | Ala | Thr | Pro | Ala | Asn | Glu | Trp | Thr | Gly | Ser | Thr |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |
| Ala | Tyr | Gly | Asp | Val | Ala | Ala | Val | Gly | Gln | His | Leu | Ile | Gly | Pro | Gly |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Gly | Thr | Gly | Leu | Thr | Ala | Arg | Lys | Ser | Trp | Phe | Val | Ser | Lys | Asp | Val |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Ile | Val | Cys | Leu | Gly | Ala | Asp | Ile | Arg | Thr | Gly | Ser | Gly | Ser | Arg | Ile |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Glu | Thr | Val | Val | Asp | His | Arg | Asn | Leu | His | Ala | Gly | Phe | Asn | Ala | Met |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Gly | Thr | Ala | Ala | Gly | Thr | Val | Ala | Ala | Thr | Pro | Gly | His | Pro | Glu | Val |
|     |     |     | 580 |     |     |     | 585 |     |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Leu | Thr | Val | Asp | Arg | Trp | Val | His | Leu | Glu | Gly | Phe | Gly | Gly | Tyr | Val |
|     |     | 595 |     |     |     | 600 |     |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Val | Leu | Asp | Ala | Ala | Pro | Leu | Gln | Val | Leu | Arg | Glu | Gln | Arg | Glu | Gly |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Ser | Trp | Ser | Glu | Val | Asn | Val | Lys | Gly | Ser | Ala | Ala | Arg | Gln | Thr | Arg |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Asn | Tyr | Ala | Thr | Leu | Tyr | Phe | Asp | His | Gly | His | Glu | Pro | Glu | Ala | Ala |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Ser | Tyr | Ala | Tyr | Leu | Val | Ala | Pro | Gly | Ala | Ser | Ala | Ser | Met | Thr | Ser |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Ser | Leu | Ser | Gly | Gln | Ser | Phe | His | Thr | Val | Leu | Arg | Asn | Asp | Glu | Val |
|     |     | 675 |     |     |     | 680 |     |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Ala | Gln | Ala | Val | Lys | Phe | Lys | Lys | Glu | Lys | Thr | Thr | Ala | Ala | Thr | Phe |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| Trp | Arg | Pro | Gly | Thr | Val | Gly | Asp | Leu | Ala | Leu | Ser | Gly | Pro | Ala | Cys |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |
| Val | Val | Val | Lys | Glu | Val | Gly | Asp | Arg | Leu | Ser | Ile | Ala | Val | Ser | Asp |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |
| Pro | Thr | Gln | Asn | Ala | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Arg | Leu | Lys | Thr | Lys | Arg |
|     |     |     | 740 |     |     |     | 745 |     |     |     |     |     | 750 |     |     |
| Phe | Phe | Arg | Ile | Ile | Glu | Gly | Gln | Gly | Ala | Ser | Leu | Ser | His | Gly | Ala |
|     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |     |     |
| Asp | Gly | Phe | Thr | Val | Leu | Glu | Val | Asp | Ile | Ala | Asn | His | Ala | Gly | Arg |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |
| Thr | Lys | Gln | Ile | Glu | Leu | Ser | Ala | Glu |     |     |     |     |     |     |     |
| 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 68  
 <211> 557  
 5 <212> PRT  
 <213> *Bdellovibrio bacteriovorus*

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 68

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Thr | Lys | Phe | Phe | Phe | Leu | Leu | Thr | Leu | Ile | Ser | Ala | Thr | Ala | Phe |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ala | Gln | Ser | Glu | Pro | Asp | Trp | Thr | Ala | Gly | Val | Pro | Val | Pro | Pro | Gly |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly | Arg | Ser | Asn | Ile | Tyr | Ser | Trp | Asn | Asp | Phe | Asp | Phe | Gln | Ala | Thr |
|     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| Leu | Asn | Lys | Gly | Lys | Ile | His | Ala | Gln | Val | Tyr | Pro | Val | Thr | Val | Thr |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Gly | Met | Leu | Pro | Pro | Tyr | Glu | Pro | Val | Arg | Arg | Leu | Ile | Glu | Glu | Lys |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Asn | Ser | Asn | Pro | Leu | Arg | Lys | Trp | Ile | Gln | Ser | Leu | Met | Lys | Gly | Leu |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ser | Gly | Phe | Arg | Ser | Phe | Glu | Asp | Val | Leu | Lys | Asn | Leu | Gly | Leu | His |



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|     |     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Lys | Tyr | Pro | Leu | Glu | Asn | Glu | Arg | Gly | Val | Tyr | Ala | Val | Pro | Tyr | Pro |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
| Asn | Glu | Ile | Arg | Pro | Asp | Thr | Leu | Met | Gly | Phe | Gly | Leu | Ile | Glu | Arg |  |
|     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| Asn | Gly | Ala | Glu | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Cys | Ala | Ala | Cys | His | Ser | Ser |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Asn | Leu | Phe | Gly | Lys | Thr | Val | Leu | Gly | Met | Thr | Asn | Arg | Phe | Pro | Arg |  |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Ala | Asn | Glu | Phe | Ile | Lys | Ala | Lys | Lys | Val | Met | Pro | Leu | Met | Asp |     |  |
|     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |  |
| Pro | His | Ile | Phe | Gln | Ala | Tyr | Thr | Arg | Ala | Thr | Asp | Ala | Glu | Thr | Ala |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |  |
| Leu | Leu | Val | Glu | Ser | Lys | Glu | Arg | Leu | Lys | Ser | Val | Ala | Leu | Lys | Gln |  |
|     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Pro | Ile | Ala | Leu | Gly | Leu | Asp | Thr | Ser | Leu | Ala | Gln | Val | Ser | Leu | Ser |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Leu | Asn | Arg | Arg | Ala | Lys | Asp | Gly | Tyr | Ala | Asn | Tyr | Ser | Asp | Lys | Ala |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| Ala | Arg | Ser | Pro | Arg | Ala | Asp | Ala | Tyr | Leu | Asp | Asn | Lys | Pro | Ala | Asp |  |
|     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| Ser | Lys | Pro | Ala | Val | Trp | Trp | Asn | Val | Lys | Tyr | Lys | Asn | Arg | Trp | Leu |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |  |
| Ser | Asp | Gly | Ser | Val | Leu | Ser | Gly | Asn | Pro | Ile | Phe | Thr | Asn | Leu | Ile |  |
|     |     | 290 |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
| Trp | Asn | Glu | Ile | Gly | Arg | Gly | Ala | Asp | Leu | His | Glu | Leu | Glu | Gln | Trp |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |
| Leu | Ala | Asp | Asn | Asp | His | Ile | Ile | Lys | Glu | Leu | Thr | Thr | Ala | Val | Phe |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
| Ala | Ser | Glu | Ala | Pro | His | Ile | Thr | Asp | Phe | Tyr | Pro | Ala | Glu | Lys | Ile |  |
|     |     | 340 |     |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |
| Asp | Leu | Gly | Arg | Ala | Lys | Ala | Gly | Glu | Gln | Ile | Phe | Lys | Asn | Thr | Cys |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     | 365 |     |     |     |     |  |
| Ala | Lys | Cys | His | Gly | His | Tyr | Glu | Lys | Ala | Trp | Asn | Leu | Pro | Gln | Ala |  |
|     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |
| Leu | Val | Leu | Ser | Ala | Ala | Glu | Arg | Leu | Lys | Thr | Val | Glu | Val | Arg | Tyr |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |
| Lys | Glu | Lys | Thr | Pro | Val | Val | Asn | Val | Gly | Thr | Asp | Pro | Phe | Arg | Arg |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |
| Gln | Gly | Met | Lys | Ser | Leu | Glu | Gln | Leu | Asn | Asp | Leu | Glu | Ile | Ser | Lys |  |
|     |     | 420 |     |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |  |
| Lys | Asn | Gly | Ile | Val | Ile | Lys | Ala | Gln | Glu | Gly | Tyr | Val | Pro | Pro | Pro |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |
| Leu | Val | Gly | Ile | Trp | Ala | Arg | Trp | Pro | Tyr | Met | His | Asn | Asn | Ser | Ile |  |
|     |     | 450 |     |     | 455 |     |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |
| Pro | Asn | Leu | Cys | Val | Leu | Leu | Thr | Pro | Ala | Lys | Lys | Arg | Pro | Ser | Ile |  |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |  |
| Tyr | Tyr | Ser | Gly | Glu | Ala | Leu | Asn | Lys | Asp | Thr | Asp | Tyr | Asp | Phe | Ser |  |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     |     | 490 |     |     |     | 495 |     |  |
| Cys | Gly | Gly | Tyr | Pro | Ile | Gly | Asp | Lys | Thr | Pro | Lys | Ala | Trp | Lys | Thr |  |
|     |     | 500 |     |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |  |
| Arg | Glu | His | Leu | Tyr | Asp | Thr | Arg | Asn | Pro | Gly | Met | Gly | Asn | Met | Gly |  |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |  |
| His | Asp | Glu | Gly | Ile | Phe | Ile | Lys | Asp | Gly | Lys | Glu | Ile | Leu | Ser | Ala |  |
|     |     | 530 |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |  |
| Glu | Asp | Lys | Tyr | Asn | Leu | Ile | Gln | Phe | Leu | Gln | Thr | Leu |     |     |     |  |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     |     |  |

<210> 69  
 <211> 813  
 <212> PRT  
 <213> *Propionibacterium acnes*

<220>  
 <223> hialuronano liasa

5

10

<400> 69

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

His Leu Ser Glu Pro Ser Thr Leu Val Asp Ile Ser Leu Phe Asp Ala  
 385 390 395 400  
 Ala Ala Lys Ala Arg Pro Val Pro Glu Ser Ser Thr Pro Ser Tyr Phe  
 405 410 415  
 Ala Ser Met Asp Arg Leu Val His Arg Thr Ala Asp Trp Leu Ile Thr  
 420 425 430  
 Val Ser Asn Cys Ser Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Glu Tyr Gly Asn Gly  
 435 440 445  
 Glu Asn Glu Trp Ala Ser Arg Thr Ser Gln Gly Met Arg Tyr Leu Leu  
 450 455 460  
 Leu Pro Gly Asp Met Gly Gln Tyr Glu Asp Gly Tyr Trp Ala Thr Val  
 465 470 475 480  
 Asp Tyr Ser Ala Pro Thr Gly Thr Thr Val Asp Ser Thr Pro Leu Lys  
 485 490 495  
 Arg Ala Val Gly Ala Ser Trp Ala Ala Lys Thr Pro Thr Asn Glu Trp  
 500 505 510  
 Ser Gly Gly Leu Ala Ser Gly Ser Trp Ser Ala Ala Ala Ser His Ile  
 515 520 525  
 Thr Ser Gln Asp Ser Ala Leu Lys Ala Arg Arg Leu Trp Val Gly Leu  
 530 535 540  
 Lys Asp Ala Met Val Glu Leu Thr Thr Asp Val Thr Thr Asp Ala Ser  
 545 550 555 560  
 Arg Ala Ile Thr Val Val Glu His Arg Lys Val Ala Ser Ser Ser Thr  
 565 570 575  
 Lys Leu Leu Val Asp Gly Asn Arg Val Ser Ser Ala Thr Ser Phe Gln  
 580 585 590  
 Asn Pro Arg Trp Ala His Leu Asp Gly Val Gly Gly Tyr Val Phe Ala  
 595 600 605  
 Thr Asp Thr Asp Leu Ser Ala Asp Val Ala Thr Arg Lys Gly Thr Trp  
 610 615 620  
 Ile Asp Val Asn Pro Ser Arg Lys Val Lys Gly Ala Asp Glu Val Ile  
 625 630 635 640  
 Glu Arg Ala Tyr Ala Ser Leu His Val Thr His His Asp Arg Pro Val  
 645 650 655  
 Ala Trp Ala Leu Leu Pro Thr Ala Ser Arg Ser His Thr Met Ala Leu  
 660 665 670  
 Ala Thr Arg Pro Gly Val Glu Pro Phe Thr Val Leu Arg Asn Asp Ala  
 675 680 685  
 Thr Val Gln Ala Val Arg Ser Ala Gly Ala Leu Leu Thr Lys Asp Pro  
 690 695 700  
 Thr Val Val Thr Thr Leu Ala Phe Trp Lys Pro Ala Thr Cys Gly Gly  
 705 710 715 720  
 Val Ala Val Asn Arg Pro Ala Leu Val Gln Thr Arg Glu Ser Ala Asn  
 725 730 735  
 Gln Met Glu Val Val Ile Val Glu Pro Thr Gln Lys Arg Gly Ser Leu  
 740 745 750  
 Thr Val Thr Ile Glu Gly Ser Trp Lys Val Lys Thr Ala Asp Ser His  
 755 760 765  
 Val Asp Val Ser Cys Glu Asn Ala Ala Gly Thr Leu His Val Asp Thr  
 770 775 780  
 Ala Gly Leu Gly Gly Gln Ser Val Arg Val Thr Leu Ala Arg Gln Val  
 785 790 795 800  
 Thr Gln Thr Pro Ser Gly Gly Gly Arg His Asp Arg Ala  
 805 810

<210> 70  
 <211> 1072  
 5 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus agalactiae*

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 70

ES 2 531 630 T3

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     | 415 |     |
| Gln | Ile | Thr | Asn | Pro | His | Ser | Thr | Ile | Tyr | Lys | Asn | Glu | Lys | Ala | Ile |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Arg | Thr | Val | Lys | Glu | Ser | Leu | Ala | Trp | Leu | His | Gln | Asn | Phe | Tyr | Asn |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Val | Asn | Lys | Asp | Ile | Glu | Gly | Ser | Ala | Asn | Trp | Trp | Asp | Phe | Glu | Ile |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Gly | Val | Pro | Arg | Ser | Ile | Thr | Ala | Thr | Leu | Ala | Leu | Met | Asn | Asn | Tyr |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Phe | Thr | Asp | Ala | Glu | Ile | Lys | Thr | Tyr | Thr | Asp | Pro | Ile | Glu | His | Phe |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Val | Pro | Asp | Ala | Gly | Tyr | Phe | Arg | Lys | Thr | Leu | Asp | Asn | Pro | Phe | Lys |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Ala | Leu | Gly | Gly | Asn | Leu | Val | Asp | Met | Gly | Arg | Val | Lys | Ile | Ile | Glu |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Gly | Leu | Leu | Arg | Lys | Asp | Asn | Thr | Ile | Ile | Glu | Lys | Thr | Ser | His | Ser |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     |     | 540 |     |     |     |
| Leu | Lys | Asn | Leu | Phe | Thr | Thr | Ala | Thr | Lys | Ala | Glu | Gly | Phe | Tyr | Ala |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Asp | Gly | Ser | Tyr | Ile | Asp | His | Thr | Asn | Val | Ala | Tyr | Thr | Gly | Ala | Tyr |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Gly | Asn | Val | Leu | Ile | Asp | Gly | Leu | Thr | Gln | Leu | Leu | Pro | Ile | Ile | Gln |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Glu | Thr | Asp | Tyr | Lys | Ile | Ser | Asn | Gln | Glu | Leu | Asp | Met | Val | Tyr | Lys |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Trp | Ile | Asn | Gln | Ser | Phe | Leu | Pro | Leu | Ile | Val | Lys | Gly | Glu | Leu | Met |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     |     | 620 |     |     |     |
| Asp | Met | Ser | Arg | Gly | Arg | Ser | Ile | Ser | Arg | Glu | Ala | Ala | Ser | Ser | His |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Ala | Ala | Ala | Val | Glu | Val | Leu | Arg | Gly | Phe | Leu | Arg | Leu | Ala | Asn | Met |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Ser | Asn | Glu | Glu | Arg | Asn | Leu | Asp | Leu | Lys | Ser | Thr | Ile | Lys | Thr | Ile |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Ile | Thr | Ser | Asn | Lys | Phe | Tyr | Asn | Val | Phe | Asn | Asn | Leu | Lys | Ser | Tyr |
|     | 675 |     |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Ser | Asp | Ile | Ala | Asn | Met | Asn | Lys | Met | Leu | Asn | Asp | Ser | Thr | Val | Ala |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| Thr | Lys | Pro | Leu | Lys | Ser | Asn | Leu | Ser | Thr | Phe | Asn | Ser | Met | Asp | Arg |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |
| Leu | Ala | Tyr | Tyr | Asn | Ala | Glu | Lys | Asp | Phe | Gly | Phe | Ala | Leu | Ser | Leu |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |
| His | Ser | Lys | Arg | Thr | Leu | Asn | Tyr | Glu | Gly | Met | Asn | Asp | Glu | Asn | Thr |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |
| Arg | Gly | Trp | Tyr | Thr | Gly | Asp | Gly | Met | Phe | Tyr | Leu | Tyr | Asn | Ser | Asp |
|     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     |     | 765 |     |     |
| Gln | Ser | His | Tyr | Ser | Asn | His | Phe | Trp | Pro | Thr | Val | Asn | Pro | Tyr | Lys |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |
| Met | Ala | Gly | Thr | Thr | Glu | Lys | Asp | Ala | Lys | Arg | Glu | Asp | Thr | Thr | Lys |
| 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     | 795 |     |     |     |     | 800 |
| Glu | Phe | Met | Ser | Lys | His | Ser | Lys | Asp | Ala | Lys | Glu | Lys | Thr | Gly | Gln |
|     |     |     |     | 805 |     |     |     |     | 810 |     |     |     |     | 815 |     |
| Val | Thr | Gly | Thr | Ser | Asp | Phe | Val | Gly | Ser | Val | Lys | Leu | Asn | Asp | His |
|     |     |     | 820 |     |     |     |     | 825 |     |     |     |     | 830 |     |     |
| Phe | Ala | Leu | Ala | Ala | Met | Asp | Phe | Thr | Asn | Trp | Asp | Arg | Thr | Leu | Thr |
|     | 835 |     |     |     |     |     | 840 |     |     |     |     | 845 |     |     |     |
| Ala | Gln | Lys | Gly | Trp | Val | Ile | Leu | Asn | Asp | Lys | Ile | Val | Phe | Leu | Gly |
|     | 850 |     |     |     |     | 855 |     |     |     |     | 860 |     |     |     |     |
| Ser | Asn | Ile | Lys | Asn | Thr | Asn | Gly | Ile | Gly | Asn | Val | Ser | Thr | Thr | Ile |

ES 2 531 630 T3

|      |      |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| 865  |      |     |      |      | 870  |      |      |      |      | 875  |      |      |      | 880  |     |
| Asp  | Gln  | Arg | Lys  | Asp  | Asp  | Ser  | Lys  | Thr  | Pro  | Tyr  | Thr  | Thr  | Tyr  | Val  | Asn |
|      |      |     |      | 885  |      |      |      |      | 890  |      |      |      |      | 895  |     |
| Gly  | Lys  | Thr | Ile  | Asp  | Leu  | Lys  | Gln  | Ala  | Ser  | Ser  | Gln  | Gln  | Phe  | Thr  | Asp |
|      |      |     | 900  |      |      |      |      | 905  |      |      |      |      | 910  |      |     |
| Thr  | Lys  | Ser | Val  | Phe  | Leu  | Glu  | Ser  | Lys  | Glu  | Pro  | Gly  | Arg  | Asn  | Ile  | Gly |
|      |      | 915 |      |      |      |      | 920  |      |      |      |      | 925  |      |      |     |
| Tyr  | Ile  | Phe | Phe  | Lys  | Asn  | Ser  | Thr  | Ile  | Asp  | Ile  | Glu  | Arg  | Lys  | Glu  | Gln |
|      | 930  |     |      |      |      | 935  |      |      |      |      | 940  |      |      |      |     |
| Thr  | Gly  | Thr | Trp  | Asn  | Ser  | Ile  | Asn  | Arg  | Thr  | Ser  | Lys  | Asn  | Thr  | Ser  | Ile |
| 945  |      |     |      | 950  |      |      |      |      |      | 955  |      |      |      | 960  |     |
| Val  | Ser  | Asn | Pro  | Phe  | Ile  | Thr  | Ile  | Ser  | Gln  | Lys  | His  | Asp  | Asn  | Lys  | Gly |
|      |      |     |      | 965  |      |      |      |      | 970  |      |      |      |      | 975  |     |
| Asp  | Ser  | Tyr | Gly  | Tyr  | Met  | Met  | Val  | Pro  | Asn  | Ile  | Asp  | Arg  | Thr  | Ser  | Phe |
|      |      |     | 980  |      |      |      |      | 985  |      |      |      | 990  |      |      |     |
| Asp  | Lys  | Leu | Ala  | Asn  | Ser  | Lys  | Glu  | Val  | Glu  | Leu  | Leu  | Glu  | Asn  | Ser  | Ser |
|      |      | 995 |      |      |      |      | 1000 |      |      |      |      | 1005 |      |      |     |
| Lys  | Gln  | Gln | Val  | Ile  | Tyr  | Asp  | Lys  | Asn  | Ser  | Gln  | Thr  | Trp  | Ala  | Val  | Ile |
|      | 1010 |     |      |      |      | 1015 |      |      |      |      | 1020 |      |      |      |     |
| Lys  | His  | Asp | Asn  | Gln  | Glu  | Ser  | Leu  | Ile  | Asn  | Asn  | Gln  | Phe  | Lys  | Met  | Asn |
| 1025 |      |     |      |      | 1030 |      |      |      |      | 1035 |      |      |      | 1040 |     |
| Lys  | Ala  | Gly | Leu  | Tyr  | Leu  | Val  | Gln  | Lys  | Val  | Gly  | Asn  | Asp  | Tyr  | Gln  | Asn |
|      |      |     |      | 1045 |      |      |      |      | 1050 |      |      |      |      | 1055 |     |
| Val  | Tyr  | Tyr | Gln  | Pro  | Gln  | Thr  | Met  | Thr  | Lys  | Thr  | Asp  | Gln  | Leu  | Ala  | Ile |
|      |      |     | 1060 |      |      |      |      | 1065 |      |      |      |      | 1070 |      |     |

<210> 71  
 <211> 1072  
 5 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus agalactiae* 18RS21

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 71

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

Lys Phe Asp Ile Glu Thr Ser Asn Lys Ala Gly Gln Ala Phe Leu Arg  
 180 185 190  
 Ile Met Glu Lys Lys Asp Asn Asn Thr Arg Leu Trp Leu Ser Glu Met  
 195 200 205  
 Thr Ser Gly Thr Thr Asn Lys His Thr Leu Thr Lys Ile Tyr Asn Pro  
 210 215 220  
 Lys Leu Asn Val Ser Glu Val Thr Leu Glu Leu Tyr Tyr Glu Lys Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Gly Ser Ala Thr Phe Asp Asn Ile Ser Met Lys Ala Lys Gly Pro  
 245 250 255  
 Lys Asp Ser Glu His Pro Gln Pro Val Thr Thr Gln Ile Glu Lys Ser  
 260 265 270  
 Val Asn Thr Ala Leu Asn Lys Asn Tyr Val Phe Asn Lys Ala Asp Tyr  
 275 280 285  
 Gln Tyr Thr Leu Thr Asn Pro Ser Leu Gly Lys Ile Val Gly Gly Ile  
 290 295 300  
 Leu Tyr Pro Asn Ala Thr Gly Ser Thr Thr Val Lys Ile Ser Asp Lys  
 305 310 315 320  
 Ser Gly Lys Ile Ile Lys Glu Val Pro Leu Ser Val Thr Ala Ser Thr  
 325 330 335  
 Glu Asp Lys Phe Thr Lys Leu Leu Asp Lys Trp Asn Asp Val Thr Ile  
 340 345 350  
 Gly Asn His Val Tyr Asp Thr Asn Asp Ser Asn Met Gln Lys Ile Asn  
 355 360 365  
 Gln Lys Leu Asp Glu Thr Asn Ala Lys Asn Ile Lys Thr Ile Lys Leu  
 370 375 380  
 Asp Ser Asn His Thr Phe Leu Trp Lys Asp Leu Asp Asn Leu Asn Asn  
 385 390 395 400  
 Ser Ala Gln Leu Thr Ala Thr Tyr Arg Arg Leu Glu Asp Leu Ala Lys  
 405 410 415  
 Gln Ile Thr Asn Pro His Ser Thr Ile Tyr Lys Asn Glu Lys Ala Ile  
 420 425 430  
 Arg Thr Val Lys Glu Ser Leu Ala Trp Leu His Gln Asn Phe Tyr Asn  
 435 440 445  
 Val Asn Lys Asp Ile Glu Gly Ser Ala Asn Trp Trp Asp Phe Glu Ile  
 450 455 460  
 Gly Val Pro Arg Ser Ile Thr Ala Thr Leu Ala Leu Met Asn Asn Tyr  
 465 470 475 480  
 Phe Thr Asp Ala Glu Ile Lys Thr Tyr Thr Asp Pro Ile Glu His Phe  
 485 490 495  
 Val Pro Asp Ala Gly Tyr Phe Arg Lys Thr Leu Asp Asn Pro Phe Lys  
 500 505 510  
 Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val Asp Met Gly Arg Val Lys Ile Ile Glu  
 515 520 525  
 Gly Leu Leu Arg Lys Asp Asn Thr Ile Ile Glu Lys Thr Ser His Ser  
 530 535 540  
 Leu Lys Asn Leu Phe Thr Thr Ala Thr Lys Ala Glu Gly Phe Tyr Ala  
 545 550 555 560  
 Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Thr Asn Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr  
 565 570 575  
 Gly Asn Val Leu Ile Asp Gly Leu Thr Gln Leu Leu Pro Ile Ile Gln  
 580 585 590  
 Glu Thr Asp Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Glu Leu Asp Met Val Tyr Lys  
 595 600 605  
 Trp Ile Asn Gln Ser Phe Leu Pro Leu Ile Val Lys Gly Glu Leu Met  
 610 615 620  
 Asp Met Ser Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Glu Ala Ala Ser Ser His  
 625 630 635 640

ES 2 531 630 T3

Ala Ala Ala Val Glu Val Leu Arg Gly Phe Leu Arg Leu Ala Asn Met  
645 650 655  
Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Asp Leu Ile Ser Thr Ile Lys Thr Ile  
660 665 670  
Ile Thr Ser Asn Lys Phe Tyr Asn Val Phe Asn Asn Leu Lys Ser Tyr  
675 680 685  
Ser Asp Ile Ala Asn Met Asn Lys Met Leu Asn Asp Ser Thr Val Ala  
690 695 700  
Thr Lys Pro Leu Lys Ser Asn Leu Ser Thr Phe Asn Ser Met Asp Arg  
705 710 715 720  
Leu Ala Tyr Tyr Asn Ala Glu Lys Asp Phe Gly Phe Ala Leu Ser Leu  
725 730 735  
His Ser Lys Arg Thr Leu Asn Tyr Glu Gly Met Asn Asp Glu Asn Thr  
740 745 750  
Arg Gly Trp Tyr Thr Gly Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Ser Asp  
755 760 765  
Gln Ser His Tyr Ser Asn His Phe Trp Pro Thr Val Asn Pro Tyr Lys  
770 775 780  
Met Ala Gly Thr Thr Glu Lys Asp Ala Lys Arg Glu Asp Thr Thr Lys  
785 790 795 800  
Glu Phe Met Ser Lys His Ser Lys Asp Ala Lys Glu Lys Thr Gly Gln  
805 810 815  
Val Thr Gly Thr Ser Asp Phe Val Gly Ser Val Lys Leu Asn Asp His  
820 825 830  
Phe Ala Leu Ala Ala Met Asp Phe Thr Asn Trp Asp Arg Thr Leu Thr  
835 840 845  
Ala Gln Lys Gly Trp Val Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly  
850 855 860  
Ser Asn Ile Lys Asn Thr Asn Gly Ile Gly Asn Val Ser Thr Thr Ile  
865 870 875 880  
Asp Gln Arg Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Tyr Thr Thr Tyr Val Asn  
885 890 895  
Gly Lys Thr Ile Asp Leu Lys Gln Ala Ser Ser Gln Gln Phe Thr Asp  
900 905 910  
Thr Lys Ser Val Phe Leu Glu Ser Lys Glu Pro Gly Arg Asn Ile Gly  
915 920 925  
Tyr Ile Phe Phe Lys Asn Ser Thr Ile Asp Ile Glu Arg Lys Glu Gln  
930 935 940  
Thr Gly Thr Trp Asn Ser Ile Asn Arg Thr Ser Lys Asn Thr Ser Ile  
945 950 955 960  
Val Ser Asn Pro Phe Ile Thr Ile Ser Gln Lys His Asp Asn Lys Gly  
965 970 975  
Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Met Val Pro Asn Ile Asp Arg Thr Ser Phe  
980 985 990  
Asp Lys Leu Ala Asn Ser Lys Glu Val Glu Leu Leu Glu Asn Ser Ser  
995 1000 1005  
Lys Gln Gln Val Ile Tyr Asp Lys Asn Ser Gln Thr Trp Ala Val Ile  
1010 1015 1020  
Lys His Asp Asn Gln Glu Ser Leu Ile Asn Asn Gln Phe Lys Met Asn  
1025 1030 1035 1040  
Lys Ala Gly Leu Tyr Leu Val Gln Lys Val Gly Asn Asp Tyr Gln Asn  
1045 1050 1055  
Val Tyr Tyr Gln Pro Gln Thr Met Thr Lys Thr Asp Gln Leu Ala Ile  
1060 1065 1070

<210> 72  
<211> 1081  
5 <212> PRT  
<213> *Streptococcus agalactiae* serotipo Ia

<220>  
<223> hialuronano liasa

10 <400> 72



ES 2 531 630 T3

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

ES 2 531 630 T3

Leu Lys Gly Leu Asn Asn Ser Ala Gln Leu Thr Ala Thr Tyr Arg Arg  
 405 410 415  
 Leu Glu Asp Leu Ala Lys Gln Ile Thr Asn Pro His Ser Thr Ile Tyr  
 420 425 430  
 Lys Asn Glu Lys Ala Ile Arg Thr Val Lys Glu Ser Leu Ala Trp Leu  
 435 440 445  
 His Gln Asn Phe Tyr Asn Val Asn Lys Asp Ile Glu Gly Ser Ala Asn  
 450 455 460  
 Trp Trp Asp Phe Glu Ile Gly Val Pro Arg Ser Ile Thr Ala Thr Leu  
 465 470 475 480  
 Ala Leu Met Asn Asn Tyr Phe Thr Asp Ala Glu Ile Lys Thr Tyr Thr  
 485 490 495  
 Asp Pro Ile Glu His Phe Val Pro Asp Ala Gly Tyr Phe Arg Lys Thr  
 500 505 510  
 Leu Val Asn Pro Phe Lys Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val Asp Met Gly  
 515 520 525  
 Arg Val Lys Ile Ile Glu Gly Leu Leu Arg Lys Asp Asn Thr Ile Ile  
 530 535 540  
 Lys Lys Thr Ser His Ser Leu Lys Asn Leu Phe Thr Thr Ala Thr Lys  
 545 550 555 560  
 Ala Glu Gly Phe Tyr Ala Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Thr Asn Val  
 565 570 575  
 Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val Leu Ile Asp Gly Leu Thr Gln  
 580 585 590  
 Leu Leu Pro Ile Ile Gln Glu Thr Asp Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Glu  
 595 600 605  
 Leu Asp Met Val Tyr Lys Trp Ile Asn Gln Ser Phe Leu Pro Leu Ile  
 610 615 620  
 Val Lys Gly Glu Leu Met Asp Met Ser Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg  
 625 630 635 640  
 Glu Ala Ala Ser Ser His Ala Ala Ala Val Glu Val Leu Arg Gly Phe  
 645 650 655  
 Leu Arg Leu Ala Asn Met Ser Asn Glu Arg Asn Leu Asp Leu Lys  
 660 665 670  
 Ser Thr Ile Lys Thr Ile Ile Thr Ser Asn Lys Phe Tyr Asn Val Phe  
 675 680 685  
 Asn Asn Leu Lys Ser Tyr Ser Asp Ile Ala Asn Met Asn Lys Leu Leu  
 690 695 700  
 Asn Asp Ser Thr Val Ala Thr Lys Pro Leu Lys Ser Asn Leu Ser Thr  
 705 710 715 720  
 Phe Asn Ser Met Asp Arg Leu Ala Tyr Tyr Asn Ala Glu Lys Asp Phe  
 725 730 735  
 Gly Phe Ala Leu Ser Leu His Ser Lys Arg Thr Leu Asn Tyr Glu Gly  
 740 745 750  
 Met Asn Asp Glu Asn Thr Arg Gly Trp Tyr Thr Gly Asp Gly Met Phe  
 755 760 765  
 Tyr Leu Tyr Asn Ser Asp Gln Ser His Tyr Ser Asn His Phe Trp Pro  
 770 775 780  
 Thr Val Asn Pro Tyr Lys Met Ala Gly Thr Thr Glu Lys Asp Thr Gly  
 785 790 795 800  
 Arg Glu Asp Thr Ile Lys Lys Leu Met Asn Arg Tyr Asp Lys Thr Asn  
 805 810 815  
 Lys Asn Ser Lys Val Met Thr Gly Gln Val Thr Gly Thr Ser Asp Phe  
 820 825 830  
 Val Gly Ser Val Lys Leu Asn Asp His Phe Ala Leu Ala Ala Met Asp  
 835 840 845  
 Phe Thr Asn Trp Asp Arg Thr Leu Thr Ala Gln Lys Gly Trp Val Ile  
 850 855 860

Leu Asn Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly Ser Asn Ile Lys Asn Thr Asn  
 865 870 875 880  
 Gly Val Gly Asn Val Ser Thr Thr Ile Asp Gln Arg Lys Asp Asp Ser  
 885 890 895  
 Lys Thr Pro Tyr Thr Thr Tyr Val Asn Gly Lys Thr Val Asp Leu Lys  
 900 905 910  
 Gln Ala Ser Ser Gln Gln Phe Thr Asp Thr Lys Ser Val Phe Leu Glu  
 915 920 925  
 Ser Lys Glu Pro Gly Arg Asn Ile Gly Tyr Ile Phe Phe Lys Asn Ser  
 930 935 940  
 Thr Ile Asp Ile Glu Arg Lys Glu Gln Thr Gly Thr Trp Asn Ser Ile  
 945 950 955 960  
 Asn Arg Thr Ser Lys Asn Thr Ser Ile Val Ser Asn Pro Phe Ile Thr  
 965 970 975  
 Ile Ser Gln Lys His Asp Asn Lys Gly Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Met  
 980 985 990  
 Val Pro Asn Ile Asp Arg Thr Ser Phe Asp Lys Leu Ala Asn Ser Lys  
 995 1000 1005  
 Glu Val Glu Leu Leu Glu Asn Ser Ser Lys Gln Gln Val Ile Tyr Asp  
 1010 1015 1020  
 Lys Asn Ser Gln Thr Trp Ala Val Ile Lys His Asp Asn Gln Glu Ser  
 1025 1030 1035 1040  
 Leu Ile Asn Asn Gln Phe Lys Met Asn Lys Ala Gly Leu Tyr Leu Val  
 1045 1050 1055  
 Gln Lys Val Gly Asn Asp Tyr Gln Asn Val Tyr Tyr Gln Pro Gln Thr  
 1060 1065 1070  
 Met Thr Lys Thr Asp Gln Leu Ala Ile  
 1075 1080

<210> 73  
 <211> 984  
 5 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus agalactiae* serotipo III

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 73

Met Lys Gln Val Val Asp Asn Gln Thr Gln Asn Lys Glu Leu Val Lys  
 1 5 10 15  
 Asn Gly Asp Phe Asn Gln Thr Asn Pro Val Ser Gly Ser Trp Ser His  
 20 25 30  
 Thr Ser Ala Arg Glu Trp Ser Ala Trp Ile Asp Lys Glu Asn Thr Ala  
 35 40 45  
 Asp Lys Ser Pro Ile Ile Gln Arg Thr Glu Gln Gly Gln Val Ser Leu  
 50 55 60  
 Ser Ser Asp Lys Gly Phe Arg Gly Ala Val Thr Gln Lys Val Asn Ile  
 65 70 75 80  
 Asp Pro Thr Lys Lys Tyr Glu Val Lys Phe Asp Ile Glu Thr Ser Asn  
 85 90 95  
 Lys Ala Gly Gln Ala Phe Leu Arg Ile Met Glu Lys Lys Asp Asn Asn  
 100 105 110  
 Thr Arg Leu Trp Leu Ser Glu Met Thr Ser Gly Thr Thr Asn Lys His  
 115 120 125  
 Thr Leu Thr Lys Ile Tyr Asn Pro Lys Leu Asn Val Ser Glu Val Thr  
 130 135 140  
 Leu Glu Leu Tyr Tyr Glu Lys Gly Thr Gly Ser Ala Thr Phe Asp Asn

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |
| Ile | Ser | Met | Lys | Ala | Lys | Gly | Pro | Lys | Asp | Ser | Glu | His | Pro | Gln | Pro |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Val | Thr | Thr | Gln | Ile | Glu | Glu | Ser | Val | Asn | Thr | Ala | Leu | Asn | Lys | Asn |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Tyr | Val | Phe | Asn | Lys | Ala | Asp | Tyr | Gln | Tyr | Thr | Leu | Thr | Asn | Pro | Ser |
|     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Leu | Gly | Lys | Ile | Val | Gly | Gly | Ile | Leu | Tyr | Pro | Asn | Ala | Thr | Gly | Ser |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Thr | Thr | Val | Lys | Ile | Ser | Asp | Lys | Ser | Gly | Lys | Ile | Ile | Lys | Glu | Val |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Pro | Leu | Ser | Val | Thr | Ala | Ser | Thr | Glu | Asp | Lys | Phe | Thr | Lys | Leu | Leu |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Asp | Lys | Trp | Asn | Asp | Val | Thr | Ile | Gly | Asn | His | Val | Tyr | Asp | Thr | Asn |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Asp | Ser | Asn | Met | Gln | Lys | Ile | Asn | Gln | Lys | Leu | Asp | Glu | Thr | Asn | Ala |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Lys | Asn | Ile | Lys | Thr | Ile | Lys | Leu | Asp | Ser | Asn | His | Thr | Phe | Leu | Trp |
|     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Lys | Asp | Leu | Asp | Asn | Leu | Asn | Asn | Ser | Ala | Gln | Leu | Thr | Ala | Thr | Tyr |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Arg | Arg | Leu | Glu | Asp | Leu | Ala | Lys | Gln | Ile | Thr | Asn | Pro | His | Ser | Thr |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Ile | Tyr | Lys | Asn | Glu | Lys | Ala | Ile | Arg | Thr | Val | Lys | Glu | Ser | Leu | Ala |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Trp | Leu | His | Gln | Asn | Phe | Tyr | Asn | Val | Asn | Lys | Asp | Ile | Glu | Gly | Ser |
|     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Ala | Asn | Trp | Trp | Asp | Phe | Glu | Ile | Gly | Val | Pro | Arg | Ser | Ile | Thr | Ala |
|     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Thr | Leu | Ala | Leu | Met | Asn | Asn | Tyr | Phe | Thr | Asp | Ala | Glu | Ile | Lys | Thr |
| 385 |     |     |     | 390 |     |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Tyr | Thr | Asp | Pro | Ile | Glu | His | Phe | Val | Pro | Asp | Ala | Gly | Tyr | Phe | Arg |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     |     | 415 |     |
| Lys | Thr | Leu | Asp | Asn | Pro | Phe | Lys | Ala | Leu | Gly | Gly | Asn | Leu | Val | Asp |
|     |     |     | 420 |     |     |     | 425 |     |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Met | Gly | Arg | Val | Lys | Ile | Ile | Glu | Gly | Leu | Leu | Arg | Lys | Asp | Asn | Thr |
|     |     | 435 |     |     |     | 440 |     |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Ile | Ile | Glu | Lys | Thr | Ser | His | Ser | Leu | Lys | Asn | Leu | Phe | Thr | Thr | Ala |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Thr | Lys | Ala | Glu | Gly | Phe | Tyr | Ala | Asp | Gly | Ser | Tyr | Ile | Asp | His | Thr |
| 465 |     |     |     | 470 |     |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Asn | Val | Ala | Tyr | Thr | Gly | Ala | Tyr | Gly | Asn | Val | Leu | Ile | Asp | Gly | Leu |
|     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     |     | 495 |     |
| Thr | Gln | Leu | Leu | Pro | Ile | Ile | Gln | Glu | Thr | Asp | Tyr | Lys | Ile | Ser | Asn |
|     |     |     | 500 |     |     |     | 505 |     |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Gln | Glu | Leu | Asp | Met | Val | Tyr | Lys | Trp | Ile | Asn | Gln | Ser | Phe | Leu | Pro |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Leu | Ile | Val | Lys | Gly | Glu | Leu | Met | Asp | Met | Ser | Arg | Gly | Arg | Ser | Ile |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Ser | Arg | Glu | Ala | Ala | Ser | Ser | His | Ala | Ala | Ala | Val | Glu | Val | Leu | Arg |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Gly | Phe | Leu | Arg | Leu | Ala | Asn | Met | Ser | Asn | Glu | Glu | Arg | Asn | Leu | Asp |
|     |     |     | 565 |     |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Leu | Lys | Ser | Thr | Ile | Lys | Thr | Ile | Ile | Thr | Ser | Asn | Lys | Phe | Tyr | Asn |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Val | Phe | Asn | Asn | Leu | Lys | Ser | Tyr | Ser | Asp | Ile | Ala | Asn | Met | Asn | Lys |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Met | Leu | Asn | Asp | Ser | Thr | Val | Ala | Thr | Lys | Pro | Leu | Lys | Ser | Asn | Leu |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 610 |     |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     |     | 620 |     |     |     |  |  |
| Ser | Thr | Phe | Asn | Ser | Met | Asp | Arg | Leu | Ala | Tyr | Tyr | Asn | Ala | Glu | Lys |  |  |
| 625 |     |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     | 640 |  |  |
| Asp | Phe | Gly | Phe | Ala | Leu | Ser | Leu | His | Ser | Lys | Arg | Thr | Leu | Asn | Tyr |  |  |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     |     | 650 |     |     |     | 655 |     |  |  |
| Glu | Gly | Met | Asn | Asp | Glu | Asn | Thr | Arg | Asp | Trp | Tyr | Thr | Gly | Asp | Gly |  |  |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |  |  |
| Met | Phe | Tyr | Leu | Tyr | Asn | Ser | Asp | Gln | Ser | His | Tyr | Ser | Asn | His | Phe |  |  |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |  |  |
| Trp | Pro | Thr | Val | Asn | Pro | Tyr | Lys | Met | Ala | Gly | Thr | Thr | Glu | Lys | Asp |  |  |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     |     | 700 |     |     |     |  |  |
| Ala | Lys | Arg | Glu | Asp | Thr | Thr | Lys | Glu | Phe | Met | Ser | Lys | His | Ser | Lys |  |  |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     |     | 715 |     |     |     | 720 |  |  |
| Asp | Ala | Lys | Glu | Lys | Thr | Gly | Gln | Val | Thr | Gly | Thr | Ser | Asp | Phe | Val |  |  |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     |     | 730 |     |     |     | 735 |     |  |  |
| Gly | Ser | Val | Lys | Leu | Asn | Asp | His | Phe | Ala | Leu | Ala | Ala | Met | Asp | Phe |  |  |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |  |  |
| Thr | Asn | Trp | Asp | Arg | Thr | Leu | Thr | Ala | Gln | Lys | Gly | Trp | Val | Ile | Leu |  |  |
|     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     |     | 765 |     |     |  |  |
| Asn | Asp | Lys | Ile | Val | Phe | Leu | Gly | Ser | Asn | Ile | Lys | Asn | Thr | Asn | Gly |  |  |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     |     | 780 |     |     |     |  |  |
| Ile | Gly | Asn | Val | Ser | Thr | Thr | Ile | Asp | Gln | Arg | Lys | Asp | Asp | Ser | Lys |  |  |
| 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     |     | 795 |     |     |     | 800 |  |  |
| Thr | Pro | Tyr | Thr | Thr | Tyr | Val | Asn | Gly | Lys | Thr | Ile | Asp | Leu | Lys | Gln |  |  |
|     |     |     |     | 805 |     |     |     |     |     | 810 |     |     |     | 815 |     |  |  |
| Ala | Ser | Ser | Gln | Gln | Phe | Thr | Asp | Thr | Lys | Ser | Val | Phe | Leu | Glu | Ser |  |  |
|     |     |     | 820 |     |     |     |     | 825 |     |     |     |     | 830 |     |     |  |  |
| Lys | Glu | Pro | Gly | Arg | Asn | Ile | Gly | Tyr | Ile | Phe | Phe | Lys | Asn | Ser | Thr |  |  |
|     |     | 835 |     |     |     |     | 840 |     |     |     |     | 845 |     |     |     |  |  |
| Ile | Asp | Ile | Glu | Arg | Lys | Glu | Gln | Thr | Gly | Thr | Trp | Asn | Ser | Ile | Asn |  |  |
|     | 850 |     |     |     |     | 855 |     |     |     |     | 860 |     |     |     |     |  |  |
| Arg | Thr | Ser | Lys | Asn | Thr | Ser | Ile | Val | Ser | Asn | Pro | Phe | Ile | Thr | Ile |  |  |
| 865 |     |     |     |     | 870 |     |     |     |     |     | 875 |     |     |     | 880 |  |  |
| Ser | Gln | Lys | His | Asp | Asn | Lys | Gly | Asp | Ser | Tyr | Gly | Tyr | Met | Met | Val |  |  |
|     |     |     |     | 885 |     |     |     |     |     | 890 |     |     |     | 895 |     |  |  |
| Pro | Asn | Ile | Asp | Arg | Thr | Ser | Phe | Asp | Lys | Leu | Ala | Asn | Ser | Lys | Glu |  |  |
|     |     |     | 900 |     |     |     |     | 905 |     |     |     |     | 910 |     |     |  |  |
| Val | Glu | Leu | Glu | Asn | Ser | Ser | Lys | Gln | Gln | Val | Ile | Tyr | Asp | Lys |     |  |  |
|     |     | 915 |     |     |     |     | 920 |     |     |     |     | 925 |     |     |     |  |  |
| Asn | Ser | Gln | Thr | Trp | Ala | Val | Ile | Lys | His | Asp | Asn | Gln | Glu | Ser | Leu |  |  |
|     |     | 930 |     |     |     | 935 |     |     |     |     |     | 940 |     |     |     |  |  |
| Ile | Asn | Asn | Gln | Phe | Lys | Met | Asn | Lys | Ala | Gly | Leu | Tyr | Leu | Val | Gln |  |  |
| 945 |     |     |     |     | 950 |     |     |     |     | 955 |     |     |     |     | 960 |  |  |
| Lys | Val | Gly | Asn | Asp | Tyr | Gln | Asn | Val | Tyr | Tyr | Gln | Pro | Gln | Thr | Met |  |  |
|     |     |     |     | 965 |     |     |     |     |     | 970 |     |     |     |     | 975 |  |  |
| Thr | Lys | Thr | Asp | Gln | Leu | Ala | Ile |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|     |     |     | 980 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |

<210> 74  
 <211> 807  
 5 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus* (cepa COL)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 74

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

Ser Met Thr Ser Lys Asn Val Ala Arg Tyr Glu Ser Ile Asn Gly Glu  
 465 470 475 480  
 Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn  
 485 490 495  
 Ser Asp Val Lys His Tyr His Asp Asn Phe Trp Val Thr Ala Asp Met  
 500 505 510  
 Lys Arg Leu Ser Gly Thr Thr Thr Leu Asp Asn Glu Ile Leu Lys Asp  
 515 520 525  
 Thr Asp Asp Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly Gly Thr Lys Val  
 530 535 540  
 Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val  
 565 570 575  
 Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro Val  
 580 585 590  
 Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Leu Tyr Thr Asp  
 595 600 605  
 Asp Lys Gln Thr Thr Asn Ser Asp Asn Gln Glu Asn Asn Ser Val Phe  
 610 615 620  
 Leu Glu Ser Thr Asp Thr Lys Lys Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu Asn  
 625 630 635 640  
 Lys Pro Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp Lys  
 645 650 655  
 Glu Ile Asn Lys Ser Gln Lys Asp Thr Gln Lys Thr Asp Glu Tyr Tyr  
 660 665 670  
 Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Ser Asp Asn Lys Tyr Gly Tyr Val  
 675 680 685  
 Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Asp Val Phe Lys Thr Lys Lys Asp Glu  
 690 695 700  
 Val Thr Val Val Lys Gln Glu Asp Asp Phe His Val Val Lys Asp Asn  
 705 710 715 720  
 Glu Ser Val Trp Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asn Ser Thr Gln Thr Phe  
 725 730 735  
 Asp Ile Asn Asn Thr Lys Val Glu Val Lys Ala Lys Gly Met Phe Ile  
 740 745 750  
 Leu Lys Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr Asn Pro  
 755 760 765  
 Glu Ser Thr Asn Ser Ala Ser Asp Ile Glu Ser Lys Ile Ser Met Thr  
 770 775 780  
 Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Lys Asn Thr Ser Thr Ser Asn Glu Ser Gly  
 785 790 795 800  
 Val His Phe Glu Leu Thr Lys  
 805

<210> 75  
 <211> 420  
 5 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus* (cepa MRSA252)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 75

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

ES 2 531 630 T3

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

<210> 76  
 <211> 806  
 5 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus* (cepa MRSA252)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 76



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

Ile Ser Lys Asn Asp Leu Thr Gln Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Asp Met  
 435 440 445  
 Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Asp Leu Asp Phe Ala Phe Gly Leu  
 450 455 460  
 Ser Met Thr Ser Lys Asn Ile Ala Arg Tyr Glu Asn Ile Asn Gly Glu  
 465 470 475 480  
 Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn  
 485 490 495  
 Ser Asp Val Lys His Tyr Arg Asp Asn Phe Trp Ala Thr Ala Asp Met  
 500 505 510  
 Thr Cys Leu Pro Gly Thr Thr Thr Leu Asn Asp Met Pro Ser Thr Asn  
 515 520 525  
 Thr Lys Asn Asp Lys Ser Phe Val Gly Gly Thr Lys Leu Asn Asn Lys  
 530 535 540  
 Tyr Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys Thr Leu Thr  
 545 550 555 560  
 Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly  
 565 570 575  
 Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro Val Thr Ser Val  
 580 585 590  
 Glu Asn Arg Lys Ala Asn Gly Tyr Lys Leu Phe Lys Asp Asp Ile Glu  
 595 600 605  
 Ile Thr Thr Ser Asp Val Asn Ala Gln Glu Thr His Ser Val Phe Leu  
 610 615 620  
 Glu Ser Asn Asp Thr Lys Lys Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu Asp Lys  
 625 630 635 640  
 Pro Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp Ser Glu  
 645 650 655  
 Ile Asn Lys Ser Gln Lys Lys Asp Asp Lys Lys Asp Glu Tyr Tyr Glu  
 660 665 670  
 Val Thr Gln Thr His Asn Thr Ser Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Val Leu  
 675 680 685  
 Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Ser Asp Phe Lys Ser Lys Asn Asn Asn Val  
 690 695 700  
 Ser Ile Val Lys Gln Asp Glu Asp Phe His Val Ile Lys Asp Asn Asp  
 705 710 715 720  
 Gly Val Phe Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asp Asn Thr Lys Ser Phe Asp  
 725 730 735  
 Ile Asn Gly Ile Thr Val Glu Leu Lys Glu Lys Gly Met Phe Val Ile  
 740 745 750  
 Lys Lys Lys Asp Asp Lys Ala Tyr Lys Cys Ser Phe Tyr Asn Pro Glu  
 755 760 765  
 Thr Thr Asn Thr Ala Ser Asn Ile Glu Ser Lys Ile Phe Ile Lys Gly  
 770 775 780  
 Tyr Thr Ile Thr Asn Lys Ser Val Ile Asn Ser Asn Asp Ala Gly Val  
 785 790 795 800  
 Asn Phe Glu Leu Thr Lys  
 805

<210> 77  
 <211> 815  
 5 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus* (cepa MSSA476)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 77

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

Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Asp Leu Asp Phe Ala Phe Gly Leu  
 450 455 460  
 Ser Met Thr Ser Lys Asn Val Ala Arg Tyr Glu Ser Ile Asn Gly Glu  
 465 470 475 480  
 Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn  
 485 490 495  
 Ser Asp Val Lys His Tyr Arg Asp Asn Phe Trp Ala Thr Ala Asp Met  
 500 505 510  
 Lys Arg Leu Ala Gly Thr Thr Thr Leu Glu Asn Glu Glu Pro Lys Gly  
 515 520 525  
 Thr Asp Val Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly Gly Thr Lys Phe  
 530 535 540  
 Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val  
 565 570 575  
 Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro Val  
 580 585 590  
 Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Leu Tyr Thr Asp  
 595 600 605  
 Asp Lys Gln Thr Thr Ala Ser Asp Asn Gln Gly Thr Asn Ser Val Phe  
 610 615 620  
 Leu Glu Ser Thr Asn Lys Pro Lys Asn Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu  
 625 630 635 640  
 Asn Glu Ser Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp  
 645 650 655  
 Ser Asp Ile Asn Lys Ser Gln Lys Gln Asp Ser Lys Thr Asn Gln Tyr  
 660 665 670  
 Tyr Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Thr Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr  
 675 680 685  
 Val Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Asp Asp Phe Asn Thr Lys Lys Asp  
 690 695 700  
 Lys Val Thr Val Val Lys Gln Asp Asp Asp Phe His Val Val Lys Asp  
 705 710 715 720  
 Asn Glu Ser Val Trp Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asp Ser Thr Gln Thr  
 725 730 735  
 Phe Ile Ile Asn Asn Thr Lys Val Glu Val Lys Ala Lys Gly Met Phe  
 740 745 750  
 Ile Leu Lys Lys Lys Asp Asp Lys Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr Asn  
 755 760 765  
 Pro Glu Ser Thr Asn Thr Ala Ser Asp Ile Glu Ser Lys Ile Ser Met  
 770 775 780  
 Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Lys Asn Thr Ser Thr Ser Asn Glu Ser  
 785 790 795 800  
 Gly Val Arg Phe Glu Leu Gln Gln Thr Leu Asn Lys Asp Asp Asn  
 805 810 815

<210> 78  
 <211> 807  
 5 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus* (cepa NCTC 8325)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 78

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

Ser Met Thr Ser Lys Asn Val Ala Arg Tyr Glu Ser Ile Asn Gly Glu  
 465 470 475 480  
 Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn  
 485 490 495  
 Ser Asp Val Lys His Tyr His Asp Asn Phe Trp Val Thr Ala Asp Met  
 500 505 510  
 Lys Arg Leu Ser Gly Thr Thr Thr Leu Asp Asn Glu Ile Leu Lys Asp  
 515 520 525  
 Thr Asp Asp Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly Gly Thr Lys Val  
 530 535 540  
 Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val  
 565 570 575  
 Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro Val  
 580 585 590  
 Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Leu Tyr Thr Asp  
 595 600 605  
 Asp Lys Gln Thr Thr Asn Ser Asp Asn Gln Glu Asn Asn Ser Val Phe  
 610 615 620  
 Leu Glu Ser Thr Asp Thr Lys Lys Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu Asn  
 625 630 635 640  
 Lys Pro Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp Lys  
 645 650 655  
 Glu Ile Asn Lys Ser Gln Lys Asp Thr Gln Lys Thr Asp Glu Tyr Tyr  
 660 665 670  
 Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Ser Asp Asn Lys Tyr Gly Tyr Val  
 675 680 685  
 Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Asp Val Phe Lys Thr Lys Lys Asp Glu  
 690 695 700  
 Val Thr Val Val Lys Gln Glu Asp Asp Phe His Val Val Lys Asp Asn  
 705 710 715 720  
 Glu Ser Val Trp Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asn Ser Thr Gln Thr Phe  
 725 730 735  
 Asp Ile Asn Asn Thr Lys Val Glu Val Lys Ala Lys Gly Met Phe Ile  
 740 745 750  
 Leu Lys Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr Asn Pro  
 755 760 765  
 Glu Ser Thr Asn Ser Ala Ser Asp Ile Glu Ser Lys Ile Ser Met Thr  
 770 775 780  
 Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Lys Asn Thr Ser Thr Ser Asn Glu Ser Gly  
 785 790 795 800  
 Val His Phe Glu Leu Thr Lys  
 805

<210> 79  
 <211> 809  
 5 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus* (cepa bovina RF122)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 79

Met Thr Tyr Arg Met Lys Lys Trp Gln Lys Leu Ser Thr Ile Thr Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Met Ala Gly Gly Ile Thr Phe Asn Asp Ser Glu Phe Arg Ser Val

ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |
| Asp | Lys | His | Gln | Ile | Ala | Val | Ala | Asp | Thr | Asn | Val | Gln | Thr | Pro | Asn |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Tyr | Glu | Lys | Leu | Lys | Asn | Thr | Trp | Leu | Asp | Val | Asn | Tyr | Gly | Tyr | Asp |
|     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Lys | Tyr | Asp | Glu | Ser | Asn | Pro | Asp | Met | Lys | Lys | Lys | Phe | Glu | Ala | Thr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Glu | Lys | Glu | Ala | Arg | Lys | Leu | Leu | Ser | Glu | Met | Lys | Thr | Glu | Ser | Asp |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Arg | Lys | Tyr | Leu | Trp | Glu | Asn | Ser | Lys | Asp | Leu | Asp | Thr | Lys | Ser | Ala |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Asp | Met | Thr | Arg | Thr | Tyr | Arg | Asn | Ile | Glu | Lys | Ile | Ala | Glu | Ala | Met |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Lys | His | Pro | Lys | Thr | Thr | Leu | Lys | Asn | Asp | Glu | Asn | Lys | Lys | Lys | Val |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |
| Lys | Asp | Ala | Leu | Glu | Trp | Leu | His | Lys | Asn | Ala | Tyr | Gly | Lys | Glu | Pro |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Gly | Lys | Lys | Val | Ala | Asp | Leu | Lys | Thr | Asn | Phe | Ser | Lys | Ser | Ala | Pro |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Gln | Lys | Asn | Thr | Asn | Leu | Asn | Trp | Trp | Asp | Tyr | Glu | Ile | Gly | Thr | Pro |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Arg | Ala | Leu | Thr | Asn | Thr | Leu | Ile | Leu | Leu | Lys | Glu | Asp | Phe | Thr | Asp |
|     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Glu | Glu | Lys | Lys | Lys | Tyr | Thr | Ala | Pro | Ile | Lys | Thr | Phe | Ala | Pro | Lys |
|     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Ser | Asp | Glu | Ile | Leu | Ser | Ser | Val | Gly | Lys | Ala | Glu | Pro | Ala | Lys | Gly |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Gly | Asn | Leu | Val | Asp | Ile | Ser | Lys | Val | Lys | Leu | Leu | Glu | Ser | Ile | Ile |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Glu | Glu | Asp | Lys | Asp | Met | Met | Lys | Asn | Ser | Ile | Asp | Ser | Phe | Asn | Lys |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Val | Phe | Thr | Tyr | Val | Gln | Asp | Ser | Ala | Thr | Asp | Lys | Glu | Arg | Asn | Gly |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Phe | Tyr | Lys | Asp | Gly | Ser | Tyr | Ile | Asp | His | Lys | Asp | Val | Pro | Tyr | Thr |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Gly | Ala | Tyr | Gly | Val | Val | Leu | Leu | Glu | Gly | Ile | Ser | Gln | Met | Met | Pro |
|     |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Met | Ile | Lys | Glu | Thr | Pro | Phe | Asn | Asp | Lys | Thr | Gln | Asn | Asn | Thr | Thr |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Leu | Thr | Ser | Trp | Ile | Asp | Asp | Gly | Phe | Met | Pro | Leu | Ile | Tyr | Lys | Gly |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Glu | Met | Met | Asp | Leu | Ser | Arg | Gly | Arg | Ala | Ile | Ser | Arg | Glu | Asn | Glu |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Thr | Ser | His | Ser | Ala | Ser | Ala | Thr | Val | Met | Lys | Ser | Leu | Leu | Arg | Leu |
|     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Ser | Asp | Ala | Met | Asp | Glu | Ser | Thr | Lys | Ala | Lys | Tyr | Lys | Gln | Ile | Val |
|     | 385 |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Lys | Asn | Ser | Val | Lys | Ser | Asp | Ser | Ser | Tyr | Gly | Gln | Asn | Asp | Thr | Leu |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Ser | Ser | Tyr | Ser | Asp | Ile | Asp | Lys | Met | Lys | Ser | Leu | Met | Thr | Asp | Ser |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Thr | Ile | Ser | Thr | Asn | Gly | Leu | Thr | Gln | Gln | Leu | Lys | Ile | Tyr | Asn | Ala |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Met | Asp | Arg | Val | Thr | Tyr | His | Asn | Lys | Asp | Leu | Asp | Phe | Ala | Phe | Gly |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Leu | Ser | Met | Thr | Ser | Lys | Asn | Val | Ala | Arg | Tyr | Glu | Asn | Ile | Asn | Gly |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |

Glu Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr  
 485 490 495  
 Asn Ser Asp Val Arg His Tyr Arg Asp Asn Phe Trp Ala Thr Ala Asp  
 500 505 510  
 Met Lys Arg Leu Ala Asp Thr Thr Thr Leu Glu Asn Glu Glu Pro Lys  
 515 520 525  
 Gly Thr Asp Val Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly Gly Thr Lys  
 530 535 540  
 Phe Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp  
 545 550 555 560  
 Lys Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile  
 565 570 575  
 Val Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Thr Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro  
 580 585 590  
 Val Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala His Gly Tyr Thr Leu Tyr Thr  
 595 600 605  
 Asp Asp Lys Gln Thr Thr Asn Ser Asn Asn Gln Glu Thr Asn Ser Val  
 610 615 620  
 Phe Leu Glu Ser Thr Asn Ser Thr Gln Asn Asn Ile Gly Tyr His Phe  
 625 630 635 640  
 Leu Asn Lys Ser Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys  
 645 650 655  
 Trp Ser Asp Ile Asn Lys Ser Gln Lys Asp Thr Gln Lys Thr Asp Glu  
 660 665 670  
 Tyr Tyr Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Thr Asp Asp Lys Tyr Ala  
 675 680 685  
 Tyr Val Leu Tyr Pro Gly Ile Thr Lys Asp Asn Phe Lys Ser Lys Ala  
 690 695 700  
 Ser Gln Val Thr Val Val Lys Gln Asp Asp Asp Phe His Val Val Lys  
 705 710 715 720  
 Asp Asn Glu Ser Val Trp Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asp Ser Thr Gln  
 725 730 735  
 Thr Phe Asp Ile Asn Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Ala Lys Gly Met  
 740 745 750  
 Phe Ile Leu Lys Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr  
 755 760 765  
 Asn Pro Glu Ser Thr Asn Ser Ala Ser Asp Ile Glu Ser Lys Ile Ser  
 770 775 780  
 Met Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Lys Asn Thr Ser Asn Thr Asn Glu  
 785 790 795 800  
 Ser Gly Val Arg Phe Glu Leu Thr Lys  
 805

<210> 80  
 <211> 807  
 5 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus* (cepa bovina RF122)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 80

Met Thr Tyr Lys Met Lys Lys Trp Gln Lys Leu Ser Thr Ile Thr Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Met Ala Gly Val Ile Thr Leu Asn Asn Gly Glu Phe Arg Asn Val  
 20 25 30  
 Asp Lys His Gln Ile Ala Val Ala Asp Thr Asn Val Gln Thr Pro Asp



ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| Tyr | Glu | Lys | Leu | Lys | Lys | Thr | Trp | Leu | Asp | Val | Asn | Tyr | Gly | Asn | Asp |
| 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Gln | Tyr | Asp | Glu | Asn | Asn | Gln | Asp | Met | Lys | Lys | Lys | Phe | Asp | Ala | Lys |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Glu | Asn | Glu | Ala | Lys | Lys | Leu | Leu | Glu | Asp | Met | Lys | Thr | Asp | Thr | Asn |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Arg | Thr | Tyr | Leu | Trp | Ser | Gly | Ala | Glu | Asn | Leu | Glu | Thr | Asn | Ser | Ser |
|     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |     |
| His | Met | Thr | Lys | Thr | Tyr | Arg | Asn | Ile | Glu | Lys | Ile | Ala | Glu | Ala | Met |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |
| Arg | His | Lys | Asn | Thr | Ser | Leu | Lys | Thr | Asp | Glu | Asn | Lys | Leu | Lys | Ile |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Lys | Asp | Ala | Ile | Lys | Trp | Leu | His | His | Asn | Val | Tyr | Gly | Lys | Asp | Pro |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Asp | Lys | Lys | Val | Ala | Asp | Leu | Thr | Thr | Asn | Arg | Lys | Glu | Lys | Asp | Ser |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Ser | Lys | Lys | Asn | Asn | Ser | Leu | Asn | Trp | Trp | Asp | Tyr | Glu | Ile | Gly | Thr |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Pro | Arg | Ala | Leu | Thr | Asn | Thr | Leu | Leu | Leu | Met | Asp | Asn | Met | Leu | Thr |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Lys | Asp | Glu | Met | Lys | Asn | Tyr | Ser | Lys | Pro | Ile | Ser | Ile | Tyr | Ser | Pro |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Ser | Ser | Tyr | Lys | Ile | Leu | Ser | Ser | Val | Gly | Glu | Ser | Glu | Asp | Ala | Lys |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Gly | Gly | Asn | Leu | Val | Asp | Ile | Ala | Lys | Val | Lys | Phe | Leu | Glu | Ser | Val |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ile | Glu | Glu | Asp | Val | Asp | Met | Met | Lys | Lys | Ser | Ile | Asp | Ser | Phe | Asn |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Lys | Val | Phe | Thr | Tyr | Val | Gln | Asp | Ser | Ala | Thr | Gly | Lys | Ala | Arg | Asn |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |
| Gly | Phe | Tyr | Lys | Asp | Gly | Ser | Tyr | Ile | Asp | His | Gln | Asp | Val | Pro | Tyr |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Thr | Gly | Ala | Tyr | Gly | Val | Val | Leu | Leu | Glu | Gly | Ile | Ser | Gln | Met | Met |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Pro | Met | Ile | Lys | Glu | Ser | Pro | Phe | Lys | His | Thr | Gln | Asp | Lys | Ala | Thr |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Leu | Ser | Asn | Trp | Ile | Asp | Glu | Gly | Phe | Met | Pro | Leu | Ile | Tyr | Lys | Gly |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     | 350 |     |
| Glu | Met | Met | Asp | Leu | Ser | Arg | Gly | Arg | Ala | Ile | Ser | Arg | Glu | Asn | Glu |
|     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Thr | Ser | His | Thr | Ala | Ser | Ala | Thr | Val | Met | Lys | Ser | Leu | Leu | Arg | Leu |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     | 380 |     |     |     |
| Ser | Asp | Thr | Met | Asp | Glu | Ser | Thr | Lys | Thr | Lys | Tyr | Lys | Gln | Ile | Val |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Lys | Thr | Ser | Val | Lys | Ser | Asp | Ser | Ser | Tyr | Asp | Ser | Asn | Asp | Thr | Leu |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Asn | Ser | Tyr | Ser | Asp | Ile | Asp | Lys | Met | Lys | Lys | Leu | Met | Asn | Asp | Ser |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Thr | Ile | Ser | Lys | Asn | Asp | Leu | Thr | Gln | Gln | Leu | Lys | Ile | Tyr | Asn | Asp |
|     |     |     | 435 |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Met | Asp | Arg | Val | Thr | Tyr | His | Asn | Lys | Glu | Leu | Asp | Phe | Ala | Phe | Gly |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Leu | Ser | Met | Thr | Ser | Lys | Asn | Ile | Ala | Arg | Tyr | Glu | Asn | Ile | Asn | Gly |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Glu | Asn | Leu | Lys | Gly | Trp | His | Thr | Gly | Ala | Gly | Met | Ser | Tyr | Leu | Tyr |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Asn | Ser | Asp | Val | Lys | His | Tyr | Arg | Asp | Asn | Phe | Trp | Ala | Thr | Ala | Asp |

ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
|     |     |     |     | 500 |     |     |     |     |     | 505 |     |     |     | 510 |     |  |  |  |
| Met | Thr | Arg | Leu | Pro | Gly | Thr | Thr | Thr | Leu | Asn | Asp | Met | Pro | Ser | Thr |  |  |  |
|     |     | 515 |     |     |     |     |     | 520 |     |     |     | 525 |     |     |     |  |  |  |
| Asn | Thr | Lys | Asn | Asp | Lys | Ser | Phe | Val | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Asn | Asn |  |  |  |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |  |  |  |
| Lys | Tyr | Ala | Ser | Ile | Gly | Met | Asp | Phe | Glu | Asn | Gln | Asp | Lys | Thr | Leu |  |  |  |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |  |  |  |
| Thr | Ala | Lys | Lys | Ser | Tyr | Phe | Ile | Leu | Asn | Asp | Lys | Ile | Val | Phe | Ile |  |  |  |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     |     | 570 |     |     |     | 575 |     |  |  |  |
| Gly | Thr | Gly | Ile | Lys | Ser | Thr | Asp | Ser | Ser | Lys | Asn | Pro | Val | Thr | Ser |  |  |  |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |  |  |  |
| Val | Glu | Asn | Arg | Lys | Ala | Asn | Gly | Tyr | Lys | Leu | Phe | Lys | Gly | Asp | Ile |  |  |  |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |  |  |  |
| Glu | Ile | Thr | Thr | Ser | Asp | Val | Asn | Ala | Gln | Glu | Thr | His | Ser | Val | Phe |  |  |  |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |  |  |  |
| Leu | Glu | Ser | Asn | Asp | Thr | Lys | Lys | Asn | Ile | Gly | Tyr | His | Phe | Leu | Asp |  |  |  |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |  |  |  |
| Lys | Pro | Lys | Ile | Thr | Val | Lys | Lys | Glu | Ser | His | Thr | Gly | Lys | Trp | Ser |  |  |  |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     |     | 650 |     |     |     | 655 |     |  |  |  |
| Glu | Ile | Asn | Lys | Ser | Gln | Lys | Thr | Asp | Asp | Lys | Lys | Asp | Glu | Tyr | Tyr |  |  |  |
|     |     | 660 |     |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |  |  |  |
| Glu | Val | Thr | Gln | Thr | His | Asn | Thr | Ser | Asp | Ser | Lys | Tyr | Ala | Tyr | Val |  |  |  |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |  |  |  |
| Leu | Tyr | Pro | Gly | Leu | Ser | Lys | Ser | Asp | Phe | Lys | Ser | Lys | Asn | Asn | Asn |  |  |  |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |  |  |  |
| Val | Ser | Ile | Val | Lys | Gln | Asp | Glu | Asp | Phe | His | Val | Ile | Lys | Asp | Asn |  |  |  |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |  |  |  |
| Asp | Gly | Val | Phe | Ala | Gly | Val | Asn | Tyr | Ser | Asp | Ser | Thr | Lys | Ser | Phe |  |  |  |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |  |  |  |
| Asp | Ile | Asn | Gly | Thr | Ile | Val | Glu | Leu | Lys | Glu | Lys | Gly | Met | Phe | Val |  |  |  |
|     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |     |  |  |  |
| Ile | Lys | Lys | Lys | Asp | Asp | Asn | Thr | Tyr | Glu | Cys | Ser | Phe | Tyr | Asn | Pro |  |  |  |
|     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |     |     |  |  |  |
| Thr | Ser | Thr | Asn | Ser | Thr | Ser | Asn | Lys | Glu | Ser | Lys | Ile | Ser | Val | Thr |  |  |  |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |  |  |  |
| Gly | Tyr | Thr | Ile | Thr | Asn | Gln | Ser | Val | Ser | Asn | Phe | Lys | Glu | Ser | Asp |  |  |  |
| 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     | 795 |     |     |     |     | 800 |  |  |  |
| Ile | His | Phe | Glu | Leu | Thr | Lys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
|     |     |     |     | 805 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |

<210> 81  
 <211> 807  
 5 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus* (cepa USA300)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 81

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
| Met | Thr | Tyr | Arg | Ile | Lys | Lys | Trp | Gln | Lys | Leu | Ser | Thr | Ile | Thr | Leu |  |  |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |  |  |  |
| Leu | Met | Ala | Gly | Val | Ile | Thr | Leu | Asn | Gly | Gly | Glu | Phe | Arg | Ser | Val |  |  |  |
|     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |  |  |
| Asp | Lys | His | Gln | Ile | Ala | Val | Ala | Asp | Thr | Asn | Val | Gln | Thr | Pro | Asp |  |  |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |  |  |  |
| Tyr | Glu | Lys | Leu | Arg | Asn | Thr | Trp | Leu | Asp | Val | Asn | Tyr | Gly | Tyr | Asp |  |  |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |  |

Lys Tyr Asp Glu Asn Asn Pro Asp Met Lys Lys Lys Phe Asp Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Glu Lys Glu Ala Thr Asn Leu Leu Lys Glu Met Lys Thr Glu Ser Gly  
 85 90 95  
 Arg Lys Tyr Leu Trp Ser Gly Ala Glu Thr Leu Glu Thr Asn Ser Ser  
 100 105 110  
 His Met Thr Arg Thr Tyr Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ala Glu Ala Met  
 115 120 125  
 Arg Asn Pro Lys Thr Thr Leu Asn Thr Asp Glu Asn Lys Lys Lys Val  
 130 135 140  
 Lys Asp Ala Leu Glu Trp Leu His Lys Asn Ala Tyr Gly Lys Glu Pro  
 145 150 155 160  
 Asp Lys Lys Val Lys Glu Leu Ser Glu Asn Phe Thr Lys Thr Thr Gly  
 165 170 175  
 Lys Asn Thr Asn Leu Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr Pro Lys  
 180 185 190  
 Ser Leu Thr Asn Thr Leu Ile Leu Leu Asn Asp Gln Phe Ser Asn Glu  
 195 200 205  
 Glu Lys Lys Lys Phe Thr Ala Pro Ile Lys Thr Phe Ala Pro Asp Ser  
 210 215 220  
 Asp Lys Ile Leu Ser Ser Val Gly Lys Ala Glu Leu Ala Lys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Asn Leu Val Asp Ile Ser Lys Val Lys Leu Leu Glu Cys Ile Ile Glu  
 245 250 255  
 Glu Asp Lys Asp Met Met Lys Lys Ser Ile Asp Ser Phe Asn Lys Val  
 260 265 270  
 Phe Thr Tyr Val Gln Asp Ser Ala Thr Gly Lys Glu Arg Asn Gly Phe  
 275 280 285  
 Tyr Lys Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Gln Asp Val Pro Tyr Thr Gly  
 290 295 300  
 Ala Tyr Gly Val Val Leu Leu Glu Gly Ile Ser Gln Met Met Pro Met  
 305 310 315 320  
 Ile Lys Glu Thr Pro Phe Asn Asp Lys Thr Gln Asn Asp Thr Thr Leu  
 325 330 335  
 Lys Ser Trp Ile Asp Asp Gly Phe Met Pro Leu Ile Tyr Lys Gly Glu  
 340 345 350  
 Met Met Asp Leu Ser Arg Gly Arg Ala Ile Ser Arg Glu Asn Glu Thr  
 355 360 365  
 Ser His Ser Ala Ser Ala Thr Val Met Lys Ser Leu Leu Arg Leu Ser  
 370 375 380  
 Asp Ala Met Asp Asp Ser Thr Lys Ala Lys Tyr Lys Lys Ile Val Lys  
 385 390 395 400  
 Ser Ser Val Glu Ser Asp Ser Ser Tyr Lys Gln Asn Asp Tyr Leu Asn  
 405 410 415  
 Ser Tyr Ser Asp Ile Asp Lys Met Lys Ser Leu Met Thr Asp Asn Ser  
 420 425 430  
 Ile Ser Lys Asn Gly Leu Thr Gln Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Asp Met  
 435 440 445  
 Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Asp Leu Asp Phe Ala Phe Gly Leu  
 450 455 460  
 Ser Met Thr Ser Lys Asn Val Ala Arg Tyr Glu Ser Ile Asn Gly Glu  
 465 470 475 480  
 Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn  
 485 490 495  
 Ser Asp Val Lys His Tyr His Asp Asn Phe Trp Val Thr Ala Asp Met  
 500 505 510  
 Lys Arg Leu Ser Gly Thr Thr Thr Leu Asp Asn Glu Ile Leu Lys Asp  
 515 520 525

Thr Asp Asp Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly Gly Thr Lys Val  
 530 535 540  
 Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val  
 565 570 575  
 Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro Val  
 580 585 590  
 Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Leu Tyr Thr Asp  
 595 600 605  
 Asp Lys Gln Thr Thr Asn Ser Asp Asn Gln Glu Asn Asn Ser Val Phe  
 610 615 620  
 Leu Glu Ser Thr Asp Thr Lys Lys Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu Asn  
 625 630 635 640  
 Lys Pro Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp Lys  
 645 650 655  
 Glu Ile Asn Lys Ser Gln Lys Asp Thr Gln Lys Thr Asp Glu Tyr Tyr  
 660 665 670  
 Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Ser Asp Asn Lys Tyr Gly Tyr Val  
 675 680 685  
 Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Asp Val Phe Lys Thr Lys Lys Asp Glu  
 690 695 700  
 Val Thr Val Val Lys Gln Glu Asp Asp Phe His Val Val Lys Asp Asn  
 705 710 715 720  
 Glu Ser Val Trp Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asn Ser Thr Gln Thr Phe  
 725 730 735  
 Asp Ile Asn Asn Thr Lys Val Glu Val Lys Ala Lys Gly Met Phe Ile  
 740 745 750  
 Leu Lys Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr Asn Pro  
 755 760 765  
 Glu Ser Thr Asn Ser Ala Ser Asp Ile Glu Ser Lys Ile Ser Met Thr  
 770 775 780  
 Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Lys Asn Thr Ser Thr Ser Asn Glu Ser Gly  
 785 790 795 800  
 Val His Phe Glu Leu Thr Lys  
 805

<210> 82  
 <211> 1066  
 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus pneumoniae*

<220>  
 <223> hialuronano liasa

<400> 82

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

ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |
| Glu | Ala | Lys | Asp | Gly | Ala | Ile | Thr | Ile | Ser | Ser | His | Glu | Lys | Leu | Arg |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Ala | Ala | Leu | His | Arg | Met | Val | Pro | Ile | Glu | Ala | Lys | Lys | Lys | Tyr | Lys |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Leu | Arg | Phe | Lys | Ile | Lys | Thr | Asp | Asn | Lys | Ile | Gly | Ile | Ala | Lys | Val |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Arg | Ile | Ile | Glu | Glu | Ser | Gly | Lys | Asp | Lys | Arg | Leu | Trp | Asn | Ser | Ala |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Thr | Thr | Ser | Gly | Thr | Lys | Asp | Trp | Gln | Thr | Ile | Glu | Ala | Asp | Tyr | Ser |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |
| Pro | Thr | Leu | Asp | Val | Asp | Lys | Ile | Lys | Leu | Glu | Leu | Phe | Tyr | Glu | Thr |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Gly | Thr | Gly | Thr | Val | Ser | Phe | Lys | Asp | Ile | Glu | Leu | Val | Glu | Val | Ala |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Asp | Gln | Leu | Ser | Glu | Asp | Ser | Gln | Thr | Asp | Lys | Gln | Leu | Glu | Glu | Lys |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Ile | Asp | Leu | Pro | Ile | Gly | Lys | Lys | His | Val | Phe | Ser | Leu | Ala | Asp | Tyr |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Thr | Tyr | Lys | Val | Glu | Asn | Pro | Asp | Val | Ala | Ser | Val | Lys | Asn | Gly | Ile |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Leu | Glu | Pro | Leu | Lys | Glu | Gly | Thr | Thr | Asn | Val | Ile | Val | Ser | Lys | Asp |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |
| Gly | Lys | Glu | Val | Lys | Lys | Ile | Pro | Leu | Lys | Ile | Leu | Ala | Ser | Val | Lys |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Asp | Ala | Tyr | Thr | Asp | Arg | Leu | Asp | Asp | Trp | Asn | Gly | Ile | Ile | Ala | Gly |
|     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Asn | Gln | Tyr | Tyr | Asp | Ser | Lys | Asn | Glu | Gln | Met | Ala | Lys | Leu | Asn | Gln |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Glu | Leu | Glu | Gly | Lys | Val | Ala | Asp | Ser | Leu | Ser | Ser | Ile | Ser | Ser | Gln |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     |     | 335 |
| Ala | Asp | Arg | Thr | Tyr | Leu | Trp | Glu | Lys | Phe | Ser | Asn | Tyr | Lys | Thr | Ser |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     | 350 |     |
| Ala | Asn | Leu | Thr | Ala | Thr | Tyr | Arg | Lys | Leu | Glu | Glu | Met | Ala | Lys | Gln |
|     | 355 |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Val | Thr | Asn | Pro | Ser | Ser | Arg | Tyr | Tyr | Gln | Asp | Glu | Thr | Val | Val | Arg |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     | 380 |     |     |     |
| Thr | Val | Arg | Asp | Ser | Met | Glu | Trp | Met | His | Lys | His | Val | Tyr | Asn | Ser |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Glu | Lys | Ser | Ile | Val | Gly | Asn | Trp | Trp | Asp | Tyr | Glu | Ile | Gly | Thr | Pro |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Arg | Ala | Ile | Asn | Asn | Thr | Leu | Ser | Leu | Met | Lys | Glu | Tyr | Phe | Ser | Asp |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Glu | Glu | Ile | Lys | Lys | Tyr | Thr | Asp | Val | Ile | Glu | Lys | Phe | Val | Pro | Asp |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Pro | Glu | His | Phe | Arg | Lys | Thr | Thr | Asp | Asn | Pro | Phe | Lys | Ala | Leu | Gly |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Gly | Asn | Leu | Val | Asp | Met | Gly | Arg | Val | Lys | Val | Ile | Ala | Gly | Leu | Leu |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Arg | Lys | Asp | Asp | Gln | Glu | Ile | Ser | Ser | Thr | Ile | Arg | Ser | Ile | Glu | Gln |
|     |     |     | 485 |     |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Val | Phe | Lys | Leu | Val | Asp | Gln | Gly | Glu | Gly | Phe | Tyr | Gln | Asp | Gly | Ser |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Tyr | Ile | Asp | His | Thr | Asn | Val | Ala | Tyr | Thr | Gly | Ala | Tyr | Gly | Asn | Val |
|     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Leu | Ile | Asp | Gly | Leu | Ser | Gln | Leu | Leu | Pro | Val | Ile | Gln | Lys | Thr | Lys |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     |     | 540 |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| Asn | Pro | Ile | Asp | Lys | Asp | Lys | Met  | Gln | Thr | Met | Tyr | His | Trp  | Ile | Asp |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |      |     |     | 555 |     |     |      |     | 560 |
| Lys | Ser | Phe | Ala | Pro | Leu | Leu | Val  | Asn | Gly | Glu | Leu | Met | Asp  | Met | Ser |
|     |     |     |     | 565 |     |     |      |     | 570 |     |     |     |      |     | 575 |
| Arg | Gly | Arg | Ser | Ile | Ser | Arg | Ala  | Asn | Ser | Glu | Gly | His | Val  | Ala | Ala |
|     |     |     | 580 |     |     |     |      | 585 |     |     |     |     | 590  |     |     |
| Val | Glu | Val | Leu | Arg | Gly | Ile | His  | Arg | Ile | Ala | Asp | Met | Ser  | Glu | Gly |
|     | 595 |     |     |     |     |     | 600  |     |     |     |     | 605 |      |     |     |
| Glu | Thr | Lys | Gln | Cys | Leu | Gln | Ser  | Leu | Val | Lys | Thr | Ile | Val  | Gln | Ser |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |      |     |     |     | 620 |     |      |     |     |
| Asp | Ser | Tyr | Tyr | Asp | Val | Phe | Lys  | Asn | Leu | Lys | Thr | Tyr | Lys  | Asp | Ile |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |      |     |     | 635 |     |     |      |     | 640 |
| Ser | Leu | Met | Gln | Ser | Leu | Leu | Ser  | Asp | Ala | Gly | Val | Ala | Ser  | Val | Pro |
|     |     |     |     | 645 |     |     |      |     | 650 |     |     |     |      | 655 |     |
| Arg | Pro | Ser | Tyr | Leu | Ser | Ala | Phe  | Asn | Lys | Met | Asp | Lys | Thr  | Ala | Met |
|     |     |     | 660 |     |     |     |      | 665 |     |     |     |     | 670  |     |     |
| Tyr | Asn | Ala | Glu | Lys | Gly | Phe | Gly  | Phe | Gly | Leu | Ser | Leu | Phe  | Ser | Ser |
|     | 675 |     |     |     |     |     | 680  |     |     |     |     |     | 685  |     |     |
| Arg | Thr | Leu | Asn | Tyr | Glu | His | Met  | Asn | Lys | Glu | Asn | Lys | Arg  | Gly | Trp |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |      |     |     |     |     | 700 |      |     |     |
| Tyr | Thr | Ser | Asp | Gly | Met | Phe | Tyr  | Leu | Tyr | Asn | Gly | Asp | Leu  | Ser | His |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |      |     |     | 715 |     |     |      |     | 720 |
| Tyr | Ser | Asp | Gly | Tyr | Trp | Pro | Thr  | Val | Asn | Pro | Tyr | Lys | Met  | Pro | Gly |
|     |     |     |     | 725 |     |     |      |     | 730 |     |     |     |      | 735 |     |
| Thr | Thr | Glu | Thr | Asp | Ala | Lys | Arg  | Ala | Asp | Ser | Asp | Thr | Gly  | Lys | Val |
|     |     |     | 740 |     |     |     |      | 745 |     |     |     |     | 750  |     |     |
| Leu | Pro | Ser | Ala | Phe | Val | Gly | Thr  | Ser | Lys | Leu | Asp | Asp | Ala  | Asn | Ala |
|     | 755 |     |     |     |     |     | 760  |     |     |     |     |     | 765  |     |     |
| Thr | Ala | Thr | Met | Asp | Phe | Thr | Asn  | Trp | Asn | Gln | Thr | Leu | Thr  | Ala | His |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |      |     |     |     | 780 |     |      |     |     |
| Lys | Ser | Trp | Phe | Met | Leu | Lys | Asp  | Lys | Ile | Ala | Phe | Leu | Gly  | Ser | Asn |
| 785 |     |     |     |     | 790 |     |      |     |     | 795 |     |     |      |     | 800 |
| Ile | Gln | Asn | Thr | Ser | Thr | Asp | Thr  | Ala | Ala | Thr | Thr | Ile | Asp  | Gln | Arg |
|     |     |     |     | 805 |     |     |      |     | 810 |     |     |     |      | 815 |     |
| Lys | Leu | Glu | Ser | Gly | Asn | Pro | Tyr  | Lys | Val | Tyr | Val | Asn | Asp  | Lys | Glu |
|     |     |     | 820 |     |     |     |      | 825 |     |     |     |     | 830  |     |     |
| Ala | Ser | Leu | Thr | Glu | Gln | Glu | Lys  | Asp | Tyr | Pro | Glu | Thr | Gln  | Ser | Val |
|     | 835 |     |     |     |     |     | 840  |     |     |     |     |     | 845  |     |     |
| Phe | Leu | Glu | Ser | Phe | Asp | Ser | Lys  | Lys | Asn | Ile | Gly | Tyr | Phe  | Phe | Phe |
|     | 850 |     |     |     |     | 855 |      |     |     |     | 860 |     |      |     |     |
| Lys | Lys | Ser | Ser | Ile | Ser | Met | Ser  | Lys | Ala | Leu | Gln | Lys | Gly  | Ala | Trp |
| 865 |     |     |     |     | 870 |     |      |     |     | 875 |     |     |      |     | 880 |
| Lys | Asp | Ile | Asn | Glu | Gly | Gln | Ser  | Asp | Lys | Glu | Val | Glu | Asn  | Glu | Phe |
|     |     |     |     | 885 |     |     |      |     | 890 |     |     |     |      | 895 |     |
| Leu | Thr | Ile | Ser | Gln | Ala | His | Lys  | Gln | Asn | Arg | Asp | Ser | Tyr  | Gly | Tyr |
|     |     |     | 900 |     |     |     |      | 905 |     |     |     |     | 910  |     |     |
| Met | Leu | Ile | Pro | Asn | Val | Asp | Arg  | Ala | Thr | Phe | Asn | Gln | Met  | Ile | Lys |
|     | 915 |     |     |     |     |     | 920  |     |     |     |     |     | 925  |     |     |
| Glu | Leu | Glu | Ser | Ser | Leu | Ile | Glu  | Asn | Asn | Glu | Thr | Leu | Gln  | Ser | Val |
|     | 930 |     |     |     |     | 935 |      |     |     |     |     | 940 |      |     |     |
| Tyr | Asp | Ala | Lys | Gln | Gly | Val | Trp  | Gly | Ile | Val | Lys | Tyr | Asp  | Asp | Ser |
| 945 |     |     |     |     | 950 |     |      |     |     | 955 |     |     |      |     | 960 |
| Val | Ser | Thr | Ile | Ser | Asn | Gln | Phe  | Gln | Val | Leu | Lys | Arg | Gly  | Val | Tyr |
|     |     |     |     | 965 |     |     |      |     | 970 |     |     |     |      | 975 |     |
| Thr | Ile | Arg | Lys | Glu | Gly | Asp | Glu  | Tyr | Lys | Ile | Ala | Tyr | Tyr  | Asn | Pro |
|     |     |     | 980 |     |     |     |      | 985 |     |     |     |     | 990  |     |     |
| Glu | Thr | Gln | Glu | Ser | Ala | Pro | Asp  | Gln | Glu | Val | Phe | Lys | Lys  | Leu | Glu |
|     |     |     | 995 |     |     |     | 1000 |     |     |     |     |     | 1005 |     |     |

ES 2 531 630 T3

Gln Ala Ala Gln Pro Gln Val Gln Asn Ser Lys Glu Lys Glu Lys Ser  
 1010 1015 1020  
 Glu Glu Glu Lys Asn His Ser Asp Gln Lys Asn Leu Pro Gln Thr Gly  
 1025 1030 1035 1040  
 Glu Gly Gln Ser Ile Leu Ala Ser Leu Gly Phe Leu Leu Leu Gly Ala  
 1045 1050 1055  
 Phe Tyr Leu Phe Arg Arg Gly Lys Asn Asn  
 1060 1065

<210> 83  
 <211> 1078  
 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus pneumoniae* (cepa ATCC BAA-255/R6)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

<400> 83

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |
| Asp | Ser | Lys | Asn | Glu | Gln | Met | Ala | Lys | Leu | Asn | Gln | Glu | Leu | Glu |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |
| Lys | Val | Ala | Asp | Ser | Leu | Ser | Ser | Ile | Ser | Ser | Gln | Ala | Asp | Arg |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 | Ile |
| Tyr | Leu | Trp | Glu | Lys | Phe | Ser | Asn | Tyr | Lys | Thr | Ser | Ala | Asn | Leu |
|     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     | Thr |
| Ala | Thr | Tyr | Arg | Lys | Leu | Glu | Glu | Met | Ala | Lys | Gln | Val | Thr | Asn |
|     |     |     | 370 |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     | Pro |
| Ser | Ser | Arg | Tyr | Tyr | Gln | Asp | Glu | Thr | Val | Val | Arg | Thr | Val | Arg |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     | 400 |
| Ser | Met | Glu | Trp | Met | His | Lys | His | Val | Tyr | Asn | Ser | Glu | Lys | Ser |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |
| Val | Gly | Asn | Trp | Trp | Asp | Tyr | Glu | Ile | Gly | Thr | Pro | Arg | Ala | Ile |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 | Asn |
| Asn | Thr | Leu | Ser | Leu | Met | Lys | Glu | Tyr | Phe | Ser | Asp | Glu | Glu | Ile |
|     |     |     | 435 |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     | Lys |
| Lys | Tyr | Thr | Asp | Val | Ile | Glu | Lys | Phe | Val | Pro | Asp | Pro | Glu | His |
|     |     |     | 450 |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     | Phe |
| Arg | Lys | Thr | Thr | Asp | Asn | Pro | Phe | Lys | Ala | Leu | Gly | Gly | Asn | Leu |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     | 480 |
| Asp | Met | Gly | Arg | Val | Lys | Val | Ile | Ala | Gly | Leu | Leu | Arg | Lys | Asp |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     | 490 |     |     |     |     |     | 495 |
| Gln | Glu | Ile | Ser | Ser | Thr | Ile | Arg | Ser | Ile | Glu | Gln | Val | Phe | Lys |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 | Leu |
| Val | Asp | Gln | Gly | Glu | Gly | Phe | Tyr | Gln | Asp | Gly | Ser | Tyr | Ile | Asp |
|     |     |     | 515 |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     | His |
| Thr | Asn | Val | Ala | Tyr | Thr | Gly | Ala | Tyr | Gly | Asn | Val | Leu | Ile | Asp |
|     |     |     | 530 |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     | Gly |
| Leu | Ser | Gln | Leu | Leu | Pro | Val | Ile | Gln | Lys | Thr | Lys | Asn | Pro | Ile |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     | 560 |
| Lys | Asp | Lys | Met | Gln | Thr | Met | Tyr | His | Trp | Ile | Asp | Lys | Ser | Phe |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     | 570 |     |     |     |     |     | 575 |
| Pro | Leu | Leu | Val | Asn | Gly | Glu | Leu | Met | Asp | Met | Ser | Arg | Gly | Arg |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 | Ser |
| Ile | Ser | Arg | Ala | Asn | Ser | Glu | Gly | His | Val | Ala | Ala | Val | Glu | Val |
|     |     |     | 595 |     |     | 600 |     |     |     |     |     | 605 |     | Leu |
| Arg | Gly | Ile | His | Arg | Ile | Ala | Asp | Met | Ser | Glu | Gly | Glu | Thr | Lys |
|     |     |     | 610 |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     | Gln |
| Arg | Leu | Gln | Ser | Leu | Val | Lys | Thr | Ile | Val | Gln | Ser | Asp | Ser | Tyr |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     | Tyr |
| Asp | Val | Phe | Lys | Asn | Leu | Lys | Thr | Tyr | Lys | Asp | Ile | Ser | Leu | Met |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | Gln |
| Ser | Leu | Leu | Ser | Asp | Ala | Gly | Val | Ala | Ser | Val | Pro | Arg | Thr | Ser |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 | Tyr |
| Leu | Ser | Ala | Phe | Asn | Lys | Met | Asp | Lys | Thr | Ala | Met | Tyr | Asn | Ala |
|     |     |     | 675 |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     | Glu |
| Lys | Gly | Phe | Gly | Phe | Gly | Leu | Ser | Leu | Phe | Ser | Ser | Arg | Thr | Leu |
|     |     |     | 690 |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     | Asn |
| Tyr | Glu | His | Met | Asn | Lys | Glu | Asn | Lys | Arg | Gly | Trp | Tyr | Thr | Ser |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     | Asp |
| Gly | Met | Phe | Tyr | Leu | Tyr | Asn | Gly | Asp | Leu | Ser | His | Tyr | Ser | Asp |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | Gly |
| Tyr | Trp | Pro | Thr | Val | Asn | Pro | Tyr | Lys | Met | Pro | Gly | Thr | Thr | Glu |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 | Thr |
| Asp | Ala | Lys | Arg | Ala | Asp | Ser | Asp | Thr | Gly | Lys | Val | Leu | Pro | Ser |
|     |     |     | 755 |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     | Ala |
| Phe | Val | Gly | Thr | Ser | Lys | Leu | Asp | Asp | Ala | Asn | Ala | Thr | Ala | Thr |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Met |



```

      770              775              780
Asp Phe Thr Asn Trp Asn Gln Thr Leu Thr Ala His Lys Ser Trp Phe
785              790              795              800
Met Leu Lys Asp Lys Ile Ala Phe Leu Gly Ser Asn Ile Gln Asn Thr
      805              810              815
Ser Thr Asp Thr Ala Ala Thr Thr Ile Asp Gln Arg Lys Leu Glu Ser
      820              825              830
Ser Asn Pro Tyr Lys Val Tyr Val Asn Asp Lys Glu Ala Ser Leu Thr
      835              840              845
Glu Gln Glu Lys Asp Tyr Pro Glu Thr Gln Ser Val Phe Leu Glu Ser
      850              855              860
Ser Asp Ser Lys Lys Asn Ile Gly Tyr Phe Phe Phe Lys Lys Ser Ser
865              870              875              880
Ile Ser Met Ser Lys Ala Leu Gln Lys Gly Ala Trp Lys Asp Ile Asn
      885              890              895
Glu Gly Gln Ser Asp Lys Glu Val Glu Asn Glu Phe Leu Thr Ile Ser
      900              905              910
Gln Ala His Lys Gln Asn Gly Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Leu Ile Pro
      915              920              925
Asn Val Asp Arg Ala Thr Phe Asn Gln Met Ile Lys Glu Leu Glu Ser
      930              935              940
Ser Leu Ile Glu Asn Asn Glu Thr Leu Gln Ser Val Tyr Asp Ala Lys
945              950              955              960
Gln Gly Val Trp Gly Ile Val Lys Tyr Asp Asp Ser Val Ser Thr Ile
      965              970              975
Ser Asn Gln Phe Gln Val Leu Lys Arg Gly Val Tyr Thr Ile Arg Lys
      980              985              990

Glu Gly Asp Glu Tyr Lys Ile Ala Tyr Tyr Asn Pro Glu Thr Gln Glu
      995              1000              1005
Ser Ala Pro Asp Gln Glu Val Phe Lys Lys Leu Glu Gln Ala Ala Gln
      1010              1015              1020
Pro Gln Val Gln Asn Ser Lys Glu Lys Glu Lys Ser Glu Glu Glu Lys
1025              1030              1035              1040
Asn His Ser Asp Gln Lys Asn Leu Pro Gln Thr Gly Glu Gly Gln Ser
      1045              1050              1055
Ile Leu Ala Ser Leu Gly Phe Leu Leu Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Phe
      1060              1065              1070
Arg Arg Gly Lys Asn Asn
      1075

```

<210> 84  
 <211> 1067  
 5 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus pneumoniae* serotipo 2 (cepa D39/NCTC 7466)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 84

```

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

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Glu | Asp | Gly | Ser | Ser | Pro | Trp | Thr | Gly | Ser | Lys | Ala | Gln | Gly | Trp | Ser |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ala | Trp | Val | Asp | Gln | Lys | Asn | Ser | Ser | Ala | Asp | Ala | Ser | Thr | Arg | Val |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ile | Glu | Ala | Lys | Asp | Gly | Ala | Ile | Thr | Ile | Ser | Ser | Pro | Glu | Lys | Leu |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Arg | Ala | Ala | Val | His | Arg | Met | Val | Pro | Ile | Glu | Ala | Lys | Lys | Lys | Tyr |
|     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |
| Lys | Leu | Arg | Phe | Lys | Ile | Lys | Thr | Asp | Asn | Lys | Val | Gly | Ile | Ala | Lys |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Val | Arg | Ile | Ile | Glu | Glu | Ser | Gly | Lys | Asp | Lys | Arg | Leu | Trp | Asn | Ser |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ala | Thr | Thr | Ser | Gly | Thr | Lys | Asp | Trp | Gln | Thr | Ile | Glu | Ala | Asp | Tyr |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Ser | Pro | Thr | Leu | Asp | Val | Asp | Lys | Ile | Lys | Leu | Glu | Leu | Phe | Tyr | Glu |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Thr | Gly | Thr | Gly | Thr | Val | Ser | Phe | Lys | Asp | Ile | Glu | Leu | Val | Glu | Val |
|     |     |     |     | 195 |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |
| Ala | Asp | Gln | Pro | Ser | Glu | Asp | Ser | Gln | Thr | Asp | Lys | Gln | Leu | Glu | Glu |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Lys | Ile | Asp | Leu | Pro | Ile | Gly | Lys | Lys | His | Val | Phe | Ser | Leu | Ala | Asp |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Tyr | Thr | Tyr | Lys | Val | Glu | Asn | Pro | Asp | Val | Ala | Ser | Val | Lys | Asn | Gly |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ile | Leu | Glu | Pro | Leu | Lys | Glu | Gly | Thr | Thr | Asn | Val | Ile | Val | Ser | Lys |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Asp | Gly | Lys | Glu | Val | Lys | Lys | Ile | Pro | Leu | Lys | Ile | Leu | Ala | Ser | Val |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Lys | Asp | Thr | Tyr | Thr | Asp | Arg | Leu | Asp | Asp | Trp | Asn | Gly | Ile | Ile | Ala |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Gly | Asn | Gln | Tyr | Tyr | Asp | Ser | Lys | Asn | Glu | Gln | Met | Ala | Lys | Leu | Asn |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Gln | Glu | Leu | Glu | Gly | Lys | Val | Ala | Asp | Ser | Leu | Ser | Ser | Ile | Ser | Ser |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Gln | Ala | Asp | Arg | Ile | Tyr | Leu | Trp | Glu | Lys | Phe | Ser | Asn | Tyr | Lys | Thr |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Ser | Ala | Asn | Leu | Thr | Ala | Thr | Tyr | Arg | Lys | Leu | Glu | Glu | Met | Ala | Lys |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     | 365 |     |     |
| Gln | Val | Thr | Asn | Pro | Ser | Ser | Arg | Tyr | Tyr | Gln | Asp | Glu | Thr | Val | Val |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Arg | Thr | Val | Arg | Asp | Ser | Met | Glu | Trp | Met | His | Lys | His | Val | Tyr | Asn |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Ser | Glu | Lys | Ser | Ile | Val | Gly | Asn | Trp | Trp | Asp | Tyr | Glu | Ile | Gly | Thr |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Pro | Arg | Ala | Ile | Asn | Asn | Thr | Leu | Ser | Leu | Met | Lys | Glu | Tyr | Phe | Ser |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Asp | Glu | Glu | Ile | Lys | Lys | Tyr | Thr | Asp | Val | Ile | Glu | Lys | Phe | Val | Pro |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Asp | Pro | Glu | His | Phe | Arg | Lys | Thr | Thr | Asp | Asn | Pro | Phe | Lys | Ala | Leu |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Gly | Gly | Asn | Leu | Val | Asp | Met | Gly | Arg | Val | Lys | Val | Ile | Ala | Gly | Leu |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Leu | Arg | Lys | Asp | Asp | Gln | Glu | Ile | Ser | Ser | Thr | Ile | Arg | Ser | Ile | Glu |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Gln | Val | Phe | Lys | Leu | Val | Asp | Gln | Gly | Glu | Gly | Phe | Tyr | Gln | Asp | Gly |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Ser | Tyr | Ile | Asp | His | Thr | Asn | Val | Ala | Tyr | Thr | Gly | Ala | Tyr | Gly | Asn |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |     |
| Val | Leu | Ile | Asp | Gly | Leu | Ser | Gln | Leu | Leu | Pro | Val | Ile | Gln | Lys | Thr |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Lys | Asn | Pro | Ile | Asp | Lys | Asp | Lys | Met | Gln | Thr | Met | Tyr | His | Trp | Ile |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     | 560 |     |
| Asp | Lys | Ser | Phe | Ala | Pro | Leu | Leu | Val | Asn | Gly | Glu | Leu | Met | Asp | Met |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Ser | Arg | Gly | Arg | Ser | Ile | Ser | Arg | Ala | Asn | Ser | Glu | Gly | His | Val | Ala |
|     |     |     |     | 580 |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Ala | Val | Glu | Val | Leu | Arg | Gly | Ile | His | Arg | Ile | Ala | Asp | Met | Ser | Glu |
|     |     | 595 |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |     |
| Gly | Glu | Thr | Lys | Gln | Arg | Leu | Gln | Ser | Leu | Val | Lys | Thr | Ile | Val | Gln |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Ser | Asp | Ser | Tyr | Tyr | Asp | Val | Phe | Lys | Asn | Leu | Lys | Thr | Tyr | Lys | Asp |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     | 640 |     |
| Ile | Ser | Leu | Met | Gln | Ser | Leu | Leu | Ser | Asp | Ala | Gly | Val | Ala | Ser | Val |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Pro | Arg | Thr | Ser | Tyr | Leu | Ser | Ala | Phe | Asn | Lys | Met | Asp | Lys | Thr | Ala |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Met | Tyr | Asn | Ala | Glu | Lys | Gly | Phe | Gly | Phe | Gly | Leu | Ser | Leu | Phe | Ser |
|     |     | 675 |     |     |     | 680 |     |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Ser | Arg | Thr | Leu | Asn | Tyr | Glu | His | Met | Asn | Lys | Glu | Asn | Lys | Arg | Gly |
|     | 690 |     |     |     | 695 |     |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| Trp | Tyr | Thr | Ser | Asp | Gly | Met | Phe | Tyr | Leu | Tyr | Asn | Gly | Asp | Leu | Ser |
| 705 |     |     |     | 710 |     |     |     |     |     | 715 |     |     |     | 720 |     |
| His | Tyr | Ser | Asp | Gly | Tyr | Trp | Pro | Thr | Val | Asn | Pro | Tyr | Lys | Met | Pro |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |
| Gly | Thr | Thr | Glu | Thr | Asp | Ala | Lys | Arg | Ala | Asp | Ser | Asp | Thr | Gly | Lys |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |
| Val | Leu | Pro | Ser | Ala | Phe | Val | Gly | Thr | Ser | Lys | Leu | Asp | Asp | Ala | Asn |
|     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     |     | 765 |     |     |     |
| Ala | Thr | Ala | Thr | Met | Asp | Phe | Thr | Asn | Trp | Asn | Gln | Thr | Leu | Thr | Ala |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |
| His | Lys | Ser | Trp | Phe | Met | Leu | Lys | Asp | Lys | Ile | Ala | Phe | Leu | Gly | Ser |
| 785 |     |     |     | 790 |     |     |     |     |     | 795 |     |     |     | 800 |     |
| Asn | Ile | Gln | Asn | Thr | Ser | Thr | Asp | Thr | Ala | Ala | Thr | Thr | Ile | Asp | Gln |
|     |     |     | 805 |     |     |     |     |     | 810 |     |     |     |     | 815 |     |
| Arg | Lys | Leu | Glu | Ser | Ser | Asn | Pro | Tyr | Lys | Val | Tyr | Val | Asn | Asp | Lys |
|     |     |     | 820 |     |     |     |     |     | 825 |     |     |     | 830 |     |     |
| Glu | Ala | Ser | Leu | Thr | Glu | Gln | Glu | Lys | Asp | Tyr | Pro | Glu | Thr | Gln | Ser |
|     | 835 |     |     |     |     | 840 |     |     |     |     |     | 845 |     |     |     |
| Val | Phe | Leu | Glu | Ser | Ser | Asp | Ser | Lys | Lys | Asn | Ile | Gly | Tyr | Phe | Phe |
|     | 850 |     |     |     | 855 |     |     |     |     |     | 860 |     |     |     |     |
| Phe | Lys | Lys | Ser | Ser | Ile | Ser | Met | Ser | Lys | Ala | Leu | Gln | Lys | Gly | Ala |
| 865 |     |     |     |     | 870 |     |     |     |     | 875 |     |     |     | 880 |     |
| Trp | Lys | Asp | Ile | Asn | Glu | Gly | Gln | Ser | Asp | Lys | Glu | Val | Glu | Asn | Glu |
|     |     |     |     | 885 |     |     |     |     | 890 |     |     |     |     | 895 |     |
| Phe | Leu | Thr | Ile | Ser | Gln | Ala | His | Lys | Gln | Asn | Gly | Asp | Ser | Tyr | Gly |
|     |     |     | 900 |     |     |     |     | 905 |     |     |     |     | 910 |     |     |
| Tyr | Met | Leu | Ile | Pro | Asn | Val | Asp | Arg | Ala | Thr | Phe | Asn | Gln | Met | Ile |
|     | 915 |     |     |     |     |     | 920 |     |     |     |     |     | 925 |     |     |
| Lys | Glu | Leu | Glu | Ser | Ser | Leu | Ile | Glu | Asn | Asn | Glu | Thr | Leu | Gln | Ser |
|     | 930 |     |     |     |     | 935 |     |     |     |     |     | 940 |     |     |     |
| Val | Tyr | Asp | Ala | Lys | Gln | Gly | Val | Trp | Gly | Ile | Val | Lys | Tyr | Asp | Asp |
| 945 |     |     |     |     | 950 |     |     |     |     | 955 |     |     |     | 960 |     |
| Ser | Val | Ser | Thr | Ile | Ser | Asn | Gln | Phe | Gln | Val | Leu | Lys | Arg | Gly | Val |
|     |     |     |     | 965 |     |     |     |     | 970 |     |     |     |     | 975 |     |
| Tyr | Thr | Ile | Arg | Lys | Glu | Gly | Asp | Glu | Tyr | Lys | Ile | Ala | Tyr | Tyr | Asn |

ES 2 531 630 T3

```

          980          985          990
Pro Glu Thr Gln Glu Ser Ala Pro Asp Gln Glu Val Phe Lys Lys Leu
          995          1000          1005
Glu Gln Ala Ala Gln Pro Gln Val Gln Asn Ser Lys Glu Lys Glu Lys
          1010          1015          1020
Ser Glu Glu Glu Lys Asn His Ser Asp Gln Lys Asn Leu Pro Gln Thr
1025          1030          1035          1040
Gly Glu Gly Gln Ser Ile Leu Ala Ser Leu Gly Phe Leu Leu Leu Gly
          1045          1050          1055
Ala Phe Tyr Leu Phe Arg Arg Gly Lys Asn Asn
          1060          1065

```

<210> 85  
 <211> 805  
 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M1

<220>  
 <223> hialuronano liasa

<400> 85

```

Met Asn Thr Tyr Phe Cys Thr His His Lys Gln Leu Leu Leu Tyr Ser
 1          5          10
Asn Leu Phe Leu Ser Phe Ala Met Met Gly Gln Gly Thr Ala Ile Tyr
          20          25          30
Ala Asp Thr Leu Thr Ser Asn Ser Glu Pro Asn Asn Thr Tyr Phe Gln
          35          40          45
Thr Gln Thr Leu Thr Thr Thr Asp Ser Glu Lys Lys Val Val Gln Pro
          50          55          60

Gln Gln Lys Asp Tyr Tyr Thr Glu Leu Leu Asp Gln Trp Asn Ser Ile
65          70          75
Ile Ala Gly Asn Asp Ala Tyr Asp Lys Thr Asn Pro Asp Met Val Thr
          85          90          95
Phe His Asn Lys Ala Glu Lys Asp Ala Gln Asn Ile Ile Lys Ser Tyr
          100          105          110
Gln Gly Pro Asp His Glu Asn Arg Thr Tyr Leu Trp Glu His Ala Lys
          115          120          125
Asp Tyr Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Lys Thr Tyr Arg Asn Ile Glu
          130          135          140
Lys Ile Ala Lys Gln Ile Thr Asn Pro Glu Ser Cys Tyr Tyr Gln Asp
145          150          155
Ser Lys Ala Ile Ala Ile Val Lys Asp Gly Met Ala Phe Met Tyr Glu
          165          170          175
His Ala Tyr Asn Leu Asp Arg Glu Asn His Gln Thr Thr Gly Lys Glu
          180          185          190
Asn Lys Glu Asn Trp Trp Val Tyr Glu Ile Gly Thr Pro Arg Ala Ile
          195          200          205
Asn Asn Thr Leu Ser Leu Met Tyr Pro Tyr Phe Thr Gln Glu Glu Ile
          210          215          220
Leu Lys Tyr Thr Ala Pro Ile Glu Lys Phe Val Pro Asp Pro Thr Arg
225          230          235
Phe Arg Val Arg Ala Ala Asn Phe Ser Pro Phe Glu Ala Asn Ser Gly
          245          250          255
Asn Leu Ile Asp Met Gly Arg Val Lys Leu Ile Ser Gly Ile Leu Arg
          260          265          270
Lys Asp Asp Leu Glu Ile Ser Asp Thr Ile Lys Ala Ile Glu Lys Val

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Phe | Thr | Leu | Val | Asp | Glu | Gly | Asn | Gly | Phe | Tyr | Gln | Asp | Gly | Ser | Leu |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Ile | Asp | His | Val | Val | Thr | Asn | Ala | Gln | Ser | Pro | Leu | Tyr | Lys | Lys | Gly |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Ile | Ala | Tyr | Thr | Gly | Ala | Tyr | Gly | Asn | Val | Leu | Ile | Asp | Gly | Leu | Ser |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Gln | Leu | Ile | Pro | Ile | Ile | Gln | Lys | Thr | Lys | Ser | Pro | Ile | Lys | Ala | Asp |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Lys | Met | Ala | Thr | Ile | Tyr | His | Trp | Ile | Asn | His | Ser | Phe | Phe | Pro | Ile |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Ile | Val | Arg | Gly | Glu | Met | Met | Asp | Met | Thr | Arg | Gly | Arg | Ser | Ile | Ser |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Arg | Phe | Asn | Ala | Gln | Ser | His | Val | Ala | Gly | Ile | Glu | Ala | Leu | Arg | Ala |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Ile | Leu | Arg | Ile | Ala | Asp | Met | Ser | Glu | Glu | Pro | His | Arg | Leu | Ala | Leu |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Lys | Thr | Arg | Ile | Lys | Thr | Leu | Val | Thr | Gln | Gly | Asn | Ala | Phe | Tyr | Asn |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Val | Tyr | Asp | Asn | Leu | Lys | Thr | Tyr | His | Asp | Ile | Lys | Leu | Met | Lys | Glu |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Leu | Leu | Ser | Asp | Thr | Ser | Val | Pro | Val | Gln | Lys | Leu | Asp | Ser | Tyr | Val |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Ala | Ser | Phe | Asn | Ser | Met | Asp | Lys | Leu | Ala | Leu | Tyr | Asn | Asn | Lys | His |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Asp | Phe | Ala | Phe | Gly | Leu | Ser | Met | Phe | Ser | Asn | Arg | Thr | Gln | Asn | Tyr |
|     |     |     | 485 |     |     |     |     |     |     | 490 |     |     |     | 495 |     |
| Glu | Ala | Met | Asn | Asn | Glu | Asn | Leu | His | Gly | Trp | Phe | Thr | Ser | Asp | Gly |
|     |     | 500 |     |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Met | Phe | Tyr | Leu | Tyr | Asn | Asn | Asp | Leu | Gly | His | Tyr | Ser | Glu | Asn | Tyr |
|     | 515 |     |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Trp | Ala | Thr | Val | Asn | Pro | Tyr | Arg | Leu | Pro | Gly | Thr | Thr | Glu | Thr | Glu |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Gln | Lys | Pro | Leu | Glu | Gly | Thr | Pro | Glu | Asn | Ile | Lys | Thr | Asn | Tyr | Gln |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Gln | Val | Gly | Met | Thr | Gly | Leu | Ser | Asp | Asp | Ala | Phe | Val | Ala | Ser | Lys |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Lys | Leu | Asn | Asn | Thr | Ser | Ala | Leu | Ala | Ala | Met | Thr | Phe | Thr | Asn | Trp |
|     |     | 580 |     |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Asn | Lys | Ser | Leu | Thr | Leu | Asn | Lys | Gly | Trp | Phe | Ile | Leu | Gly | Asn | Lys |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Ile | Ile | Phe | Val | Gly | Ser | Asn | Ile | Lys | Asn | Gln | Ser | Ser | His | Lys | Ala |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Tyr | Thr | Thr | Ile | Glu | Gln | Arg | Lys | Glu | Asn | Gln | Lys | Tyr | Pro | Tyr | Cys |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Ser | Tyr | Val | Asn | Asn | Gln | Pro | Val | Asp | Leu | Asn | Asn | Gln | Leu | Val | Asp |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Phe | Thr | Asn | Thr | Lys | Ser | Ile | Phe | Leu | Glu | Ser | Asp | Asp | Pro | Ala | Gln |
|     |     | 660 |     |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Asn | Ile | Gly | Tyr | Tyr | Phe | Phe | Lys | Pro | Thr | Thr | Leu | Ser | Ile | Ser | Lys |
|     | 675 |     |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Ala | Leu | Gln | Thr | Gly | Lys | Trp | Gln | Asn | Ile | Lys | Ala | Asp | Asp | Lys | Ser |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| Pro | Glu | Ala | Ile | Lys | Glu | Val | Ser | Asn | Thr | Phe | Ile | Thr | Ile | Met | Gln |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |
| Asn | His | Thr | Gln | Asp | Gly | Asp | Arg | Tyr | Ala | Tyr | Met | Met | Leu | Pro | Asn |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |

ES 2 531 630 T3

```

Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr Ile Ser Lys Leu Asp Ile Asp
      740      745      750
Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala Ala Val Tyr Asp His Asp Ser
      755      760      765
Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Gly Lys Lys Ala Thr Met Phe Ser
      770      775      780
Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe Tyr Ser Phe Pro His Pro Val
      785      790      795      800
Arg Gln Asn Gln Gln
      805

```

<210> 86

<211> 780

5 <212> PRT

<213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M2 (cepa MGAS10270)

<220>

<223> hialuronano liasa

10

<400> 86

```

Met Val Tyr Phe Tyr Leu Val Asn Gln Ser Thr Phe Ile Ile Ser Phe
  1      5      10
Leu Tyr Trp Arg Asn Val Ser Val Asn Thr Tyr Phe Cys Thr His His
      20      25
Lys Gln Leu Leu Tyr Ser Asn Leu Phe Leu Ser Phe Ala Met Ile
      35      40      45
Gly Gln Gly Thr Ala Ile Tyr Ala Asp Thr Leu Thr Ser Asn Ser Glu
      50      55      60
Pro Asn Asn Thr Tyr Phe Gln Thr Gln Thr Leu Thr Thr Thr Asp Ser
      65      70      75
Glu Lys Lys Val Val Gln Pro Gln Gln Lys Asp Tyr Tyr Thr Glu Leu
      85      90      95
Leu Asp Gln Trp Asn Ser Ile Ile Ala Gly Asn Asp Ala Tyr Asp Lys
      100      105      110
Thr Asn Pro Asp Met Val Thr Phe His Asn Lys Ala Glu Lys Asp Ala
      115      120      125

Gln Asn Ile Ile Lys Ser Tyr Gln Gly Pro Asp His Glu Asn Arg Thr
      130      135      140
Tyr Leu Trp Glu His Ala Lys Asp Tyr Ser Ala Ser Thr Asn Ile Thr
      145      150      155      160
Lys Thr Tyr Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ala Lys Gln Ile Thr Asn Pro
      165      170      175
Glu Ser Cys Tyr Tyr Gln Asp Ser Lys Ala Ile Ala Ile Val Lys Asp
      180      185      190
Gly Met Ala Phe Met Tyr Glu His Ala Tyr Asn Leu Asn Arg Glu Asn
      195      200      205
His Gln Thr Thr Gly Lys Glu Asn Lys Glu Asn Trp Trp Val Tyr Glu
      210      215      220
Ile Gly Thr Pro Arg Ala Ile Asn Asn Thr Leu Ser Leu Met Tyr Pro
      225      230      235
Tyr Phe Thr Gln Glu Ile Leu Lys Tyr Thr Ala Pro Ile Glu Lys
      245      250      255
Phe Val Pro Asp Pro Thr Arg Phe Arg Val Arg Ala Ala Asn Phe Ser
      260      265      270
Pro Phe Glu Ala Asn Ser Gly Asn Leu Ile Asp Met Gly Arg Val Lys
      275      280      285

```

ES 2 531 630 T3

Leu Ile Ser Gly Ile Leu Arg Lys Asp Asp Leu Glu Ile Ser Asp Thr  
 290 295 300  
 Ile Lys Ala Ile Glu Lys Val Phe Thr Leu Val Asp Glu Gly Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Phe Tyr Gln Asp Gly Ser Leu Ile Asp His Val Val Thr Asn Thr Gln  
 325 330 335  
 Ser Pro Leu Tyr Lys Lys Gly Ile Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn  
 340 345 350  
 Val Leu Ile Asp Gly Leu Ser Gln Leu Ile Pro Ile Ile Gln Lys Thr  
 355 360 365  
 Lys Ser Pro Ile Glu Ala Asp Lys Met Ala Thr Ile Tyr His Trp Ile  
 370 375 380  
 Asn His Ser Phe Phe Pro Ile Ile Val Arg Gly Glu Met Met Asp Met  
 385 390 395 400  
 Thr Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Phe Asn Ala Gln Ser His Val Ala  
 405 410 415  
 Gly Ile Glu Ala Leu Arg Ala Ile Leu Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu  
 420 425 430  
 Glu Pro His Arg Leu Glu Leu Lys Thr Arg Ile Lys Thr Leu Val Thr  
 435 440 445  
 Gln Gly Asn Ala Phe Tyr Asn Val Tyr Asp Asn Leu Lys Thr Tyr His  
 450 455 460  
 Asp Ile Lys Leu Met Lys Glu Leu Leu Ser Asp Thr Ser Val Pro Val  
 465 470 475 480  
 Gln Lys Leu Asp Ser Tyr Val Ala Ser Phe Asn Ser Met Asp Lys Leu  
 485 490 495  
 Ala Leu Tyr Asn Asn Lys His Asp Phe Ala Phe Gly Leu Ser Met Phe  
 500 505 510  
 Ser Asn Arg Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Met Asn Asn Glu Asn Leu His  
 515 520 525  
 Gly Trp Phe Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Asn Asp Leu  
 530 535 540  
 Gly His Tyr Ser Glu Asn Tyr Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu  
 545 550 555 560  
 Pro Gly Thr Thr Glu Thr Glu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu  
 565 570 575  
 Asn Ile Lys Thr Asn Tyr Gln Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp  
 580 585 590  
 Asp Ala Phe Val Ala Ser Lys Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala  
 595 600 605  
 Ala Met Thr Phe Thr Asn Trp Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly  
 610 615 620  
 Trp Phe Ile Leu Gly Asn Lys Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys  
 625 630 635 640  
 Asn Gln Ser Ser His Lys Ala Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu  
 645 650 655  
 Asn Gln Lys His Pro Tyr Cys Ser Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp  
 660 665 670  
 Leu Asn Asn Gln Leu Val Asp Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu  
 675 680 685  
 Glu Ser Asp Asp Pro Ala Gln Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro  
 690 695 700  
 Arg Thr Leu Ser Ile Ser Lys Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn  
 705 710 715 720  
 Ile Lys Ala Asp Asp Lys Ser Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn  
 725 730 735  
 Thr Phe Ile Thr Ile Met Gln Asn His Thr Gln Glu Gly Asp Arg Tyr  
 740 745 750  
  
 Ala Tyr Met Met Leu Pro Asn Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr  
 755 760 765  
 Ile Ser Lys Leu Asp Ile Asp Leu Leu Glu Asn Asn  
 770 775 780

ES 2 531 630 T3

<211> 868  
 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M4 (cepa MGAS10750)

5 <220>  
 <223> hialuronano liasa

<400> 87

```

Met Asn Thr Tyr Phe Cys Thr His His Lys Gln Leu Leu Leu Tyr Ser
 1          5          10          15
Asn Leu Phe Leu Ser Phe Ala Met Met Gly Gln Gly Thr Ala Ile Tyr
 20          25          30
Ala Asp Thr Leu Thr Ser Asn Ser Lys Pro Asn Asn Thr Tyr Phe Gln
 35          40          45
Thr Gln Thr Leu Thr Thr Thr Asp Ser Glu Lys Lys Val Val Gln Pro
 50          55          60
Gln Gln Lys Asp Tyr Tyr Thr Glu Leu Leu Asp Gln Trp Asn Ser Ile
 65          70          75          80
Ile Ala Gly Asn Asp Ala Tyr Asp Lys Thr Asn Pro Asp Met Val Thr
 85          90          95
Phe His Asn Lys Ala Glu Lys Asp Ala Gln Asn Ile Ile Lys Ser Tyr
100          105          110
Gln Glu Pro Asp His Glu Asn Arg Thr Tyr Leu Trp Glu His Ala Lys
115          120          125
Asp Tyr Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Lys Thr Tyr Arg Asn Ile Glu
130          135          140
Lys Ile Ala Lys Gln Ile Thr Asn Pro Glu Ser Cys Tyr Tyr Gln Asp
145          150          155          160
Ser Lys Ala Ile Ala Ile Val Lys Asp Gly Met Ala Phe Met Tyr Glu
165          170          175
His Ala Tyr Asn Leu Asp Arg Glu Asn His Gln Thr Thr Gly Lys Glu
180          185          190
Asn Lys Glu Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr Pro Arg Ala Ile
195          200          205
Asn Asn Thr Leu Ser Leu Met Tyr Pro Tyr Phe Thr Gln Glu Glu Ile
210          215          220
Leu Lys Tyr Thr Ala Pro Ile Glu Lys Phe Val Pro Asp Pro Thr Arg
225          230          235          240
Phe Arg Val Arg Ala Ala Asn Phe Pro Pro Phe Glu Ala Asn Ser Gly
245          250          255
Asn Leu Ile Asp Met Gly Arg Val Lys Leu Ile Ser Gly Ile Leu Arg
260          265          270
Lys Asp Asp Leu Glu Ile Ser Asp Thr Ile Lys Ala Ile Glu Lys Val
275          280          285
Phe Thr Leu Val Asp Glu Gly Asn Gly Phe Tyr Gln Asp Gly Ser Leu
290          295          300
Ile Asp His Val Val Thr Asn Ala Gln Ser Pro Leu Tyr Lys Lys Gly
305          310          315          320
Ile Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val Leu Ile Asp Gly Leu Ser
325          330          335
Gln Leu Ile Pro Ile Ile Gln Lys Thr Lys Ser Pro Ile Glu Ala Asp
    
```

10



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     | 340 |     |     |     |     |     | 345 |     |     | 350 |     |     |     |     |
| Lys | Met | Ala | Thr | Ile | Tyr | His | Trp | Ile | Asn | His | Ser | Phe | Phe | Pro | Ile |
|     |     | 355 |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Ile | Val | Arg | Gly | Glu | Met | Met | Asp | Met | Thr | Arg | Gly | Arg | Ser | Ile | Ser |
|     |     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Arg | Phe | Asn | Ala | Gln | Ser | His | Val | Ala | Gly | Ile | Glu | Ala | Leu | Arg | Ala |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Ile | Leu | Arg | Ile | Ala | Asp | Met | Ser | Glu | Glu | Pro | His | Arg | Leu | Ala | Leu |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Lys | Thr | Arg | Ile | Lys | Thr | Leu | Val | Thr | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Tyr | Asn |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Val | Tyr | Asp | Asn | Leu | Lys | Thr | Tyr | His | Asp | Ile | Lys | Leu | Met | Lys | Glu |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Leu | Leu | Ser | Asp | Thr | Ser | Val | Pro | Val | Gln | Lys | Leu | Asp | Ser | Tyr | Val |
|     |     | 450 |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Ala | Ser | Phe | Asn | Ser | Met | Asp | Lys | Leu | Ala | Leu | Tyr | Asn | Asn | Lys | His |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Asp | Phe | Ala | Phe | Gly | Leu | Ser | Met | Phe | Ser | Asn | Arg | Thr | Gln | Asn | Tyr |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Glu | Ala | Met | Asn | Asn | Glu | Asn | Leu | His | Gly | Trp | Phe | Thr | Ser | Asp | Gly |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Met | Phe | Tyr | Leu | Tyr | Asn | Asn | Asp | Leu | Gly | His | Tyr | Ser | Glu | Asn | Tyr |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     |     | 525 |     |     |
| Trp | Ala | Thr | Val | Asn | Pro | Tyr | Arg | Leu | Pro | Gly | Thr | Thr | Glu | Thr | Glu |
|     |     | 530 |     |     | 535 |     |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Gln | Lys | Pro | Leu | Glu | Gly | Thr | Pro | Glu | Asn | Ile | Lys | Thr | Asn | Tyr | Gln |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Gln | Val | Gly | Met | Thr | Ser | Leu | Ser | Asp | Asp | Ala | Phe | Val | Ala | Ser | Lys |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Lys | Leu | Asn | Asn | Thr | Ser | Ala | Leu | Ala | Ala | Met | Thr | Phe | Thr | Asn | Trp |
|     |     |     | 580 |     |     |     | 585 |     |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Asn | Lys | Ser | Leu | Thr | Leu | Asn | Lys | Gly | Trp | Phe | Ile | Leu | Gly | Asn | Lys |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Ile | Ile | Phe | Val | Gly | Ser | Asn | Ile | Lys | Asn | Gln | Ser | Ser | His | Lys | Ala |
|     |     | 610 |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Tyr | Thr | Thr | Ile | Glu | Gln | Arg | Lys | Glu | Asn | Gln | Lys | His | Pro | Tyr | Cys |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Ser | Tyr | Val | Asn | Asn | Gln | Pro | Val | Asp | Leu | Asn | Asn | Gln | Leu | Val | Asp |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Phe | Thr | Asn | Thr | Lys | Ser | Ile | Phe | Leu | Glu | Ser | Asp | Asp | Pro | Ala | Gln |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Asn | Ile | Gly | Tyr | Tyr | Phe | Phe | Lys | Pro | Thr | Thr | Leu | Ser | Ile | Ser | Lys |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Ala | Leu | Gln | Thr | Gly | Lys | Trp | Gln | Asn | Ile | Lys | Ala | Asp | Asp | Lys | Ser |
|     |     | 690 |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| Pro | Glu | Ala | Ile | Lys | Glu | Val | Ser | Asn | Thr | Phe | Ile | Thr | Ile | Met | Gln |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |
| Asn | His | Thr | Gln | Asp | Gly | Asp | Arg | Tyr | Ala | Tyr | Met | Met | Leu | Pro | Asn |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |
| Met | Thr | Arg | Gln | Glu | Phe | Glu | Thr | Tyr | Ile | Ser | Lys | Leu | Asp | Ile | Asp |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |
| Leu | Leu | Glu | Asn | Asn | Asp | Lys | Leu | Ala | Ala | Val | Tyr | Asp | His | Asp | Ser |
|     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |     |     |
| Gln | Gln | Met | His | Val | Ile | His | Tyr | Glu | Lys | Lys | Ala | Thr | Thr | Phe | Ser |
|     |     | 770 |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |
| Asn | His | Asn | Leu | Ser | His | Gln | Gly | Phe | Tyr | Ser | Phe | Pro | His | Pro | Val |
| 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     | 795 |     |     |     |     | 800 |

ES 2 531 630 T3

Lys Gln Asn Gln Gln Gln Lys Leu Ala His Gln Gly Ile Ala Ala Lys  
 805 810 815  
 Asn Asn Ala Leu Asn Ser His Lys Ile Pro His Lys Arg Gln Arg Arg  
 820 825 830  
 Leu Pro Arg Thr Gly Tyr Gln Ser Ser Ser Leu Glu Phe Leu Gly Gly  
 835 840 845  
 Ala Leu Val Ala Ser Phe Asn His Ile Thr Lys Pro Phe Arg Lys Lys  
 850 855 860  
 Asp Leu Arg Ile  
 865

<210> 88  
 <211> 828  
 5 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M6

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 88

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 290 |     |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |  |  |
| Ile | Lys | Ala | Ile | Glu | Lys | Val | Phe | Thr | Leu | Val | Asp | Glu | Gly | Asn | Gly |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |
| Phe | Tyr | Gln | Asp | Gly | Ser | Leu | Ile | Asp | His | Val | Val | Thr | Asn | Ala | Gln |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |  |
| Ser | Pro | Leu | Tyr | Lys | Lys | Gly | Ile | Ala | Tyr | Thr | Gly | Ala | Tyr | Gly | Asn |  |  |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |
| Val | Leu | Ile | Asp | Gly | Leu | Ser | Gln | Leu | Ile | Pro | Ile | Ile | Gln | Lys | Thr |  |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |  |
| Lys | Ser | Pro | Ile | Glu | Ala | Asp | Lys | Met | Ala | Thr | Ile | Tyr | His | Trp | Ile |  |  |
|     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |  |
| Asn | His | Ser | Phe | Phe | Pro | Ile | Ile | Val | Arg | Gly | Glu | Met | Met | Asp | Met |  |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |  |
| Thr | Arg | Gly | Arg | Ser | Ile | Ser | Arg | Phe | Asn | Ala | Gln | Ser | His | Val | Ala |  |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     | 410 |     |     |     |     |     | 415 |     |  |  |
| Gly | Ile | Glu | Ala | Leu | Arg | Ala | Ile | Leu | Arg | Ile | Ala | Asp | Met | Ser | Glu |  |  |
|     |     |     |     | 420 |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |  |  |
| Glu | Pro | His | Arg | Leu | Ala | Leu | Lys | Thr | Arg | Ile | Lys | Thr | Leu | Val | Thr |  |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |  |
| Gln | Gly | Asn | Ala | Phe | Tyr | Asn | Val | Tyr | Asp | Asn | Leu | Lys | Thr | Tyr | His |  |  |
|     |     | 450 |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |  |
| Asp | Ile | Lys | Leu | Met | Lys | Glu | Leu | Leu | Ser | Asp | Thr | Phe | Val | Pro | Val |  |  |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |  |  |
| Gln | Lys | Leu | Asp | Ser | Tyr | Val | Ala | Ser | Phe | Asn | Ser | Met | Asp | Lys | Leu |  |  |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |  |  |
| Ala | Leu | Tyr | Asn | Asn | Lys | His | Asp | Phe | Ala | Phe | Gly | Leu | Ser | Met | Phe |  |  |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |  |  |
| Ser | Asn | Arg | Thr | Gln | Asn | Tyr | Glu | Ala | Met | Asn | Asn | Glu | Asn | Leu | His |  |  |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |  |  |
| Gly | Trp | Phe | Thr | Ser | Asp | Gly | Met | Phe | Tyr | Leu | Tyr | Asn | Asn | Asp | Leu |  |  |
|     |     | 530 |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |  |  |
| Gly | His | Tyr | Ser | Glu | Asn | Tyr | Trp | Ala | Thr | Val | Asn | Pro | Tyr | Arg | Leu |  |  |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |  |  |
| Pro | Gly | Thr | Thr | Glu | Thr | Glu | Gln | Lys | Pro | Leu | Glu | Gly | Thr | Pro | Glu |  |  |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |  |  |
| Asn | Ile | Lys | Thr | Asp | Tyr | Gln | Gln | Val | Gly | Met | Thr | Ser | Leu | Ser | Asp |  |  |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |  |  |
| Asp | Ala | Phe | Val | Ala | Ser | Lys | Lys | Leu | Asn | Asn | Thr | Ser | Ala | Leu | Ala |  |  |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |  |  |
| Ala | Met | Thr | Phe | Thr | Asn | Trp | Asn | Lys | Ser | Leu | Thr | Leu | Asn | Lys | Gly |  |  |
|     |     | 610 |     |     |     | 615 |     |     |     |     |     | 620 |     |     |     |  |  |
| Trp | Phe | Ile | Leu | Gly | Asn | Lys | Ile | Ile | Phe | Val | Gly | Ser | Asn | Ile | Lys |  |  |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |  |  |
| Asn | Gln | Ser | Ser | His | Lys | Ala | Tyr | Thr | Thr | Ile | Glu | Gln | Arg | Lys | Glu |  |  |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |  |  |
| Asn | Gln | Lys | His | Pro | Tyr | Cys | Ser | Tyr | Val | Asn | Asn | Gln | Pro | Val | Asp |  |  |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |  |  |
| Leu | Asn | Asn | Gln | Leu | Val | Asp | Phe | Thr | Asn | Thr | Lys | Ser | Ile | Phe | Leu |  |  |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |  |  |
| Glu | Ser | Asp | Asp | Pro | Ala | Gln | Asn | Ile | Gly | Tyr | Tyr | Phe | Phe | Lys | Pro |  |  |
|     |     | 690 |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |  |  |
| Thr | Thr | Leu | Ser | Ile | Ser | Lys | Ala | Leu | Gln | Thr | Gly | Lys | Trp | Gln | Asn |  |  |
| 705 |     |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     | 720 |  |  |
| Ile | Lys | Ala | Asp | Asp | Lys | Ser | Pro | Glu | Ala | Ile | Lys | Glu | Val | Ser | Asn |  |  |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |  |  |
| Thr | Phe | Ile | Thr | Ile | Met | Gln | Asn | His | Thr | Gln | Asp | Gly | Asp | Arg | Tyr |  |  |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |  |  |

ES 2 531 630 T3

Ala Tyr Met Met Leu Pro Asn Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr  
 755 760 765  
 Ile Ser Lys Leu Asp Ile Asp Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala  
 770 775 780  
 Ala Val Tyr Asp His Asp Ser Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Glu  
 785 790 795 800  
 Lys Lys Ala Thr Met Phe Ser Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe  
 805 810 815  
 Tyr Ser Phe Pro His Pro Val Lys Gln Asn Gln Gln  
 820 825

<210> 89  
 <211> 556  
 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M12 (cepa MGAS2096)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

<400> 89

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

ES 2 531 630 T3

|                     |                             |                         |
|---------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 290                 | 295                         | 300                     |
| Asn Gln Asp Lys Thr | Leu Thr Ala Lys Lys Ser     | Tyr Phe Ile Leu Asn     |
| 305                 | 310                         | 315                     |
| Asp Lys Ile Val Phe | Leu Gly Thr Gly Ile Lys Ser | Thr Asp Ser Ser         |
|                     | 325                         | 330                     |
| Lys Asn Pro Val Thr | Thr Ile Glu Asn Arg Lys     | Ala Asn Asp Tyr Lys     |
|                     | 340                         | 345                     |
| Leu Tyr Lys Asp Asp | Thr Gln Thr Thr Asn Ser     | Asp Asn Gln Glu Thr     |
|                     | 355                         | 360                     |
| Asn Ser Leu Phe Leu | Glu Ser Thr Asn Ser Thr     | Gln Asn Asn Ile Gly     |
|                     | 370                         | 375                     |
| Tyr His Phe Leu Asn | Glu Ser Lys Ile Thr Val     | Lys Lys Glu Ser His     |
| 385                 | 390                         | 395                     |
| Thr Gly Lys Trp Ser | Asp Ile Asn Lys Ser         | Gln Lys Asp Ile Gln Lys |
|                     | 405                         | 410                     |
| Thr Asp Glu Tyr Tyr | Glu Val Thr Gln Lys         | His Ser Asn Thr Asp Ser |
|                     | 420                         | 425                     |
| Lys Tyr Ala Tyr Val | Leu Tyr Pro Gly Leu         | Ser Lys Asp Val Phe Lys |
|                     | 435                         | 440                     |
| Ser Lys Ala Ser Lys | Val Thr Val Val Lys         | Gln Glu Asp Asp Phe His |
|                     | 450                         | 455                     |
| Val Val Lys Asp Asn | Glu Ser Val Trp Ala         | Gly Ile Asn Tyr Ser Asp |
| 465                 | 470                         | 475                     |
| Ser Ala Lys Thr Phe | Glu Ile Asn Asn Thr         | Lys Val Glu Val Lys Ala |
|                     | 485                         | 490                     |
| Lys Gly Met Phe Ile | Leu Thr Lys Lys Asp         | Asp Asn Thr Tyr Glu Cys |
|                     | 500                         | 505                     |
| Ser Phe Tyr Asn Pro | Glu Ser Thr Asn Ser         | Val Ser Asp Ile Glu Ser |
|                     | 515                         | 520                     |
| Lys Ile Ser Met Thr | Gly Tyr Ser Ile Ile         | Asn Lys Asn Thr Ser Thr |
|                     | 530                         | 535                     |
| Ser Asn Glu Ser Gly | Val Arg Phe Glu Leu         | Thr Lys                 |
| 545                 | 550                         | 555                     |

<210> 90  
 <211> 635  
 5 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M12 (cepa MGAS2096)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 90

|                     |                     |                             |
|---------------------|---------------------|-----------------------------|
| Met Ala Phe Met Tyr | Glu His Ala Tyr Asn | Leu Asn Arg Glu Asn His     |
| 1                   | 5                   | 10                          |
| Gln Thr Thr Gly Lys | Glu Asn Lys Glu Asn | Trp Trp Val Tyr Glu Ile     |
|                     | 20                  | 25                          |
| Gly Thr Pro Arg Ala | Ile Asn Asn Thr     | Leu Ser Leu Met Tyr Pro Tyr |
|                     | 35                  | 40                          |
| Phe Thr Gln Glu Glu | Ile Leu Lys Tyr Thr | Ala Pro Ile Glu Lys Phe     |
|                     | 50                  | 55                          |
| Val Pro Asp Pro Thr | Arg Phe Arg Val Arg | Ala Ala Asn Phe Ser Pro     |
| 65                  | 70                  | 75                          |
| Phe Glu Ala Ser Ser | Gly Asn Leu Ile Asp | Met Gly Arg Val Lys Leu     |
|                     | 85                  | 90                          |
| Ile Ser Gly Ile Leu | Arg Lys Asp Asp     | Leu Glu Ile Ser Asp Thr Ile |
|                     | 100                 | 105                         |
|                     |                     | 110                         |

Lys Ala Ile Glu Lys Val Phe Thr Leu Val Asp Glu Gly Asn Gly Phe  
 115 120 125  
 Tyr Gln Asp Gly Ser Leu Ile Asp His Val Val Thr Asn Ala Gln Ser  
 130 135 140  
 Pro Leu Tyr Lys Lys Gly Ile Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val  
 145 150 155 160  
 Leu Ile Asp Gly Leu Ser Gln Leu Ile Pro Ile Ile Gln Lys Thr Lys  
 165 170 175  
 Ser Pro Ile Glu Ala Asp Lys Met Ala Thr Ile Tyr His Trp Ile Asn  
 180 185 190  
 His Ser Phe Phe Pro Ile Ile Val Arg Gly Glu Met Met Asp Met Thr  
 195 200 205  
 Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Phe Asn Ala Gln Ser His Val Ala Gly  
 210 215 220  
 Ile Glu Ala Leu Arg Ala Ile Leu Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Pro His Arg Leu Ala Leu Lys Thr Arg Ile Lys Thr Leu Val Thr Gln  
 245 250 255  
 Gly Asn Ala Phe Tyr Asn Val Tyr Asp Asn Leu Lys Thr Tyr His Asp  
 260 265 270  
 Ile Lys Leu Met Lys Glu Leu Leu Ser Asp Thr Ser Val Pro Val Gln  
 275 280 285  
 Lys Leu Asp Ser Tyr Val Ala Ser Phe Asn Ser Met Asp Lys Leu Ala  
 290 295 300  
 Leu Tyr Asn Asn Lys His Asp Phe Ala Phe Gly Leu Ser Met Phe Ser  
 305 310 315 320  
 Asn Arg Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Met Asn Asn Glu Asn Leu His Gly  
 325 330 335  
 Trp Phe Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Asn Asp Leu Gly  
 340 345 350  
 His Tyr Ser Glu Asn Tyr Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu Pro  
 355 360 365  
 Gly Thr Thr Glu Thr Glu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu Asn  
 370 375 380  
 Ile Lys Thr Asn Tyr Gln Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp Asp  
 385 390 395 400  
 Ala Phe Val Ala Ser Lys Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala Ala  
 405 410 415  
 Met Thr Phe Thr Asn Trp Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly Trp  
 420 425 430  
 Phe Ile Leu Gly Asn Lys Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys Asn  
 435 440 445  
 Gln Ser Ser His Lys Ala Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu Asn  
 450 455 460  
 Gln Lys His Pro Tyr Cys Ser Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp Leu  
 465 470 475 480  
 Asn Asn Gln Leu Val Asp Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu Glu  
 485 490 495  
 Ser Asp Asp Pro Ala Gln Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro Thr  
 500 505 510  
 Thr Leu Ser Ile Ser Lys Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn Ile  
 515 520 525  
 Lys Ala Asp Asp Lys Ser Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn Thr  
 530 535 540  
 Phe Ile Thr Ile Met Gln Asn His Thr Gln Asp Gly Asp Arg Tyr Ala  
 545 550 555 560  
 Tyr Met Met Leu Pro Asn Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr Ile  
 565 570 575

ES 2 531 630 T3

Ser Lys Leu Asp Ile Asp Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala Ala  
 580 585 590  
 Val Tyr Asp His Asp Ser Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Glu Lys  
 595 600 605  
 Lys Ala Thr Met Phe Ser Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe Tyr  
 610 615 620  
 Ser Phe Pro His Pro Val Lys Gln Asn Gln Gln  
 625 630 635

<210> 91  
 <211> 828  
 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M12 (cepa MGAS9429)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

<400> 91

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

Ile Lys Ala Ile Glu Lys Val Phe Thr Leu Val Asp Glu Gly Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Phe Tyr Gln Asp Gly Ser Leu Ile Asp His Val Val Thr Asn Ala Gln  
 325 330 335  
 Ser Pro Leu Tyr Lys Lys Gly Ile Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn  
 340 345 350  
 Val Leu Ile Asp Gly Leu Ser Gln Leu Ile Pro Ile Ile Gln Lys Thr  
 355 360 365  
 Lys Ser Pro Ile Glu Ala Asp Lys Met Ala Thr Ile Tyr His Trp Ile  
 370 375 380  
 Asn His Ser Phe Phe Pro Ile Ile Val Arg Gly Glu Met Met Asp Met  
 385 390 395 400  
 Thr Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Phe Asn Ala Gln Ser His Val Ala  
 405 410 415  
 Gly Ile Glu Ala Leu Arg Ala Ile Leu Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu  
 420 425 430  
 Glu Pro His Arg Leu Ala Leu Lys Thr Arg Ile Lys Thr Leu Val Thr  
 435 440 445  
 Gln Gly Asn Ala Phe Tyr Asn Val Tyr Asp Asn Leu Lys Thr Tyr His  
 450 455 460  
 Asp Ile Lys Leu Met Lys Glu Leu Leu Ser Asp Thr Ser Val Pro Val  
 465 470 475 480  
 Gln Lys Leu Asp Ser Tyr Val Ala Ser Phe Asn Ser Met Asp Lys Leu  
 485 490 495  
 Ala Leu Tyr Asn Asn Lys His Asp Phe Ala Phe Gly Leu Ser Met Phe  
 500 505 510  
 Ser Asn Arg Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Met Asn Asn Glu Asn Leu His  
 515 520 525  
 Gly Trp Phe Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Asn Asp Leu  
 530 535 540  
 Gly His Tyr Ser Glu Asn Tyr Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu  
 545 550 555 560  
 Pro Gly Thr Thr Glu Thr Glu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu  
 565 570 575  
 Asn Ile Lys Thr Asn Tyr Gln Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp  
 580 585 590  
 Asp Ala Phe Val Ala Ser Lys Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala  
 595 600 605  
 Ala Met Thr Phe Thr Asn Trp Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly  
 610 615 620  
 Trp Phe Ile Leu Gly Asn Lys Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys  
 625 630 635 640  
 Asn Gln Ser Ser His Lys Ala Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu  
 645 650 655  
 Asn Gln Lys His Pro Tyr Cys Ser Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp  
 660 665 670  
 Leu Asn Asn Gln Leu Val Asp Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu  
 675 680 685  
 Glu Ser Asp Asp Pro Ala Gln Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro  
 690 695 700  
 Thr Thr Leu Ser Ile Ser Lys Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn  
 705 710 715 720  
 Ile Lys Ala Asp Asp Lys Ser Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn  
 725 730 735  
 Thr Phe Ile Thr Ile Met Gln Asn His Thr Gln Asp Gly Asp Arg Tyr  
 740 745 750  
 Ala Tyr Met Met Leu Pro Asn Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr



ES 2 531 630 T3

```

          755                      760                      765
Ile Ser Lys Leu Asp Ile Asp Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala
   770                      775                      780
Ala Val Tyr Asp His Asp Ser Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Glu
   785                      790                      795
Lys Lys Ala Thr Met Phe Ser Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe
   805
Tyr Ser Phe Pro His Pro Val Lys Gln Asn Gln Gln
   820                      825

```

<210> 92  
 <211> 828  
 5 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M28

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 92

```

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

```

Ile Lys Ala Ile Glu Lys Val Phe Thr Leu Val Asp Glu Gly Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Phe Tyr Gln Asp Gly Ser Leu Ile Asp His Val Val Thr Asn Ala Gln  
 325 330 335  
 Ser Pro Leu Tyr Lys Lys Gly Ile Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn  
 340 345 350  
 Val Leu Ile Asp Gly Leu Ser Gln Leu Ile Pro Ile Ile Gln Lys Thr  
 355 360 365  
 Lys Ser Ser Ile Glu Ala Asp Lys Met Ala Thr Ile Tyr His Trp Ile  
 370 375 380  
 Asn His Ser Phe Phe Pro Ile Ile Val Arg Gly Glu Met Met Asp Met  
 385 390 395 400  
 Thr Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Phe Asn Ala Gln Ser His Val Ala  
 405 410 415  
 Gly Ile Glu Ala Leu Arg Ala Ile Leu Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu  
 420 425 430  
 Glu Pro His Arg Leu Ala Leu Lys Thr Arg Ile Lys Thr Leu Val Thr  
 435 440 445  
 Gln Gly Asn Ala Phe Tyr Asn Val Tyr Asp Asn Leu Lys Thr Tyr His  
 450 455 460  
 Asp Ile Lys Leu Met Lys Glu Leu Leu Ser Asp Thr Ser Val Pro Val  
 465 470 475 480  
 Gln Lys Leu Asp Ser Tyr Val Ala Ser Phe Asn Ser Met Asp Lys Leu  
 485 490 495  
 Ala Leu Tyr Asn Asn Lys His Asp Phe Ala Phe Gly Leu Ser Met Phe  
 500 505 510  
 Ser Asn Arg Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Met Asn Asn Glu Asn Leu His  
 515 520 525  
 Gly Trp Phe Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Asn Asp Leu  
 530 535 540  
 Gly His Tyr Ser Glu Asn Tyr Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu  
 545 550 555 560  
 Pro Gly Thr Thr Glu Thr Glu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu  
 565 570 575  
 Asn Ile Lys Thr Asn Tyr Gln Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp  
 580 585 590  
 Asp Ala Phe Val Ala Ser Lys Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala  
 595 600 605  
 Ala Met Thr Phe Thr Asn Trp Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly  
 610 615 620  
 Trp Phe Ile Leu Gly Asn Lys Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys  
 625 630 635 640  
 Asn Gln Ser Ser His Lys Ala Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu  
 645 650 655  
 Asn Gln Lys His Pro Tyr His Ala Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp  
 660 665 670  
 Leu Asn Asn Gln Leu Val Asp Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu  
 675 680 685  
 Glu Ser Asp Asp Ser Ala Gln Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro  
 690 695 700  
 Thr Thr Leu Ser Ile Ser Lys Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn  
 705 710 715 720  
 Ile Lys Ala Asp Asp Lys Ser Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn  
 725 730 735  
 Thr Phe Ile Thr Ile Met Gln Asn His Thr Gln Asp Gly Asp Arg Tyr  
 740 745 750  
 Ala Tyr Met Met Leu Pro Asn Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr  
 755 760 765

ES 2 531 630 T3

Ile Ser Lys Leu Asp Ile Asp Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala  
 770 775 780  
 Ala Val Tyr Asp His Asp Ser Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Glu  
 785 790 795  
 Lys Lys Ala Thr Met Phe Ser Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe  
 805 810 815  
 Tyr Ser Phe Pro His Pro Val Lys Gln Asn Gln Gln  
 820 825

<210> 93  
 <211> 522  
 5 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus suis*

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 93

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

ES 2 531 630 T3

Asp Leu Thr Tyr Arg Ile Ala Asp Ala Ala Val Ala Ile Val Glu Lys  
 305 310 315 320  
 Asn Met Ile Arg Pro Leu Ala Ala Gly Lys Thr Gln Val Asp Val Tyr  
 325 330 335  
 Asp Lys Asp Thr Lys Leu Ser Ser Phe Glu Leu Thr Val Thr Glu His  
 340 345 350  
 Gln Ala Thr Val Phe Asp Thr Leu Arg Asn Asn Trp Glu Asp Ile Ser  
 355 360 365  
 Leu Ala Asn Lys Arg Tyr Gln Ser Asn Asp Thr Gln Met Lys Ala Phe  
 370 375 380  
 Leu Gly Arg Leu Asp Ala Gly Val Ala Ser Ser Leu Lys Lys Trp Val  
 385 390 395 400  
 Glu Pro Thr Asn Gln Gly Lys Thr Ile Phe Asn Asp Ile Asp Phe Ser  
 405 410 415  
 Lys Ser Ser His Leu Thr Thr Val Tyr Arg Arg Leu Glu Gln Met Ala  
 420 425 430  
 Gln Val Val Glu Asn Pro Asp Ser Ala Tyr Tyr His Asp Arg Ser Leu  
 435 440 445  
 Ile Asp Leu Val Arg Lys Gly Met Asn Trp Leu Tyr Thr Asn Val Tyr  
 450 455 460  
 Asn Glu Asn Lys Ser Ile Asp Gly Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly  
 465 470 475 480  
 Thr Pro Arg Ala Val Val Asn Thr Leu Ile Tyr Met His Pro Tyr Phe  
 485 490 495  
 Ser Gln Glu Glu Ile Leu Thr Tyr Thr Lys Pro Ile Ser Lys Phe Val  
 500 505 510  
 Pro Asp Pro Thr Thr Ile Ser Val Lys His  
 515 520

<210> 94  
 <211> 1164  
 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus suis*

5

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10

<400> 94

Met Gly Phe Phe Ile Ser Gln Ser Lys Gln His Tyr Gly Ile Arg Lys  
 1 5 10 15  
 Tyr Lys Val Gly Val Cys Ser Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ile Leu Gly  
 20 25 30  
 Thr Arg Val Ala Ala Asn Gln Leu Pro Ser Thr Glu Thr Ala Ser Pro  
 35 40 45  
 Gln Ser Ser Gln Leu Val Glu Thr Thr Pro Glu Thr Thr Glu Ala Val  
 50 55 60  
 Met Thr Ser Glu Val Ser Ser Glu Val Ser Pro Val Thr Ser Thr Glu  
 65 70 75 80  
 Thr Gln Pro Ser Ser Thr Thr Ala Glu Thr Leu Ala Ser Pro Gln Ala  
 85 90 95  
 Val Gln Ala Thr Lys Glu Glu Lys Asn Leu Val Ala Asn Gly Glu Phe  
 100 105 110  
 Ile Ser Thr Thr Ala Pro Ser Gly Asn Trp Lys Glu Leu Ala Ala Thr  
 115 120 125  
 Asn Trp Glu Thr Trp Ile Pro Ala Asn Val Lys Lys Glu Asn Gly Gln  
 130 135 140  
 Val Arg Ile Asp Glu Gly Arg Leu His Ile Ser Ser Thr Ala Ser Tyr

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |
| Arg | Val | Ala | Val | His | Gln | Thr | Val | Asp | Val | Asp | Pro | Asn | Lys | Arg | Tyr |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Leu | Phe | Ser | Tyr | Asp | Val | Glu | Thr | Lys | Asp | Leu | Lys | Gly | Ser | Gly | Val |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Arg | Val | Arg | Leu | Arg | Ser | Leu | Thr | Ala | Glu | Gly | Lys | Asp | Leu | Ser | Pro |
|     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Gln | Glu | Phe | Ala | Tyr | Thr | Pro | Tyr | Lys | Asn | Gly | Ser | Gln | Ala | Glu | His |
|     |     |     | 210 |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Ile | Glu | Gln | Ile | Leu | Thr | Val | Ser | Pro | Glu | Thr | Arg | Lys | Leu | Lys | Val |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |
| Glu | Leu | Phe | Phe | Glu | Asn | Ser | Val | Gly | Gln | Ala | Trp | Leu | Asp | Asn | Ile |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |
| Ser | Leu | Val | Glu | Tyr | Val | Glu | Lys | Thr | Pro | Glu | Thr | Pro | Glu | Gln | Ser |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Pro | Glu | Leu | Val | Gln | Pro | Glu | Thr | Gly | Gln | Ile | Ser | Leu | Ala | Ser | Asn |
|     |     |     | 275 |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Lys | Val | Tyr | Leu | Pro | Val | Arg | Pro | Asp | Leu | Thr | Tyr | Arg | Ile | Ala | Asp |
|     |     |     | 290 |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Ala | Ala | Val | Ala | Thr | Val | Glu | Lys | Asn | Met | Ile | Arg | Pro | Leu | Ala | Ala |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |     |
| Gly | Lys | Thr | Gln | Val | Asp | Val | Tyr | Asp | Lys | Asp | Thr | Lys | Leu | Ser | Ser |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     |     | 335 |     |
| Phe | Glu | Leu | Ile | Val | Thr | Glu | His | Gln | Ala | Thr | Val | Phe | Asp | Thr | Leu |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Arg | Asn | Asn | Trp | Glu | Asp | Ile | Ser | Leu | Ala | Asn | Lys | Arg | Tyr | Gln | Ser |
|     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     | 365 |     |     |
| Asn | Asp | Ala | Gln | Met | Lys | Ala | Phe | Leu | Gly | Arg | Leu | Asp | Ala | Gly | Val |
|     |     |     | 370 |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Ala | Ser | Ser | Leu | Glu | Lys | Trp | Val | Glu | Pro | Thr | Glu | Gln | Ser | Lys | Thr |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Ile | Phe | Asn | Asp | Ile | Asp | Phe | Ser | Lys | Ser | Ser | His | Leu | Thr | Thr | Val |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     |     | 415 |     |
| Tyr | Arg | Arg | Leu | Glu | Gln | Met | Ala | Gln | Val | Val | Glu | Asn | Pro | Asp | Ser |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Ala | Tyr | Tyr | His | Asp | Arg | Ser | Leu | Ile | Asp | Leu | Val | Arg | Lys | Gly | Met |
|     |     |     | 435 |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Asn | Trp | Leu | Tyr | Ala | Asn | Val | Tyr | Asn | Glu | Asn | Lys | Ser | Ile | Asp | Gly |
|     |     |     | 450 |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Asn | Trp | Trp | Asp | Tyr | Glu | Ile | Gly | Thr | Ser | Arg | Ala | Val | Val | Asn | Thr |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Leu | Ile | Tyr | Met | His | Pro | Tyr | Phe | Ser | Gln | Glu | Glu | Ile | Leu | Thr | Tyr |
|     |     |     | 485 |     |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Thr | Lys | Pro | Ile | Ser | Lys | Phe | Val | Pro | Asp | Pro | Thr | Thr | Ile | Arg | Lys |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Thr | Leu | Thr | Asn | Pro | Val | Pro | Ala | Val | Gly | Gly | Asn | Gln | Thr | Asp | Leu |
|     |     |     | 515 |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Ser | Lys | Val | Ala | Ile | Leu | Glu | Gly | Ala | Leu | Arg | Glu | Asp | Ala | Asp | Arg |
|     |     |     | 530 |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Val | Arg | Ala | Gly | Ala | Gln | Gly | Leu | Thr | Thr | Ile | Met | Lys | Phe | Val | Asp |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Lys | Gly | Glu | Gly | Phe | Tyr | Arg | Asp | Gly | Ser | Phe | Ile | Asp | His | Thr | Asn |
|     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     |     | 575 |     |
| Val | Ala | Tyr | Thr | Gly | Ala | Tyr | Gly | Asn | Val | Leu | Ile | Glu | Gly | Phe | Ser |
|     |     |     | 580 |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |     |
| Gln | Leu | Leu | Pro | Val | Ile | Gln | Pro | Thr | Glu | Phe | Ala | Leu | Lys | Glu | Glu |
|     |     |     | 595 |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Gln | Thr | Asn | Ile | Leu | Tyr | Glu | Trp | Ile | Glu | Lys | Ala | Phe | Met | Pro | Ile |

|      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
|      | 610 |     |      |     |     | 615 |     |     |     |     |     | 620 |     |     |      |
| Leu  | Val | Arg | Gly  | Glu | Leu | Met | Asp | Met | Thr | Arg | Gly | Arg | Ser | Ile | Ser  |
| 625  |     |     |      |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640  |
| Arg  | Ala | Thr | Gly  | Glu | Ser | His | Val | Gln | Ala | Met | Glu | Ile | Leu | Arg | Ser  |
|      |     |     | 645  |     |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     |     | 655  |
| Leu  | Val | Arg | Ile  | Ala | Glu | Ser | Ala | Gln | Pro | Glu | Gln | Lys | Thr | Lys | Leu  |
|      |     |     | 660  |     |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     |     | 670  |
| Leu  | Ser | Phe | Val  | Lys | Ala | Gln | Leu | Thr | Ser | Asp | Thr | Phe | Tyr | Asp | Ser  |
|      |     | 675 |      |     |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     |     | 685  |
| Tyr  | Arg | Ser | Leu  | Lys | Ser | Tyr | Lys | Asp | Ile | Asp | Leu | Val | Asn | Lys | Leu  |
|      |     | 690 |      |     |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     |     | 700  |
| Leu  | Ala | Asp | Asn  | Gln | Ile | Pro | Ala | Glu | Val | Asp | Lys | Asp | Tyr | Ile | Ala  |
| 705  |     |     |      |     | 710 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 720  |
| Ala  | Phe | Asn | Asn  | Met | Asp | Lys | Phe | Val | Tyr | Arg | Ser | Ala | Gln | Glu | Gly  |
|      |     |     |      |     | 725 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 735  |
| Phe  | Thr | Phe | Ala  | Leu | Ser | Met | Tyr | Ser | Ser | Arg | Thr | Gln | Asn | Tyr | Glu  |
|      |     |     | 740  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 750  |
| Asp  | Met | Asn | Asn  | Glu | Asn | Arg | Lys | Gly | Trp | Tyr | Thr | Ala | Asp | Gly | Met  |
|      |     |     | 755  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 765  |
| Val  | Tyr | Leu | Tyr  | Asn | Asp | Asp | Leu | Ser | His | Tyr | Ser | Asn | His | Tyr | Trp  |
|      |     |     | 770  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 780  |
| Ala  | Thr | Val | Asp  | Pro | Tyr | Arg | Leu | Pro | Gly | Thr | Thr | Thr | Thr | Lys | Asp  |
| 785  |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 800  |
| Lys  | Arg | Glu | Asp  | Gly | Ser | Gly | Glu | Val | Thr | Leu | Ala | Ser | Asp | Phe | Val  |
|      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 815  |
| Gly  | Ala | Ser | Gln  | Leu | Gly | Asn | Arg | Leu | Ala | Thr | Ile | Ala | Met | Asp | Phe  |
|      |     |     | 820  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 830  |
| Asn  | Asn | Trp | Asn  | Asn | Ser | Leu | Thr | Ala | Arg | Lys | Ala | Trp | Ile | Val | Leu  |
|      |     |     | 835  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 845  |
| Gly  | Asn | Lys | Ile  | Val | Phe | Leu | Gly | Thr | Asp | Ile | Gln | His | Gln | Ser | Ala  |
|      |     |     | 850  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 860  |
| Gln  | Gly | Ala | Glu  | Thr | Thr | Ile | Glu | Asn | Arg | Lys | Leu | Leu | Thr | Gly | Glu  |
| 865  |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 880  |
| Lys  | Tyr | Ser | Tyr  | Tyr | Ile | Asn | Gly | Gln | Pro | Val | Asp | Leu | Ser | Lys | Glu  |
|      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 895  |
| Val  | Val | Thr | Asp  | Lys | Thr | Gln | Ser | Phe | Tyr | Met | Thr | Asn | Gly | Lys | Asp  |
|      |     |     | 900  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 910  |
| Asn  | Gln | Ser | Ile  | Gly | Tyr | Val | Phe | Leu | Asn | Gln | Leu | Pro | Thr | His | Ala  |
|      |     |     | 915  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 925  |
| Lys  | Leu | Asp | Gln  | Arg | Thr | Gly | Lys | Trp | Ser | Asp | Ile | Asn | Tyr | Asn | Gln  |
|      |     |     | 930  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 940  |
| Ser  | Lys | Glu | Glu  | Val | Ser | Asn | Ser | Phe | Val | Ser | Leu | Trp | His | Glu | His  |
| 945  |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 960  |
| Ala  | Gln | Thr | Ser  | Ser | Asn | Tyr | Ala | Tyr | Val | Leu | Val | Pro | Asn | Gln | Ser  |
|      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 975  |
| Met  | Glu | Lys | Val  | Asn | Gln | Ala | Ala | Ala | Ser | Val | Lys | Leu | Leu | His | Gln  |
|      |     |     | 980  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 990  |
| Asp  | Arg | Asp | Leu  | Gln | Val | Val | Tyr | Asp | Gln | Glu | Gln | Asn | Val | Trp | Gly  |
|      |     |     | 995  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1005 |
| Val  | Val | Lys | Tyr  | Thr | Asp | Thr | Ala | Tyr | Lys | Leu | Thr | Asp | Asp | Ile | Thr  |
|      |     |     | 1010 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1020 |
| Leu  | Thr | Asp | Ala  | Gly | Leu | Tyr | Thr | Ile | Gln | Lys | Val | Glu | Gly | Gly | Tyr  |
| 1025 |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1040 |
| Arg  | Ile | Ala | Phe  | Tyr | Asn | Pro | Ser | Thr | Arg | Thr | Val | Lys | Asn | Gly | Ile  |
|      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1055 |
| Glu  | Leu | Thr | Lys  | Ala | Gly | Ser | Ser | Leu | Thr | Val | Glu | Met | Glu | Pro | Thr  |
|      |     |     | 1060 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1070 |
| Ala  | Ala | Tyr | Pro  | Ser | Thr | Val | Trp | Lys | Val | Thr | Met | Pro | Glu | Gly | Ser  |

ES 2 531 630 T3

```

          1075                1080                1085
Asp Lys Gln Thr Gly Ser Val Glu Lys Thr Glu Lys Glu Glu Lys Gln
 1090                1095                1100
Leu Lys Glu Asn Gln Pro Ser Ser Glu Val Lys Gln Val Val His His
1105                1110                1115                1120
Ala Ala Glu Lys Thr Lys Pro Ser Lys Pro Arg Leu Pro Gln Thr Gly
                1125                1130                1135
Glu Glu Ala Ser Leu Gly Leu Gly Phe Leu Gly Leu Leu Thr Leu Gly
                1140                1145                1150
Ala Val Val Asp Phe Lys Cys Arg Arg Ser His Ser
 1155                1160

```

<210> 95  
 <211> 1164  
 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus suis*

5

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10

<400> 95

```

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

```

Lys Val Tyr Leu Pro Val Arg Pro Asp Leu Thr Tyr Arg Ile Ala Asp  
 290 295 300  
 Ala Ala Val Ala Thr Val Glu Lys Asn Met Ile Arg Pro Leu Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Thr Gln Val Asp Val Tyr Asp Lys Asp Thr Lys Leu Ser Ser  
 325 330 335  
 Phe Glu Leu Ile Val Thr Glu His Gln Ala Thr Val Phe Asp Thr Leu  
 340 345 350  
 Arg Asn Asn Trp Glu Asp Ile Ser Leu Ala Asn Lys Arg Tyr Gln Ser  
 355 360 365  
 Asn Asp Ala Gln Met Lys Ala Phe Leu Gly Arg Leu Asp Ala Gly Val  
 370 375 380  
 Ala Ser Ser Leu Glu Lys Trp Val Glu Pro Thr Glu Gln Ser Lys Thr  
 385 390 395 400  
 Ile Phe Asn Asp Ile Asp Phe Ser Lys Ser Ser His Leu Thr Thr Val  
 405 410 415  
 Tyr Arg Arg Leu Glu Gln Met Ala Gln Val Val Glu Asn Pro Asp Ser  
 420 425 430  
 Ala Tyr Tyr His Asp Arg Ser Leu Ile Asp Leu Val Arg Lys Gly Met  
 435 440 445  
 Asn Trp Leu Tyr Thr Asn Val Tyr Asn Glu Asn Lys Ser Ile Asp Gly  
 450 455 460  
 Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr Pro Arg Ala Val Val Asn Thr  
 465 470 475 480  
 Leu Ile Tyr Met His Pro Tyr Phe Ser Gln Glu Glu Ile Leu Thr Tyr  
 485 490 495  
 Thr Lys Pro Ile Ser Lys Phe Val Pro Asp Pro Thr Thr Ile Arg Lys  
 500 505 510  
 Thr Leu Thr Asn Pro Val Pro Ala Val Gly Gly Asn Gln Thr Asp Leu  
 515 520 525  
 Ser Lys Val Ala Ile Leu Glu Gly Ala Leu Arg Glu Asp Ala Asp Arg  
 530 535 540  
 Val Arg Ala Gly Ala Gln Gly Leu Thr Thr Ile Met Lys Phe Val Asp  
 545 550 555 560  
 Lys Gly Glu Gly Phe Tyr Arg Asp Gly Ser Phe Ile Asp His Thr Asn  
 565 570 575  
 Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val Leu Ile Glu Gly Phe Ser  
 580 585 590  
 Gln Leu Leu Pro Val Ile Gln Pro Thr Glu Phe Ala Leu Lys Glu Glu  
 595 600 605  
 Gln Thr Asn Ile Leu Tyr Glu Trp Ile Glu Lys Ala Phe Met Pro Ile  
 610 615 620  
 Leu Val Arg Gly Glu Leu Met Asp Met Thr Arg Gly Arg Ser Ile Ser  
 625 630 635 640  
 Arg Ala Thr Gly Glu Ser His Val Gln Ala Met Glu Ile Leu Arg Ser  
 645 650 655  
 Leu Val Arg Ile Ala Glu Ser Ala Gln Pro Glu Gln Lys Thr Lys Leu  
 660 665 670  
 Leu Ser Phe Val Lys Ala Gln Leu Thr Ser Asp Thr Phe Tyr Asp Ser  
 675 680 685  
 Tyr Arg Ser Leu Lys Ser Tyr Lys Asp Ile Asp Leu Val Asn Lys Leu  
 690 695 700  
 Leu Ala Asp Asn Gln Ile Pro Ala Glu Val Asp Lys Asp Tyr Ile Ala  
 705 710 715 720  
 Ala Phe Asn Asn Met Asp Lys Phe Val Tyr Arg Ser Ala Gln Glu Gly  
 725 730 735  
 Phe Thr Phe Ala Leu Ser Met Tyr Ser Ser Arg Thr Gln Asn Tyr Glu  
 740 745 750



Asp Met Asn Asn Glu Asn Arg Lys Gly Trp Tyr Thr Ala Asp Gly Met  
 755 760 765  
 Val Tyr Leu Tyr Asn Asp Asp Leu Ser His Tyr Ser Asn His Tyr Trp  
 770 775 780  
 Ala Thr Val Asp Pro Tyr Arg Leu Pro Gly Thr Thr Thr Thr Lys Asp  
 785 790 795 800  
 Lys Arg Glu Asp Gly Ser Gly Glu Val Thr Leu Ala Ser Asp Phe Val  
 805 810 815  
 Gly Ala Ser Gln Leu Gly Asn Arg Leu Ala Thr Ile Ala Met Asp Phe  
 820 825 830  
 Asn Asn Trp Asn Asn Ser Leu Thr Ala Arg Lys Ala Trp Ile Val Leu  
 835 840 845  
 Gly Asn Lys Ile Val Phe Leu Gly Thr Asp Ile Gln His Gln Ser Ala  
 850 855 860  
 Gln Gly Ala Glu Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Leu Leu Thr Gly Glu  
 865 870 875 880  
 Lys Tyr Ser Tyr Tyr Ile Asn Gly Gln Pro Val Asp Leu Ser Lys Glu  
 885 890 895  
 Val Val Thr Asp Lys Thr Gln Ser Phe Tyr Met Thr Asn Gly Lys Asp  
 900 905 910  
 Asn Gln Ser Ile Gly Tyr Val Phe Leu Asn Gln Leu Pro Thr His Ala  
 915 920 925  
 Lys Leu Asp Gln Arg Thr Gly Lys Trp Ser Asp Ile Asn Tyr Asn Gln  
 930 935 940  
 Ser Lys Glu Glu Val Ser Asn Ser Phe Val Ser Leu Trp His Glu His  
 945 950 955 960  
 Ala Gln Thr Ser Ser Asn Tyr Ala Tyr Val Leu Val Pro Asn Gln Ser  
 965 970 975  
 Met Glu Lys Val Asn Gln Ala Ala Ala Ser Val Lys Leu Leu His Gln  
 980 985 990  
 Asp Arg Asp Leu Gln Val Val Tyr Asp Gln Glu Gln Asn Val Trp Gly  
 995 1000 1005  
 Val Val Lys Tyr Thr Asp Thr Ala Tyr Lys Leu Thr Asp Asp Ile Thr  
 1010 1015 1020  
 Leu Thr Asp Ala Gly Leu Tyr Thr Ile Gln Lys Val Glu Gly Gly Tyr  
 1025 1030 1035 1040  
 Arg Ile Ala Phe Tyr Asn Pro Ser Thr Arg Thr Val Lys Asn Gly Ile  
 1045 1050 1055  
 Glu Leu Thr Lys Ala Gly Ser Ser Leu Thr Val Glu Met Glu Pro Thr  
 1060 1065 1070  
 Ala Ala Tyr Pro Ser Thr Val Trp Lys Val Thr Met Pro Glu Gly Ser  
 1075 1080 1085  
 Asp Lys Gln Thr Gly Ser Val Glu Lys Thr Glu Lys Glu Glu Lys Gln  
 1090 1095 1100  
 Leu Lys Glu Asn Gln Pro Ser Ser Glu Val Lys Gln Val Val His His  
 1105 1110 1115 1120  
 Ala Ala Glu Lys Thr Lys Pro Ser Lys Pro Arg Leu Pro Gln Thr Gly  
 1125 1130 1135  
 Glu Glu Ala Ser Leu Gly Leu Gly Phe Leu Gly Leu Leu Thr Leu Gly  
 1140 1145 1150  
 Ala Val Val Asp Phe Lys Cys Arg Arg Ser His Ser  
 1155 1160

<210> 96  
 <211> 802  
 5 <212> PRT  
 <213> *Vibrio fischeri* (cepa ATCC 700601 / ES114)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 96

ES 2 531 630 T3

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

ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 420 |     |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |
| Val | His | Arg | Arg | Thr | Asp | Trp | Ala | Phe | Ala | Leu | Ala | Met | His | Ser | Tyr |
|     |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Arg | Ile | Gly | Asn | Tyr | Glu | Cys | Met | Asn | Gly | Glu | Asn | Leu | Lys | Gly | Trp |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Phe | Thr | Gly | Asp | Gly | Met | Ile | Tyr | Leu | Tyr | Asn | Asp | Gln | Leu | Asp | His |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Tyr | Thr | Gly | Tyr | Trp | Pro | Thr | Val | Asn | Ala | Ser | Arg | Met | Pro | Gly | Thr |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Thr | Val | Asp | Ser | Gln | Ile | Met | Ala | Asp | Cys | Ser | Gly | Glu | Arg | Val | Gly |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Gly | Asn | Val | Asn | Thr | Asn | Met | Gln | Trp | Val | Gly | Ser | Thr | Ser | Leu | Asn |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Asn | Tyr | Gly | Ile | Ala | Gly | Met | Gln | Phe | Tyr | Asn | Trp | Ser | Asp | Thr | Leu |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Ser | Ala | Tyr | Lys | Ser | Trp | Phe | Met | Phe | Asp | Asn | Glu | Val | Val | Met | Leu |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Gly | Ser | Asn | Ile | Lys | Asp | Gln | Ser | Asn | Ala | Asn | Asn | Ile | Thr | Thr | Ile |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Glu | Asn | Arg | Lys | Arg | Leu | Ala | Glu | Thr | Lys | Leu | Phe | Ile | Asp | Gly | Thr |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Glu | Gln | Ala | Ala | Leu | Pro | Tyr | Gln | Gly | Ala | Pro | Ala | Thr | Phe | Ser | Ile |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     |     | 605 |     |     |
| Arg | Asn | Lys | Thr | Leu | Ala | Asn | Ser | Asp | Leu | Ser | Tyr | Val | Met | Leu | Thr |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     |     | 620 |     |     |     |
| Pro | Lys | Thr | Ile | Ser | Ile | Ser | Gln | Asn | Asp | Val | Asp | Gly | Asn | Trp | Ser |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Asp | Ile | Gly | Asn | Ser | Lys | Gly | Asp | Val | Ser | Asp | Ser | Tyr | Leu | Gln | Ala |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Thr | Leu | Thr | Gln | Val | Asp | Gln | Ala | Asp | Tyr | Gln | Tyr | Ala | Leu | Leu | Pro |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     |     | 670 |     |
| Asn | Gln | Asn | Asn | Asp | Thr | Val | Gln | Asn | Tyr | Ala | Gln | His | Pro | Asp | Val |
|     |     | 675 |     |     |     | 680 |     |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Thr | Val | Leu | Arg | Gln | Asp | Glu | Gln | Ala | His | Ala | Val | Gln | Glu | Asn | Thr |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     |     | 700 |     |     |     |
| Leu | Asn | Ile | Ile | Ala | Ala | Asn | Asn | Trp | Lys | Asn | Asn | Pro | Val | Asn | Ile |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |
| Thr | Asp | Thr | Ile | Thr | Leu | Asn | Ser | Met | Met | Gly | Phe | Met | Ile | Lys | Glu |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |
| Glu | Ser | Ser | Asn | Thr | Phe | Thr | Val | Ala | Val | Ser | Glu | Pro | Ile | Gln | Thr |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |
| Ile | Asp | Ser | Val | Asn | Phe | Thr | Phe | Asp | Lys | Gln | Gly | Ile | Val | Ile | Lys |
|     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     |     | 765 |     |     |
| Glu | Asp | Ile | Glu | Asn | Arg | Val | Val | Leu | Asn | Gly | Thr | Thr | Leu | Thr | Ile |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |
| Asn | Thr | Ser | Gly | Leu | Gln | Gly | Gln | Ser | Tyr | Ser | Phe | Gln | Val | Thr | Ile |
| 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     | 795 |     |     |     |     | 800 |
| Gln | Asp |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 97  
 <211> 517  
 5 <212> PRT  
 <213> *Synechococcus* sp. (cepa RCC307)

<220>  
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 97

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

ES 2 531 630 T3

Pro Thr Gly Thr Trp Val Gly Gln Gln Ala Arg Ile Asn Gln Thr Trp  
 450 455 460  
 Thr Ile Val Gly Phe Leu Leu Leu His His Leu Met Arg Lys Ala Pro  
 465 470 475 480  
 Gln Asp Val Lys Leu Leu Asp Leu Asp Asp Val Gly Pro Leu Arg Leu  
 485 490 495  
 Ser Phe Gln Asp Gln His Glu Lys Ser Ser Thr Asp Glu Arg Lys Ser  
 500 505 510  
 Phe Leu Lys Asn Tyr  
 515

<210> 98

<211> 1021

5 <212> PRT

<213> *Proteus vulgaris*

<220>

<223> condroitín-sulfato-ABC endoliasa

10

<400> 98

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Phe | Asp | Ala | Leu | Asn | Ile | His | Thr | Leu | Ala | Asn | Gly | Gly | Thr | Gln |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Gly | Arg | His | Leu | Ile | Thr | Asp | Lys | Gln | Ile | Ile | Ile | Tyr | Gln | Pro | Glu |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Asn | Leu | Asn | Ser | Gln | Asp | Lys | Gln | Leu | Phe | Asp | Asn | Tyr | Val | Ile | Leu |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Gly | Asn | Tyr | Thr | Thr | Leu | Met | Phe | Asn | Ile | Ser | Arg | Ala | Tyr | Val | Leu |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     | 350 |     |
| Glu | Lys | Asp | Pro | Thr | Gln | Lys | Ala | Gln | Leu | Lys | Gln | Met | Tyr | Leu | Leu |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Met | Thr | Lys | His | Leu | Leu | Asp | Gln | Gly | Phe | Val | Lys | Gly | Ser | Ala | Leu |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Val | Thr | Thr | His | His | Trp | Gly | Tyr | Ser | Ser | Arg | Trp | Trp | Tyr | Ile | Ser |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Thr | Leu | Leu | Met | Ser | Asp | Ala | Leu | Lys | Glu | Ala | Asn | Leu | Gln | Thr | Gln |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Val | Tyr | Asp | Ser | Leu | Leu | Trp | Tyr | Ser | Arg | Glu | Phe | Lys | Ser | Ser | Phe |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Asp | Met | Lys | Val | Ser | Ala | Asp | Ser | Ser | Asp | Leu | Asp | Tyr | Phe | Asn | Thr |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Leu | Ser | Arg | Gln | His | Leu | Ala | Leu | Leu | Leu | Leu | Glu | Pro | Asp | Asp | Gln |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Lys | Arg | Ile | Asn | Leu | Val | Asn | Thr | Phe | Ser | His | Tyr | Ile | Thr | Gly | Ala |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Leu | Thr | Gln | Val | Pro | Pro | Gly | Gly | Lys | Asp | Gly | Leu | Arg | Pro | Asp | Gly |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Thr | Ala | Trp | Arg | His | Glu | Gly | Asn | Tyr | Pro | Gly | Tyr | Ser | Phe | Pro | Ala |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |
| Phe | Lys | Asn | Ala | Ser | Gln | Leu | Ile | Tyr | Leu | Leu | Arg | Asp | Thr | Pro | Phe |
|     |     | 515 |     |     |     |     |     | 520 |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Ser | Val | Gly | Glu | Ser | Gly | Trp | Asn | Asn | Leu | Lys | Lys | Ala | Met | Val | Ser |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Ala | Trp | Ile | Tyr | Ser | Asn | Pro | Glu | Val | Gly | Leu | Pro | Leu | Ala | Gly | Arg |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| His | Pro | Phe | Asn | Ser | Pro | Ser | Leu | Lys | Ser | Val | Ala | Gln | Gly | Tyr | Tyr |
|     |     |     | 565 |     |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Trp | Leu | Ala | Met | Ser | Ala | Lys | Ser | Ser | Pro | Asp | Lys | Thr | Leu | Ala | Ser |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |
| Ile | Tyr | Leu | Ala | Ile | Ser | Asp | Lys | Thr | Gln | Asn | Glu | Ser | Thr | Ala | Ile |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Phe | Gly | Glu | Thr | Ile | Thr | Pro | Ala | Ser | Leu | Pro | Gln | Gly | Phe | Tyr | Ala |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Phe | Asn | Gly | Gly | Ala | Phe | Gly | Ile | His | Arg | Trp | Gln | Asp | Lys | Met | Val |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Thr | Leu | Lys | Ala | Tyr | Asn | Thr | Asn | Val | Trp | Ser | Ser | Glu | Ile | Tyr | Asn |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Lys | Asp | Asn | Arg | Tyr | Gly | Arg | Tyr | Gln | Ser | His | Gly | Val | Ala | Gln | Ile |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Val | Ser | Asn | Gly | Ser | Gln | Leu | Ser | Gln | Gly | Tyr | Gln | Gln | Glu | Gly | Trp |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     |     | 685 |     |     |
| Asp | Trp | Asn | Arg | Met | Glu | Gly | Ala | Thr | Thr | Ile | His | Leu | Pro | Leu | Lys |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| Asp | Leu | Asp | Ser | Pro | Lys | Pro | His | Thr | Leu | Met | Gln | Arg | Gly | Glu | Arg |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |
| Gly | Phe | Ser | Gly | Thr | Ser | Ser | Leu | Glu | Gly | Gln | Tyr | Gly | Met | Met | Ala |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |
| Phe | Asn | Leu | Ile | Tyr | Pro | Ala | Asn | Leu | Glu | Arg | Phe | Asp | Pro | Asn | Phe |

```

              740              745              750
Thr Ala Lys Lys Ser Val Leu Ala Ala Asp Asn His Leu Ile Phe Ile
      755              760              765
Gly Ser Asn Ile Asn Ser Ser Asp Lys Asn Lys Asn Val Glu Thr Thr
      770              775              780
Leu Phe Gln His Ala Ile Thr Pro Thr Leu Asn Thr Leu Trp Ile Asn
      785              790              795
Gly Gln Lys Ile Glu Asn Met Pro Tyr Gln Thr Thr Leu Gln Gln Gly
      805
Asp Trp Leu Ile Asp Ser Asn Gly Asn Gly Tyr Leu Ile Thr Gln Ala
      820              825              830
Glu Lys Val Asn Val Ser Arg Gln His Gln Val Ser Ala Glu Asn Lys
      835              840              845
Asn Arg Gln Pro Thr Glu Gly Asn Phe Ser Ser Ala Trp Ile Asp His
      850              855              860
Ser Thr Arg Pro Lys Asp Ala Ser Tyr Glu Tyr Met Val Phe Leu Asp
      865              870              875
Ala Thr Pro Glu Lys Met Gly Glu Met Ala Gln Lys Phe Arg Glu Asn
      885              890              895
Asn Gly Leu Tyr Gln Val Leu Arg Lys Asp Lys Asp Val His Ile Ile
      900              905
Leu Asp Lys Leu Ser Asn Val Thr Gly Tyr Ala Phe Tyr Gln Pro Ala
      915              920
Ser Ile Glu Asp Lys Trp Ile Lys Lys Val Asn Lys Pro Ala Ile Val
      930              935              940
Met Thr His Arg Gln Lys Asp Thr Leu Ile Val Ser Ala Val Thr Pro
      945              950              955
Asp Leu Asn Met Thr Arg Gln Lys Ala Ala Thr Pro Val Thr Ile Asn
      965              970              975
Val Thr Ile Asn Gly Lys Trp Gln Ser Ala Asp Lys Asn Ser Glu Val
      980              985              990
Lys Tyr Gln Val Ser Gly Asp Asn Thr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Tyr
      995              1000              1005
Phe Gly Ile Pro Gln Glu Ile Lys Leu Ser Pro Leu Pro
      1010              1015              1020

```

<210> 99  
 <211> 700  
 <212> PRT  
 <213> *Pedobacter heparinus*

<220>  
 <223> condroitin AC liasa

<400> 99

```

Met Lys Lys Leu Phe Val Thr Cys Ile Val Phe Phe Ser Ile Leu Ser
 1      5      10
Pro Ala Leu Leu Ile Ala Gln Gln Thr Gly Thr Ala Glu Leu Ile Met
      20      25      30
Lys Arg Val Met Leu Asp Leu Lys Lys Pro Leu Arg Asn Met Asp Lys
      35      40      45
Val Ala Glu Lys Asn Leu Asn Thr Leu Gln Pro Asp Gly Ser Trp Lys
      50      55      60
Asp Val Pro Tyr Lys Asp Asp Ala Met Thr Asn Trp Leu Pro Asn Asn
      65      70      75      80
His Leu Leu Gln Leu Glu Thr Ile Ile Gln Ala Tyr Ile Glu Lys Asp
      85      90      95

```

Ser His Tyr Tyr Gly Asp Asp Lys Val Phe Asp Gln Ile Ser Lys Ala  
 100 105 110  
 Phe Lys Tyr Trp Tyr Asp Ser Asp Pro Lys Ser Arg Asn Trp Trp His  
 115 120 125  
 Asn Glu Ile Ala Thr Pro Gln Ala Leu Gly Glu Met Leu Ile Leu Met  
 130 135 140  
 Arg Tyr Gly Lys Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Val His Lys Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Glu Arg Met Lys Arg Gly Glu Pro Glu Lys Lys Thr Gly Ala Asn Lys  
 165 170 175  
 Thr Asp Ile Ala Leu His Tyr Phe Tyr Arg Ala Leu Leu Thr Ser Asp  
 180 185 190  
 Glu Ala Leu Leu Ser Phe Ala Val Lys Glu Leu Phe Tyr Pro Val Gln  
 195 200 205  
 Phe Val His Tyr Glu Glu Gly Leu Gln Tyr Asp Tyr Ser Tyr Leu Gln  
 210 215 220  
 His Gly Pro Gln Leu Gln Ile Ser Ser Tyr Gly Ala Val Phe Ile Thr  
 225 230 235 240  
 Gly Val Leu Lys Leu Ala Asn Tyr Val Arg Asp Thr Pro Tyr Ala Leu  
 245 250 255  
 Ser Thr Glu Lys Leu Ala Ile Phe Ser Lys Tyr Tyr Arg Asp Ser Tyr  
 260 265 270  
 Leu Lys Ala Ile Arg Gly Ser Tyr Met Asp Phe Asn Val Glu Gly Arg  
 275 280 285  
 Gly Val Ser Arg Pro Asp Ile Leu Asn Lys Lys Ala Glu Lys Lys Arg  
 290 295 300  
 Leu Leu Val Ala Lys Met Ile Asp Leu Lys His Thr Glu Glu Trp Ala  
 305 310 315 320  
 Asp Ala Ile Ala Arg Thr Asp Ser Thr Val Ala Ala Gly Tyr Lys Ile  
 325 330 335  
 Glu Pro Tyr His His Gln Phe Trp Asn Gly Asp Tyr Val Gln His Leu  
 340 345 350  
 Arg Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Val Arg Met Val Ser Lys Arg Thr Arg  
 355 360 365  
 Arg Ser Glu Ser Gly Asn Lys Glu Asn Leu Leu Gly Arg Tyr Leu Ser  
 370 375 380  
 Asp Gly Ala Thr Asn Ile Gln Leu Arg Gly Pro Glu Tyr Tyr Asn Ile  
 385 390 395 400  
 Met Pro Val Trp Glu Trp Asp Lys Ile Pro Gly Ile Thr Ser Arg Asp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Asp Arg Pro Leu Thr Lys Leu Trp Gly Glu Gln Gly Ser  
 420 425 430  
 Asn Asp Phe Ala Gly Gly Val Ser Asp Gly Val Tyr Gly Ala Ser Ala  
 435 440 445  
 Tyr Ala Leu Asp Tyr Asp Ser Leu Gln Ala Lys Lys Ala Trp Phe Phe  
 450 455 460  
 Phe Asp Lys Glu Ile Val Cys Leu Gly Ala Gly Ile Asn Ser Asn Ala  
 465 470 475 480  
 Pro Glu Asn Ile Thr Thr Thr Leu Asn Gln Ser Trp Leu Asn Gly Pro  
 485 490 495  
 Val Ile Ser Thr Ala Gly Lys Thr Gly Arg Gly Lys Ile Thr Thr Phe  
 500 505 510  
 Lys Ala Gln Gly Gln Phe Trp Leu Leu His Asp Ala Ile Gly Tyr Tyr  
 515 520 525  
 Phe Pro Glu Gly Ala Asn Leu Ser Leu Ser Thr Gln Ser Gln Lys Gly  
 530 535 540  
 Asn Trp Phe His Ile Asn Asn Ser His Ser Lys Asp Glu Val Ser Gly  
 545 550 555 560



ES 2 531 630 T3

Asp Val Phe Lys Leu Trp Ile Asn His Gly Ala Arg Pro Glu Asn Ala  
 565 570 575  
 Gln Tyr Ala Tyr Ile Val Leu Pro Gly Ile Asn Lys Pro Glu Glu Ile  
 580 585 590  
 Lys Lys Tyr Asn Gly Thr Ala Pro Lys Val Leu Ala Asn Thr Asn Gln  
 595 600 605  
 Leu Gln Ala Val Tyr His Gln Gln Leu Asp Met Val Gln Ala Ile Phe  
 610 615 620  
 Tyr Thr Ala Gly Lys Leu Ser Val Ala Gly Ile Glu Ile Glu Thr Asp  
 625 630 635 640  
 Lys Pro Cys Ala Val Leu Ile Lys His Ile Asn Gly Lys Gln Val Ile  
 645 650 655  
 Trp Ala Ala Asp Pro Leu Gln Lys Glu Lys Thr Ala Val Leu Ser Ile  
 660 665 670  
 Arg Asp Leu Lys Thr Gly Lys Thr Asn Arg Val Lys Ile Asp Phe Pro  
 675 680 685  
 Gln Gln Glu Phe Ala Gly Ala Thr Val Glu Leu Lys  
 690 695 700

<210> 100  
 <211> 844  
 5 <212> PRT  
 <213> *Victivallis vadensis* ATCC BAA-548

<220>  
 <223> condroitin AC liasa

10 <400> 100

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |
| Phe | Glu | Leu | Ala | Leu | Ala | Arg | Ala | Thr | Pro | Gly | His | Ala | Leu | Tyr | Arg |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Asp | Pro | Ala | Ala | Gly | Glu | Ala | Val | Arg | Lys | Ala | Val | Ala | Trp | Trp | Ala |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Glu | Arg | Gln | Pro | Gln | Asn | Gly | Asn | Trp | Trp | Trp | Asn | Asp | Met | Tyr | Val |
|     |     | 275 |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Pro | Lys | Ile | Leu | Gly | Asn | Ile | Leu | Leu | Leu | Ser | Pro | Glu | Leu | Phe | Pro |
|     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |
| Asp | Gly | Pro | Arg | Arg | Arg | Ala | Ala | Leu | Asn | Val | Cys | Arg | Gln | Ala | Cys |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Phe | Leu | Ser | Arg | Tyr | Thr | Gly | Asn | Asn | Arg | Val | Phe | Ile | Ala | Ala | Asn |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Ile | Phe | Cys | Arg | Ala | Leu | Leu | Glu | Arg | Asn | Leu | Pro | Val | Met | Asp | Arg |
|     |     |     | 340 |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Ala | Ala | Ala | Val | Leu | Ser | Glu | Glu | Ile | Arg | Phe | Ala | Pro | Ala | Glu | His |
|     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Lys | Thr | Ala | Trp | Ser | Phe | Gly | Gly | Ile | Arg | Ala | Asp | Gly | Cys | Tyr | His |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Gln | His | Gly | Pro | Gln | Ile | Gln | Phe | Gly | Asn | Tyr | Gly | Gly | Glu | Phe | Leu |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Ala | Asn | Ile | Ala | Tyr | Trp | Ser | Asn | Ile | Leu | Lys | Glu | Thr | His | Trp | Glu |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Leu | Ser | Pro | Glu | Gln | Trp | Arg | Ile | Met | Arg | His | Leu | Thr | Phe | Asn | Gly |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Phe | Gln | Trp | Val | Leu | Trp | Arg | Gly | Arg | Met | Asp | Leu | Leu | Ala | Cys | Gly |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Arg | Gln | Leu | Gly | Arg | Asn | Ala | Ala | Glu | Thr | Lys | Gly | Glu | Arg | Thr | Leu |
|     | 450 |     |     |     | 455 |     |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Asn | Ala | Phe | Ala | Gln | Leu | Arg | Asn | Ala | Asp | Pro | Gly | Asp | Arg | Ala | Pro |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Tyr | Asp | Ala | Ala | Leu | Arg | Arg | Asn | Arg | Asp | Gly | Glu | Asn | Thr | Leu | Thr |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Gly | Asn | Arg | His | Phe | Trp | Asn | Ser | Asp | Tyr | Met | Val | His | Arg | Arg | Pro |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Thr | Trp | Tyr | Ala | Ser | Val | Arg | Met | Asn | Ser | Val | Arg | Val | Arg | Pro | Ile |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Glu | Asp | Asp | Thr | Asn | Trp | Asp | Asn | Ala | Leu | Gly | Arg | Tyr | Phe | Ser | Asp |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Gly | Ala | Cys | Leu | Val | Met | Arg | Ser | Gly | Arg | Glu | Tyr | Glu | Asn | Ile | Thr |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     |     | 555 |     |     |     | 560 |
| Ala | Cys | Trp | Asp | Trp | Thr | Arg | Leu | Pro | Gly | Thr | Thr | Leu | Pro | Lys | Thr |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Pro | Val | Tyr | Thr | Gly | Glu | Asp | Ala | Arg | Arg | Phe | Gly | Leu | Lys | Ile | Gly |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Gly | Gly | Asp | Leu | Pro | Arg | Trp | Thr | His | Ser | Arg | Asn | Trp | Arg | Gln | Leu |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Gly | Glu | Thr | Gly | Phe | Val | Gly | Gly | Val | Thr | Asp | Gly | Glu | Arg | Gly | Ala |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Ala | Val | Tyr | Thr | Gln | Asp | Leu | Asp | Gly | Val | Arg | Ala | Arg | Lys | Ala | Trp |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     |     | 635 |     |     |     | 640 |
| Phe | Phe | Asp | Arg | Asp | Ala | Ile | Tyr | Cys | Leu | Gly | Ser | Gly | Ile | Thr | Ser |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Thr | Ser | Pro | Tyr | Glu | Val | Ala | Thr | Thr | Val | Asn | Ser | Cys | Leu | Arg | Asn |
|     |     | 660 |     |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Gly | Glu | Ile | Gln | Gln | Gly | Asp | Gly | Trp | Phe | Arg | His | Asp | Gly | Ile | Gly |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Tyr | Arg | Gly | Glu | Asn | Leu | Lys | Leu | Thr | Ala | Gly | Pro | Arg | Thr | Gly | Asp |

ES 2 531 630 T3

```

        690                695                700
Trp Arg Tyr Val Glu Gly Gly Leu Thr Arg Pro Val Pro Glu Thr Lys
705                710                715                720
Glu Leu Phe Thr Leu Thr Val Glu His Gly Val Lys Pro Arg Asn Ala
                725                730                735
Ser Tyr Ile Tyr Thr Ile Leu Pro Gly Ala Thr Pro Glu Glu Thr Ala
                740                745                750
Gly Thr Pro Pro Gly Arg Val Leu Arg Asn Thr Pro Glu Cys Gln Ala
                755                760                765
Val Glu Phe Ala Asp Gly Val Arg Ala Ala Ile Phe Tyr Glu Pro Gly
                770                775                780
Arg Leu Asp Asp Phe Glu Thr Asp Thr Pro Gly Val Phe Leu Ile Gly
785                790                795                800
Lys Gly Thr Val His Ala Ala Asp Pro Thr Gly Arg His Ser Ser Phe
                805                810                815
Thr Leu Lys Leu Asn Gly Val Ser Arg Lys Val Pro Leu Pro Ala Gly
                820                825                830
Glu Phe Ala Gly Gln Ser Val Lys Ile Val Leu Lys
                835                840

```

- <210> 101
- <211> 110
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- <220>
- 10 <223> Preproinsulina
  
- <220>
- <221> SEÑAL
- <222> (1)...(24)
- 15 <223> Secuencia señal
  
- <220>
- <221> CADENA
- <222> (25)...(54)
- 20 <223> Cadena B de insulina
  
- <220>
- <221> PROPEP
- <222> (57)...(87)
- 25 <223> Péptido C de insulina
  
- <220>
- <221> CADENA
- <222> (90)...(110)
- 30 <223> Cadena A de insulina
  
- <400> 101

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
1      5      10      15
Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
                20      25      30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
                35      40      45
Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
50      55      60

```

ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Glu | Leu | Gly | Gly | Gly | Pro | Gly | Ala | Gly | Ser | Leu | Gln | Pro | Leu |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ala | Leu | Glu | Gly | Ser | Leu | Gln | Lys | Arg | Gly | Ile | Val | Glu | Gln | Cys | Cys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Ser | Ile | Cys | Ser | Leu | Tyr | Gln | Leu | Glu | Asn | Tyr | Cys | Asn |     |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

5 <210> 102  
 <211> 86  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Proinsulina  
 <220>  
 <221> CADENA  
 <222> (66)...(86)  
 <223> Cadena B de insulina

15 <220>  
 <221> PROPEP  
 <222> (33)...(63)  
 <223> Péptido C de insulina

20 <220>  
 <221> CADENA  
 <222> (1)...(30)  
 <223> Cadena A de insulina

25 <400> 102

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Val | Asn | Gln | His | Leu | Cys | Gly | Ser | His | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Val | Cys | Gly | Glu | Arg | Gly | Phe | Phe | Tyr | Thr | Pro | Lys | Thr | Arg | Arg |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Glu | Ala | Glu | Asp | Leu | Gln | Val | Gly | Gln | Val | Glu | Leu | Gly | Gly | Gly | Pro |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gly | Ala | Gly | Ser | Leu | Gln | Pro | Leu | Ala | Leu | Glu | Gly | Ser | Leu | Gln | Lys |
|     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Arg | Gly | Ile | Val | Glu | Gln | Cys | Cys | Thr | Ser | Ile | Cys | Ser | Leu | Tyr | Gln |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Leu | Glu | Asn | Tyr | Cys | Asn |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

30 <210> 103  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>  
 <223> Cadena A de insulina

<400> 103

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ile | Val | Glu | Gln | Cys | Cys | Thr | Ser | Ile | Cys | Ser | Leu | Tyr | Gln | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Asn | Tyr | Cys | Asn |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

40

20

<210> 104  
 <211> 30

ES 2 531 630 T3

<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
5 <223> Cadena B de insulina

<400> 104

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Val | Asn | Gln | His | Leu | Cys | Gly | Ser | His | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Val | Cys | Gly | Glu | Arg | Gly | Phe | Phe | Tyr | Thr | Pro | Lys | Thr |     |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

10 <210> 105  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> *Gorilla gorilla*

15 <220>  
<223> Preproinsulina

20 <220>  
<221> CADENA  
<222> (66)...(86)  
<223> Cadena B de insulina

25 <220>  
<221> CADENA  
<222> (1)...(30)  
<223> Cadena A de insulina

30 <400> 105

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Leu | Trp | Met | Arg | Leu | Leu | Pro | Leu | Leu | Ala | Leu | Leu | Ala | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Trp | Gly | Pro | Asp | Pro | Ala | Ala | Ala | Phe | Val | Asn | Gln | His | Leu | Cys | Gly |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ser | His | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Tyr | Leu | Val | Cys | Gly | Glu | Arg | Gly | Phe |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Phe | Tyr | Thr | Pro | Lys | Thr | Arg | Arg | Glu | Ala | Glu | Asp | Leu | Gln | Val | Gly |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Gln | Val | Glu | Leu | Gly | Gly | Gly | Pro | Gly | Ala | Gly | Ser | Leu | Gln | Pro | Leu |
|     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ala | Leu | Glu | Gly | Ser | Leu | Gln | Lys | Arg | Gly | Ile | Val | Glu | Gln | Cys | Cys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Ser | Ile | Cys | Ser | Leu | Tyr | Gln | Leu | Glu | Asn | Tyr | Cys | Asn |     |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

35 <210> 106  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> *Pongo pygmaeus*

40 <220>  
<223> Preproinsulina

<400> 106

ES 2 531 630 T3

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1      5      10      15
Trp Gly Pro Asp Pro Ala Gln Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
      20      25      30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35      40      45
Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
 50      55      60
Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
 65      70      75      80
Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
      85      90      95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105      110

```

5 <210> 107  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Pan troglodytes*

10 <220>  
 <223> Preproinsulina

<400> 107

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Val Leu Leu Ala Leu
 1      5      10      15
Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ser Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
      20      25      30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35      40      45
Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
 50      55      60
Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
 65      70      75      80
Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
      85      90      95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105      110

```

15 <210> 108  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Macaca fascicularis*

20 <220>  
 <223> Preproinsulina

<400> 108

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1      5      10      15
Trp Gly Pro Asp Pro Ala Pro Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
      20      25      30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35      40      45
Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly
 50      55      60
Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
 65      70      75      80
Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
      85      90      95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105      110

```

25

ES 2 531 630 T3

<210> 109  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 5 <213> *Cercopithecus aethiops*

<220>  
 <223> Preproinsulina

10 <400> 109

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Leu | Trp | Met | Arg | Leu | Leu | Pro | Leu | Leu | Ala | Leu | Leu | Ala | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Trp | Gly | Pro | Asp | Pro | Val | Pro | Ala | Phe | Val | Asn | Gln | His | Leu | Cys | Gly |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ser | His | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Tyr | Leu | Val | Cys | Gly | Glu | Arg | Gly | Phe |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Phe | Tyr | Thr | Pro | Lys | Thr | Arg | Arg | Glu | Ala | Glu | Asp | Pro | Gln | Val | Gly |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Gln | Val | Glu | Leu | Gly | Gly | Gly | Pro | Gly | Ala | Gly | Ser | Leu | Gln | Pro | Leu |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ala | Leu | Glu | Gly | Ser | Leu | Gln | Lys | Arg | Gly | Ile | Val | Glu | Gln | Cys | Cys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Ser | Ile | Cys | Ser | Leu | Tyr | Gln | Leu | Glu | Asn | Tyr | Cys | Asn |     |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

15 <210> 110  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Canis familiaris*

20 <220>  
 <223> Preproinsulina

<400> 110

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Leu | Trp | Met | Arg | Leu | Leu | Pro | Leu | Leu | Ala | Leu | Leu | Ala | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Trp | Ala | Pro | Ala | Pro | Thr | Arg | Ala | Phe | Val | Asn | Gln | His | Leu | Cys | Gly |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ser | His | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Tyr | Leu | Val | Cys | Gly | Glu | Arg | Gly | Phe |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Phe | Tyr | Thr | Pro | Lys | Ala | Arg | Arg | Glu | Val | Glu | Asp | Leu | Gln | Val | Arg |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Asp | Val | Glu | Leu | Ala | Gly | Ala | Pro | Gly | Glu | Gly | Gly | Leu | Gln | Pro | Leu |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ala | Leu | Glu | Gly | Ala | Leu | Gln | Lys | Arg | Gly | Ile | Val | Glu | Gln | Cys | Cys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Ser | Ile | Cys | Ser | Leu | Tyr | Gln | Leu | Glu | Asn | Tyr | Cys | Asn |     |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

25 <210> 111  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 30 <213> *Spermophilus tridecemlineatus*

<220>  
 <223> Preproinsulina

<400> 111

35

ES 2 531 630 T3

```

Met Ala Leu Trp Thr Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1      5      10      15
Leu Gly Pro Asp Pro Ala Gln Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
      20      25      30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35      40      45
Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Glu Gln Gln Gly Gly
      50      55      60
Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Leu Pro Gln Pro Leu
      65      70      75      80
Ala Leu Glu Met Ala Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
      85      90      95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105      110

```

5 <210> 112  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Volemys kikuchii*

10 <220>  
 <223> Preproinsulina  
 <400> 112

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Val Leu
 1      5      10      15
Trp Glu Pro Asn Pro Ala Gln Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
      20      25      30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35      40      45
Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Arg Arg Gly Val Glu Asp Pro Gln Val Ala
      50      55      60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu
      65      70      75      80
Ala Leu Glu Val Ala Gln Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
      85      90      95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105      110

```

15 <210> 113  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Aotus trivirgatus*

20 <220>  
 <223> Preproinsulina  
 <400> 113

```

Met Ala Leu Trp Met His Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1      5      10      15
Trp Gly Pro Glu Pro Ala Pro Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
      20      25      30
Pro His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35      40      45
Phe Tyr Ala Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
      50      55      60
Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Ser Ile Thr Gly Ser Leu Pro Pro Leu
      65      70      75      80
Glu Gly Pro Met Gln Lys Arg Gly Val Val Asp Gln Cys Cys Thr Ser
      85      90      95
Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Gln Asn Tyr Cys Asn
      100      105

```

25



ES 2 531 630 T3

<210> 114  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 5 <213> *Apodemus semotus*

<220>  
 <223> Preproinsulina 1

10 <400> 114

```

Met Ala Leu Cys Val Arg Phe Leu Ser Leu Leu Ile Leu Leu Ile Leu
 1          5          10          15
Trp Glu Pro Asn Pro Ala Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
          20          25          30
Pro His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
          35          40          45
Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Glu
          50          55          60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Ala Pro Gly Thr Gly Asp Leu Glu Thr Leu
          65          70          75          80
Ala Leu Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
          85          90          95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
          100          105          110
  
```

15 <210> 115  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Apodemus semotus*

20 <220>  
 <223> Preproinsulina 2

<400> 115

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Phe Leu Pro Leu Leu Val Leu Leu Phe Leu
 1          5          10          15
Trp Glu Pro Asn Pro Ala Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
          20          25          30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
          35          40          45
Phe Tyr Thr Pro Met Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Ala
          50          55          60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu
          65          70          75          80
Ala Leu Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
          85          90          95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
          100          105          110
  
```

25 <210> 116  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 30 <213> *Cricetulus longicaudatus*

<220>  
 <223> Preproinsulina

35 <400> 116

ES 2 531 630 T3

```

Met Thr Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Thr Leu Leu Val Leu
 1      5      10      15
Trp Glu Pro Asn Pro Ala Gln Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
      20      25      30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35      40
Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Arg Arg Gly Val Glu Asp Pro Gln Val Ala
      50      55      60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Asp Asp Leu Gln Thr Leu
      65      70      75      80
Ala Leu Glu Val Ala Gln Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
      85      90      95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105      110

```

5 <210> 117  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Rattus norvegicus*

10 <220>  
 <223> Preproinsulina 1  
 <400> 117

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Phe Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Val Leu
 1      5      10      15
Trp Glu Pro Lys Pro Ala Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
      20      25      30
Pro His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35      40
Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Pro
      50      55      60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Glu Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu
      65      70      75      80

Ala Leu Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
      85      90      95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105      110

```

15 <210> 118  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Rattus norvegicus*

20 <220>  
 <223> Preproinsulina 2

25 <400> 118

ES 2 531 630 T3

```

Met Ala Leu Trp Ile Arg Phe Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu
 1      5      10      15
Trp Glu Pro Arg Pro Ala Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
      20      25      30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35      40      45
Phe Tyr Thr Pro Met Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Ala
      50      55      60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu
65      70      75      80
Ala Leu Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
      85      90      95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105      110

```

5 <210> 119  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Rattus losea*

10 <220>  
 <223> Preproinsulina 1  
 <400> 119

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Phe Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Val Val
 1      5      10      15
Trp Glu Pro Lys Pro Ala Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
      20      25      30
Pro His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35      40      45
Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Pro
      50      55      60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Ser Pro Glu Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu
65      70      75      80
Ala Leu Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
      85      90      95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105      110

```

15 <210> 120  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Rattus losea*

20 <220>  
 <223> Preproinsulina 2  
 <400> 120

```

Met Ala Leu Trp Ile Arg Phe Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Val Leu
 1      5      10      15
Trp Glu Pro Arg Pro Ala Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
      20      25      30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35      40      45
Phe Tyr Thr Pro Val Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Ala
      50      55      60
Gln Gln Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu
65      70      75      80
Ala Leu Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
      85      90      95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105      110

```

25

<210> 121  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 5 <213> *Niviventer coxingi*

<220>  
 <223> Preproinsulina 1

10 <400> 121

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Phe Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Val Leu
 1          5          10          15
Trp Glu Pro Asn Pro Ala Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
      20          25          30
Pro His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35          40          45
Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Ala
      50          55          60
Gln Leu Glu Leu Gly Glu Gly Pro Glu Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu
      65          70          75          80
Ala Leu Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
      85          90          95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100          105          110
    
```

15 <210> 122  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Niviventer coxingi*

20 <220>  
 <223> Preproinsulina 2

<400> 122

```

Met Ala Leu Trp Ile Arg Phe Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Val Leu
 1          5          10          15
Trp Glu Pro His Pro Ala Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
      20          25          30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35          40          45
Phe Tyr Thr Pro Met Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Pro
      50          55          60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Thr Gly Asp Leu Gln Thr Leu
      65          70          75          80
Ala Leu Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
      85          90          95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100          105          110
    
```

25 <210> 123  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Sus scrofa*

30 <220>  
 <223> Preproinsulina

<400> 123

35

ES 2 531 630 T3

```

Met Ala Leu Trp Thr Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1      5      10      15
Trp Ala Pro Ala Pro Ala Gln Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
 20      25      30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 35      40      45
Phe Tyr Thr Pro Lys Ala Arg Arg Glu Ala Glu Asn Pro Gln Ala Gly
 50      55      60
Ala Val Glu Leu Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Gln Ala Leu Ala Leu
 65      70      75      80
Glu Gly Pro Pro Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
 85      90      95
.Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105

```

- 5 <210> 124
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> *Meriones unguiculatus*
- <220>
- <223> Preproinsulina
- 10 <400> 124

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Phe Leu Ile Leu
 1      5      10      15
Trp Glu Pro Thr Pro Ala His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
 20      25      30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 35      40      45
Phe Tyr Thr Pro Lys Phe Arg Arg Gly Val Glu Asp Pro Gln Met Pro
 50      55      60

Gln Leu Glu Leu Gly Gly Ser Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Ala Leu
 65      70      75      80
Ala Leu Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
 85      90      95
Thr Gly Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105      110

```

- 15 <210> 125
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> *Oryctolagus cuniculus*
- 20 <220>
- <223> Preproinsulina
- 25 <400> 125

ES 2 531 630 T3

```

Met Ala Ser Leu Ala Ala Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Val Leu
 1          5          10          15
Cys Arg Leu Asp Pro Ala Gln Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
 20          25          30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 35          40          45
Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Glu Leu Gln Val Gly
 50          55          60
Gln Ala Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Gly Leu Gln Pro Ser
 65          70          75          80
Ala Leu Glu Leu Ala Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
 85          90          95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100          105          110

```

5 <210> 126  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

10 <220>  
 <223> Preproinsulina 1  
 <400> 126

```

Met Ala Leu Leu Val His Phe Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1          5          10          15
Trp Glu Pro Lys Pro Thr Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
 20          25          30
Pro His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 35          40          45
Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Glu
 50          55          60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Ser Pro Gly Asp Leu Gln Thr Leu Ala Leu
 65          70          75          80
Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys Thr Ser
 85          90          95
Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100          105

```

15 <210> 127  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

20 <220>  
 <223> Preproinsulina 2  
 <400> 127

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Phe Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Phe Leu
 1          5          10          15
Trp Glu Ser His Pro Thr Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
 20          25          30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 35          40          45
Phe Tyr Thr Pro Met Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Ala
 50          55          60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu
 65          70          75          80
Ala Leu Glu Val Ala Gln Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
 85          90          95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100          105          110

```

25

ES 2 531 630 T3

<210> 128  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Mus spretus*

5

<220>  
 <223> Preproinsulina 2

<400> 128

10

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Phe Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Phe Leu
 1          5          10          15
Trp Glu Ser His Pro Thr Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
          20          25          30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
          35          40          45
Phe Tyr Thr Pro Met Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Ala
          50          55          60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu
65          70          75          80
Ala Leu Glu Val Ala Gln Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
          85          90          95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
          100          105          110
    
```

<210> 129  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Mus caroli*

15

<220>  
 <223> Preproinsulina 1

20

<400> 129

```

Met Ala Leu Leu Val Arg Phe Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1          5          10          15
Trp Glu Pro Lys Pro Thr Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
          20          25          30
Pro His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
          35          40          45
Phe Tyr Ser Pro Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Glu
          50          55          60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Ser Pro Gly Asp Leu Gln Thr Leu Ala Leu
65          70          75          80
Glu Val Ala Arg Glu Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys Thr Ser
          85          90          95
Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
          100          105
    
```

25

<210> 130  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Mus caroli*

30

<220>  
 <223> Preproinsulina 2

<400> 130

ES 2 531 630 T3

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Phe Leu Pro Leu Val Ala Leu Leu Phe Leu
 1          5          10          15
Trp Glu Ser His Pro Thr Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly
 20          25          30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 35          40          45
Phe Tyr Thr Pro Met Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Ala
 50          55          60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu
 65          70          75          80
Ala Leu Glu Val Ala Gln Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
 85          90          95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100          105          110

```

5 <210> 131  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Psammomys obesus*

10 <220>  
 <223> Preproinsulina

<400> 131

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Phe Leu Ile Leu
 1          5          10          15
Trp Glu Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
 20          25          30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 35          40          45
Phe Tyr Thr Pro Lys Phe Arg Arg Gly Val Asp Asp Pro Gln Met Pro
 50          55          60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Ser Pro Gly Ala Gly Asp Leu Arg Ala Leu
 65          70          75          80
Ala Leu Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
 85          90          95
Thr Gly Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100          105          110

```

15 <210> 132  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Felis silvestris catus*

20 <220>  
 <223> Preproinsulina

25 <400> 132



ES 2 531 630 T3

```

Met Ala Pro Trp Thr Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ser Leu
 1      5      10      15
Trp Ile Pro Ala Pro Thr Arg Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
      20      25      30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35      40      45
Phe Tyr Thr Pro Lys Ala Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Gly Lys
      50      55      60
Asp Ala Glu Leu Gly Glu Ala Pro Gly Ala Gly Gly Leu Gln Pro Ser
65      70      75      80
Ala Leu Glu Ala Pro Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
      85      90      95
Ala Ser Val Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu His Tyr Cys Asn
      100      105      110

```

5 <210> 133  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

10 <220>  
 <223> Preproinsulina  
 <400> 133

```

Met Ala Leu Trp Thr Arg Leu Arg Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1      5      10      15
Trp Pro Pro Pro Pro Ala Arg Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
      20      25      30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35      40      45
Phe Tyr Thr Pro Lys Ala Arg Arg Glu Val Glu Gly Pro Gln Val Gly
      50      55      60
Ala Leu Glu Leu Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Gly Leu Glu Gly Pro
65      70      75      80
Pro Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Ala Ser Val Cys Ser
      85      90      95
Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105

```

15 <210> 134  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> *Ovis aries*

20 <220>  
 <223> Preproinsulina  
 <400> 134

```

Met Ala Leu Trp Thr Arg Leu Val Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1      5      10      15
Trp Ala Pro Ala Pro Ala His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
      20      25      30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      35      40      45
Phe Tyr Thr Pro Lys Ala Arg Arg Glu Val Glu Gly Pro Gln Val Gly
      50      55      60
Ala Leu Glu Leu Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Gly Leu Glu Gly Pro
65      70      75      80
Pro Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Ala Gly Val Cys Ser
      85      90      95
Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105

```

25

ES 2 531 630 T3

<210> 135  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 5 <213> *Cavia porcellus*

<220>  
 <223> Preproinsulina

10 <400> 135

```

Met Ala Leu Trp Met His Leu Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1           5           10           15
Trp Gly Pro Asn Thr Gly Gln Ala Phe Val Ser Arg His Leu Cys Gly
 20
Ser Asn Leu Val Glu Thr Leu Tyr Ser Val Cys Gln Asp Asp Gly Phe
 35           40           45
Phe Tyr Ile Pro Lys Asp Arg Arg Glu Leu Glu Asp Pro Gln Val Glu
 50           55           60
Gln Thr Glu Leu Gly Met Gly Leu Gly Ala Gly Gly Leu Gln Pro Leu
 65           70           75
Ala Leu Glu Met Ala Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
 85           90           95
Thr Gly Thr Cys Thr Arg His Gln Leu Gln Ser Tyr Cys Asn
 100           105           110
  
```

15 <210> 136  
 <211> 86  
 <212> PRT  
 <213> *Equus caballus*

20 <220>  
 <223> Proinsulina

<220>  
 <221> INCIERTO  
 <222> 31  
 25 <223> Xaa = Resto básico supuesto por homología

<220>  
 <221> INCIERTO  
 <222> 32  
 30 <223> Xaa = Resto básico supuesto por homología

<220>  
 <221> INCIERTO  
 <222> 64  
 35 <223> Xaa = Resto básico supuesto por homología

<220>  
 <221> INCIERTO  
 <222> 65  
 40 <223> Xaa = Resto básico supuesto por homología

<400> 136

ES 2 531 630 T3

```

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1      5      10      15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ala Xaa Xaa
 20      25      30
Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Glu Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35      40      45
Gly Leu Gly Gly Leu Gln Pro Leu Ala Leu Ala Gly Pro Gln Gln Xaa
 50      55      60
Xaa Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Gly Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65      70      75      80
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

```

5 <210> 137  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> *Octodon degus*

10 <220>  
 <223> Preproinsulina  
 <400> 137

```

Met Ala Pro Trp Met His Leu Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1      5      10      15
Trp Gly Pro Asn Ser Val Gln Ala Tyr Ser Ser Gln His Leu Cys Gly
 20      25      30
Ser Asn Leu Val Glu Ala Leu Tyr Met Thr Cys Gly Arg Ser Gly Phe
 35      40      45
Tyr Arg Pro His Asp Arg Arg Glu Leu Glu Asp Leu Gln Val Glu Gln
 50      55      60
Ala Glu Leu Gly Leu Glu Ala Gly Gly Leu Gln Pro Ser Ala Leu Glu
 65      70      75      80
Met Ile Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys Asn Asn Ile
 85      90      95

```

```

Cys Thr Phe Asn Gln Leu Gln Asn Tyr Cys Asn Val Pro
 100      105

```

15 <210> 138  
 <211> 86  
 <212> PRT  
 <213> *Chinchilla brevicaudata*

20 <220>  
 <223> Proinsulina

25 <220>  
 <221> INCIERTO  
 <222> 31  
 <223> Xaa = Resto básico supuesto por homología

30 <220>  
 <221> INCIERTO  
 <222> 32  
 <223> Xaa = Resto básico supuesto por homología

35 <220>  
 <221> INCIERTO  
 <222> 64  
 <223> Xaa = Resto básico supuesto por homología

40 <220>  
 <221> INCIERTO  
 <222> 65  
 <223> Xaa = Resto básico supuesto por homología

ES 2 531 630 T3

<400> 138

```

Phe Val Asn Lys His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Asp Ala Leu Tyr
 1          5          10
Leu Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Met Ala Xaa Xaa
          20          25          30
Glu Leu Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Ala Asp Pro Gly Val Val Pro
          35          40          45
Glu Ala Gly Arg Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Met Thr Leu Gln Xaa
          50          55          60
Xaa Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Thr Leu Tyr Gln
65          70          75          80
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
          85
    
```

5

<210> 139  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*

10

<220>  
 <223> Preproinsulina

15

<400> 139

```

Met Ala Leu Trp Ile Arg Ser Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Val Phe
 1          5          10          15
Ser Gly Pro Gly Thr Ser Tyr Ala Ala Ala Asn Gln His Leu Cys Gly
          20          25          30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
          35          40          45
Phe Tyr Ser Pro Lys Ala Arg Arg Asp Val Glu Gln Pro Leu Val Ser
          50          55          60
Ser Pro Leu Arg Gly Glu Ala Gly Val Leu Pro Phe Gln Gln Glu Glu
65          70          75          80
Tyr Glu Lys Val Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys His Asn Thr
          85          90          95
Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
          100          105
    
```

20

<210> 140  
 <211> 103  
 <212> PRT  
 <213> *Selasphorus rufus*

25

<220>  
 <223> Proinsulina

<400> 140

ES 2 531 630 T3

```

Ile Gln Ser Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ser Gly Pro Gly
 1      5      10
Thr Ser His Ala Ala Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val
      20      25      30
Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ser Pro
      35      40      45
Lys Ala Arg Arg Asp Ala Glu His Pro Leu Val Asn Gly Pro Leu His
      50      55      60
Gly Glu Val Gly Asp Leu Pro Phe Gln Gln Glu Glu Phe Glu Lys Val
      65      70      75      80
Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys His Asn Thr Cys Ser Leu Tyr
      85      90      95
Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100

```

5 <210> 141  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> *Xenopus laevis*

10 <220>  
 <223> Preproinsulina 1

<400> 141

```

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

Gln Lys Met Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys His Ser Thr Cys
      85      90      95
Ser Leu Phe Gln Leu Glu Ser Tyr Cys Asn
      100      105

```

15 <210> 142  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> *Xenopus laevis*

20 <220>  
 <223> Preproinsulina 2

25 <400> 142

ES 2 531 630 T3

```

Met Ala Leu Trp Met Gln Cys Leu Pro Leu Val Leu Val Leu Leu Phe
 1      5      10      15
Ser Thr Pro Asn Thr Glu Ala Leu Ala Asn Gln His Leu Cys Gly Ser
      20      25      30
His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Phe
      35      40      45
Tyr Tyr Pro Lys Ile Lys Arg Asp Ile Glu Gln Ala Gln Val Asn Gly
 50      55      60
Pro Gln Asp Asn Glu Leu Asp Gly Met Gln Phe Gln Pro Gln Glu Tyr
65      70      75      80
Gln Lys Met Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys His Ser Thr Cys
      85      90      95
Ser Leu Phe Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105

```

- 5 <210> 143
- <211> 106
- <212> PRT
- <213> *Xenopus tropicalis*
- <220>
- <223> Preproinsulina
- 10 <400> 143

```

Met Ala Leu Trp Met Gln Cys Leu Pro Leu Val Leu Val Leu Leu Phe
 1      5      10      15
Ser Thr Pro Asn Thr Glu Ala Leu Ala Asn Gln His Leu Cys Gly Ser
      20      25      30
His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Phe
      35      40      45
Tyr Tyr Pro Lys Ile Lys Arg Asp Ile Glu Gln Ala Met Val Asn Gly
 50      55      60
Pro Gln Asp Asn Glu Leu Asp Gly Met Gln Leu Gln Pro Gln Glu Tyr
65      70      75      80
Gln Lys Met Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys His Ser Thr Cys
      85      90      95
Ser Leu Phe Gln Leu Glu Ser Tyr Cys Asn
      100      105

```

- 15 <210> 144
- <211> 106
- <212> PRT
- <213> *Rana pipiens*
- 20 <220>
- <223> Preproinsulina
- <400> 144

```

Met Ala Leu Trp Ile Gln Cys Leu His Ile Ala Val Leu Leu Ser Leu
 1      5      10      15
Phe Thr Pro Thr Leu Lys Thr Phe Asp Asn Gln Tyr Leu Cys Gly Ser
      20      25      30
His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Met Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Phe
      35      40      45
Tyr Ser Pro Arg Ser Arg Arg Asp Leu Glu Gln Pro Leu Val Asn Gly
 50      55      60
Leu Gln Gly Ser Glu Leu Asp Glu Met Gln Val Gln Ser Gln Ala Phe
65      70      75      80
Gln Lys Arg Lys Pro Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys His Asn Thr Cys
      85      90      95
Ser Leu Tyr Asp Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100      105

```

25

<210> 145  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 <213> *Anas platyrhynchos*  
 5  
 <220>  
 <223> Preproinsulina  
 <220>  
 10 <221> INCIERTO  
 <222> 31  
 <223> Xaa = Resto básico supuesto por homología  
 <220>  
 15 <221> INCIERTO  
 <222> 32  
 <223> Xaa = Resto básico supuesto por homología  
 <220>  
 20 <221> INCIERTO  
 <222> 59  
 <223> Xaa = Resto básico supuesto por homología  
 <220>  
 25 <221> INCIERTO  
 <222> 60  
 <223> Xaa = Resto básico supuesto por homología  
 <400> 145  
 30  

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ala | Asn | Gln | His | Leu | Cys | Gly | Ser | His | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Val | Cys | Gly | Glu | Arg | Gly | Phe | Phe | Tyr | Ser | Pro | Lys | Thr | Xaa | Xaa |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp | Val | Glu | Gln | Pro | Leu | Val | Asn | Gly | Pro | Leu | His | Gly | Glu | Val | Gly |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Glu | Leu | Pro | Phe | Gln | His | Glu | Glu | Tyr | Gln | Xaa | Xaa | Gly | Ile | Val | Glu |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Gln | Cys | Cys | Glu | Asn | Pro | Cys | Ser | Leu | Tyr | Gln | Leu | Glu | Asn | Tyr | Cys |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Asn |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

  
 <210> 146  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> *Capra hircus*  
 <220>  
 40 <223> Preproinsulina  
 <400> 146  

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Val | Asn | Gln | His | Leu | Cys | Gly | Ser | His | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Val | Cys | Gly | Glu | Arg | Gly | Phe | Phe | Tyr | Thr | Pro | Lys | Ala | Gly | Ile |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Val | Glu | Gln | Cys | Cys | Ala | Gly | Val | Cys | Ser | Leu | Tyr | Gln | Leu | Glu | Asn |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Tyr | Cys | Asn |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     | 50  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

  
 <210> 147  
 <211> 30  
 <212> PRT

ES 2 531 630 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>  
<223> Insulina Aspart

5

<220>  
<223> Análogo de cadena B de insulina

10

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Val | Asn | Gln | His | Leu | Cys | Gly | Ser | His | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Val | Cys | Gly | Glu | Arg | Gly | Phe | Phe | Tyr | Thr | Asp | Lys | Thr |     |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

<211> 30  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

15

<220>  
<223> Insulina Lispro

20

<220>  
<223> Análogo de cadena B de insulina

<400> 148

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Val | Asn | Gln | His | Leu | Cys | Gly | Ser | His | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Val | Cys | Gly | Glu | Arg | Gly | Phe | Phe | Tyr | Thr | Lys | Pro | Thr |     |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

25

<210> 149  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

30

<220>  
<223> Insulina Glulisina

35

<220>  
<223> Análogo de cadena B de insulina

<400> 149

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Val | Lys | Gln | His | Leu | Cys | Gly | Ser | His | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Val | Cys | Gly | Glu | Arg | Gly | Phe | Phe | Tyr | Thr | Pro | Glu | Thr |     |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

40

<210> 150  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

45

<220>  
<223> Insulina Glargina

50

<220>  
<223> Análogo de cadena A de insulina

<400> 150



ES 2 531 630 T3

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Tyr Cys Gly  
 20

5 <210> 151  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Insulina Glargina  
 <220>  
 <223> Análogo de cadena B de insulina

15 <400> 151  
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg  
 20 25 30

20 <210> 152  
 <211> 53  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>  
 <223> Insulina Detemir  
 <220>  
 <223> Análogo de proinsulina

30 <220>  
 <221> CADENA  
 <222> (33)...(53)  
 <223> Cadena A

35 <220>  
 <221> CADENA  
 <222> (1)...(29)  
 <223> Cadena B

40 <400> 152  
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ala Ala Lys  
 20 25 30  
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
 35 40 45  
 Glu Asn Tyr Cys Asn  
 50

45 <210> 153  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

50 <220>  
 <223> Análogo de cadena B de insulina

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 28  
 <223> Xaa = Pro, Lys, Leu, Val o Ala  
 5

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 29  
 <223> Xaa = Lys o Pro  
 10

<400> 153

```

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
  1          5          10          15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Xaa Xaa Thr

                20                25                30
  
```

<210> 154  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 15

<220>  
 <223> Análogo de cadena B de insulina (des 28-30)  
 <400> 154

```

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
  1          5          10          15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr
                20                25
  
```

<210> 155  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 30

<220>  
 <223> Análogo de cadena B de insulina (des 27)  
 <400> 155

```

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
  1          5          10          15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Pro Lys Thr
                20                25
  
```

<210> 156  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 40

<220>  
 <223> Análogo de cadena A de insulina  
 45

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 21  
 <223> Xaa = Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Thr o Ser  
 50

<400> 156

ES 2 531 630 T3

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Tyr Cys Xaa  
 20

- 5 <210> 157  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*
- 10 <220>  
 <223> Análogo de cadena B de insulina
- 15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Phe, Asp o ninguno
- 20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 <223> Xaa = Val o ninguno
- 25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 3  
 <223> Xaa = Asn o Asp
- 30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 9  
 <223> Xaa = Ser o Asp
- 35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa = His o Asp
- 40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 28  
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
- 45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 29  
 <223> Xaa = L-Pro, D-Pro, D-hidroxipro, L-hidroxipro, L-(N-metilisina), D-lisina, L-(N-metil arginina) o D-arginina
- 50 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 30  
 <223> Xaa = Ala o Thr
- 55 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 31  
 <223> Xaa = Arg, Arg-Arg, Lys, Lys-Lys, Arg-Lys, Lys-Arg o ninguno
- <400> 157

Xaa Xaa Asn Gln His Leu Cys Gly Xaa Xaa Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30

ES 2 531 630 T3

<210> 158  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 5 <213> *Homo sapiens*  
  
 <220>  
 <223> Análogo de cadena A de insulina  
  
 10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 8  
 <223> Xaa = His, Phe, Gly, Gln, Glu, Ser, Asn, Asp, o Pro  
  
 15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 9  
 <223> Xaa = Gly, Asp, Glu, Thr, His, Gln, Asn, Ala o Pro  
  
 20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa = Leu, Pro, Val, His, Ala, Glu, Asp, Thr, Gln o Asn  
  
 25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 13  
 <223> Xaa = Pro, Val, Arg, His, Ala, Glu, Asp, Thr, Gly, Gln o Asn  
  
 30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 21  
 <223> Xaa = Asp o Glu  
  
 35 <400> 158  
  

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ile | Val | Glu | Gln | Cys | Cys | Xaa | Xaa | Xaa | Cys | Ser | Xaa | Tyr | Gln | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Asn | Tyr | Cys | Xaa |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

  
 <210> 159  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <220>  
 <223> Análogo de cadena B de insulina  
  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 50 <223> Xaa = Phe, Glu, Asp, Thr o Ser  
  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 55 <223> Xaa = Val, Arg, His, Ala, Glu, Asp, Thr, Pro, Gly, Gln, Ser o Asn  
  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 5  
 60 <223> Xaa = His, Ala, Glu, Aps, Thr, Ser, Gln, o Asn  
  
 <220>

ES 2 531 630 T3

<221> VARIANTE  
 <222> 9  
 <223> Xaa = Ser, Leu, Asp, Pro, Glu, Ile, Val, His, Thr, Gln, Asn, Met, Tyr, Trp o Phe

5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa = His, Asn, Leu, Asp, Arg, Glu, Ser, Thr, Ile o Gln

10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 12  
 <223> Xaa = Val, Asn, His, Ile o Tyr

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 14  
 <223> Xaa = Ala, Glu, Asp, Asn, Gln, Ser, Thr, Gly

20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 16  
 <223> Xaa = Tyr, Asp, Glu, Gln, Asn, Ser, Thr, His o Arg

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 17  
 <223> Xaa = Leu, Ser, Thr, Asn, Gln, Glu, Asp o His

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 18  
 <223> Xaa = Val, Ser, Thr, Asn, Gln o His

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 20  
 <223> Xaa = Gly, Gln, Ser, Thr, Asn, Asp, Glu, His o Arg

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 26  
 <223> Xaa = Tyr, Ala, Asp, His o Glu

45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 27  
 <223> Xaa = Thr, Asp, His o Glu

50 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 28  
 <223> Xaa = Pro, Asp o Glu

55 <400> 159

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Xaa | Asn | Gln | Xaa | Leu | Cys | Gly | Xaa | Xaa | Leu | Xaa | Glu | Xaa | Leu | Xaa |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Xaa | Xaa | Cys | Xaa | Glu | Arg | Gly | Phe | Phe | Xaa | Xaa | Xaa | Lys | Thr |     |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |     |

60 <210> 160  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 531 630 T3

<220>  
 <223> Análogo de cadena A de insulina

5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 21  
 <223> Xaa = Asn, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asp o Glu

10 <400> 160

**Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu**  
**1 5 10 15**  
**Glu Asn Tyr Cys Xaa**  
**20**

15 <210> 161  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>  
 <223> Análogo de cadena B de insulina

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Phe o ninguno

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 29  
 <223> Xaa = Ly, Ala, Thr o Ser

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 30  
 <223> Xaa = Thr, Arg, Lys, Hyl, Orn o Cit

<400> 161

**Xaa Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr**  
**1 5 10 15**  
**Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Xaa Xaa**  
**20 25 30**

40 <210> 162  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

45 <220>  
 <223> Análogo de cadena A de insulina

50 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 21  
 <223> Xaa = Asn, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asp, Glu, His o Gln

55 <400> 162

ES 2 531 630 T3

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Tyr Cys Xaa  
 20

5 <210> 163  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Análogo de cadena B de insulina

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Phe o ninguno

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 3  
 <223> Xaa = Asn, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asp, Glu, His o Gln

20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 30  
 <223> Xaa = Asn, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asp, Glu, His o Gln

25 <400> 163

Xaa Val Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Xaa  
 20 25 30

30 <210> 164  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>  
 <223> Análogo de cadena A de insulina

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 8  
 <223> Xaa = Ala o Thr

45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 <223> Xaa = Val o Ile

50 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 21  
 <223> Xaa = Asn, Asp, Gly, Ser, Thr o Ala

<400> 164

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Xaa Ser Xaa Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Tyr Cys Xaa  
 20

55

ES 2 531 630 T3

5 <210> 165  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Análogo de cadena B de insulina

10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Phe o ninguno

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Thr o ninguno

20 <400> 165

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Val | Asn | Gln | His | Leu | Cys | Gly | Ser | His | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Val | Cys | Gly | Glu | Arg | Gly | Phe | Phe | Tyr | Thr | Pro | Lys | Xaa |     |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

25 <210> 166  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia peptídica de enlazador  
 <400> 166

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Pro | Pro | Pro | Pro | Cys |
| 1   |     |     |     |     | 5   |

35 <210> 167  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Secuencia peptídica de enlazador  
 <400> 167

|     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Ser | Pro | Pro | Pro | Pro | Cys |
| 1   |     |     |     |     | 5   |     |

50 <210> 168  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Secuencia peptídica de enlazador  
 <400> 168



ES 2 531 630 T3

Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

5 <210> 169  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia peptídica de enlazador

15 <220>  
<221> REPETICIÓN  
<222> (1)...(5)  
<223> Péptido enlazador repetido  
<400> 169

Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

20 <210> 170  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Secuencia peptídica de enlazador  
<400> 170

Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser  
1 5 10

30 <210> 171  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Secuencia peptídica de enlazador  
40 <400> 171

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly  
1 5 10

45 <210> 172  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Secuencia peptídica de enlazador  
<400> 172

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr  
1 5 10 15  
Lys Gly

55

ES 2 531 630 T3

<210> 173  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Secuencia peptídica de enlazador

10

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly  
1 5 10

<210> 174  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<223> Secuencia peptídica de enlazador

20

<400> 174

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr  
1 5 10 15  
Lys Gly

25

<210> 175  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> Secuencia peptídica de enlazador

<400> 175

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe  
1 5 10

35

<210> 176  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Secuencia peptídica de enlazador

45

<400> 176

Ser Arg Ser Ser Gly  
1 5

50

<210> 177  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55

<220>  
<223> Secuencia peptídica de enlazador

<400> 177

ES 2 531 630 T3

Ser Gly Ser Ser Cys  
1 5

5 <210> 178  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
10 <223> Secuencia peptídica de enlazador  
  
<400> 178

Ala Ala Lys

1

15 <210> 179  
<211> 2  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
20 <223> Secuencia peptídica de enlazador  
  
<400> 179

Val Met  
1

25  
  
<210> 180  
<211> 2  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia peptídica de enlazador  
  
35 <400> 180

Ala Met  
1

40 <210> 181  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
45 <223> Secuencia peptídica de enlazador  
  
<220>  
<221> REPETICIÓN  
<222> (3)...(5)  
50 <223> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 repeticiones  
  
<220>  
<221> VARIANTE  
<222> 4  
55 <223> Xaa = Gly, Gly-Gly o Gly-Gly-Gly

ES 2 531 630 T3

<400> 181

Ala Met Gly Xaa Ser Ala Met  
1 5

5 210> 182  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> Cadena B de HMR-1 153

<400> 182

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
1 5 10 15  
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr  
20 25 30

15 <210> 183  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
<223> Cadena A de HMR-1 1423

25 <400> 183

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
1 5 10 15  
Glu Asn Tyr Cys Gly  
20

30 <210> 184  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
<223> Cadena B de HMR-1 1423

<400> 184

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
1 5 10 15  
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr His His  
20 25 30

40 <210> 185  
<211> 510  
<212> PRT  
<213> *Pan troglodytes*

<220>  
<223> PH20 de chimpancé

50 <400> 185

ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 | Val | Thr | Gly | Gln | Asp | 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 |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Ala | Ala | Thr | Leu | Tyr | Val | Arg | Asn | Arg | Val | Gln | Glu | Ala | Ile | Arg | Val |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Ser | Lys | Ile | Pro | Asp | Ala | Lys | Ser | Pro | Leu | Pro | Val | Phe | Val | 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 | Ser | Gln | Ile |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Phe | Tyr | Asn | Ala | Ser | Pro | Ser | Thr | Leu | Ser | Ala | Thr | Met | Phe | Ile | Asp |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Leu | Cys | Asp | Leu | Tyr | Leu | Val | Pro | Thr | Ser | Tyr | Leu | Ile | Leu |     |     |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |

<210> 186  
 <211> 512  
 5 <212> PRT  
 <213> *Macaca mulatta*

<220>  
 <223> PH20 de mono Rhesus

10 <400> 186

ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 | Ile | 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  |     |     |     |     |
| Asn | Glu | Pro | Leu | Asp | Met | Ser | Leu | Phe | Thr | Leu | Met | Gly | Ser | Pro | Arg |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ile | Asn | Ile | Thr | Gly | Gln | Gly | Val | Thr | Ile | Phe | Tyr | Val | Asp | Arg | Leu |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Gly | Tyr | Tyr | Pro | Tyr | Ile | Asp | Leu | Thr | Thr | Gly | Val | Thr | Val | His | Gly |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gly | Ile | Pro | Gln | Lys | Val | Ser | Leu | Gln | Asp | His | Leu | Asp | Lys | Ser | Lys |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gln | Asp | Ile | Leu | 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 | Pro | Gln | Ala | Thr | Asp | Lys | Ala | Lys | Gln | Glu | Phe |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |
| Glu | Lys | Ala | Gly | Lys | Asp | Phe | Met | Leu | Glu | Thr | Ile | Lys | Leu | Gly | Arg |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Ser | Leu | Arg | Pro | Asn | His | Leu | Trp | Gly | Tyr | Tyr | Leu | Phe | Pro | Asp | Cys |
|     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Tyr | Asn | His | His | Tyr | Arg | Lys | Pro | Gly | Tyr | Asn | Gly | Ser | Cys | Phe | Asp |
| 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 | Val | Val |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |
| Val | 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 | Asn | Pro | Leu | Pro | Val | Phe | Val | Tyr | Ala |
|     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |
| Arg | Leu | Val | Phe | Thr | Asp | Gln | Val | Leu | Lys | Phe | Leu | Ser | Arg | Glu | Glu |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Leu | Val | Ser | Thr | Leu | Gly | Glu | Thr | Val | Ala | Leu | Gly | Ala | Ser | Gly | Ile |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Val | Ile | Trp | Gly | Ser | Leu | Ser | Ile | Thr | Arg | Ser | Met | Lys | Ser | Cys | Leu |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Leu | Leu | Asp | Thr | 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 |     |     |     |     |
| Gly | Val | Cys | Ile | Arg | Lys | Asp | Trp | Asn | Ser | Ser | Asp | Tyr | Leu | His | Leu |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Asn | Pro | Asp | Asn | Phe | Asp | Ile | Arg | Leu | Glu | Lys | Gly | Gly | Lys | Phe | Thr |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Val | His | Gly | Lys | Pro | Thr | Val | Glu | Asp | Leu | Glu | Glu | Phe | Ser | Glu | Lys |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Phe | Tyr | Cys | Ser | Cys | Tyr | Thr | Asn | 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 | Ser | Leu | Lys | Pro | Pro | Val | Glu | Thr | Glu | Gly | Ser | Pro | Pro |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Ile | Phe | Tyr | Asn | Thr | Ser | Ser | Ser | Thr | Val | Ser | Thr | Thr | Met | Phe | Ile |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Trp | Arg | Leu | Glu | Val | Trp | Asp | Gln | Gly | Ile | Ser | Arg | Ile | Gly | Phe | Phe |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |

ES 2 531 630 T3

<210> 187  
 <211> 505  
 <212> PRT  
 5 <213> *Homo sapiens*  
  
 <220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-505  
  
 10 <400> 187

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1      5      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
      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 2 531 630 T3

```

                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
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
      305                310                315
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
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
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
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
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
      500                505

```

<210> 188  
 <211> 503  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-503

10

<400> 188

```

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

```

ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     | 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 |
|     |     |     | 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |
| Ser | Ile | Leu | Phe | Leu | Ile | Ile |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 189  
 <211> 501  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-501

10

<400> 189

ES 2 531 630 T3

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
  
 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  
 Ser Ile Leu Phe Leu  
 500

ES 2 531 630 T3

<210> 190  
 <211> 499  
 <212> PRT  
 5 <213> *Homo sapiens*  
  
 <220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-499  
  
 10 <400> 190

```

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
 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
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
    
```

ES 2 531 630 T3

```

305          310          315          320
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
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
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
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
Ser Ile Leu

```

<210> 191  
 <211> 497  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-497

10 <400> 191

```

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 |  |  |
|     |     |     | 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 |     |     |     |     |  |  |
| 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 |     |  |  |
| 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 |     |     |     |  |  |
| 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 |     |  |  |
| 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 |     |     |     |  |  |
| 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 |     |  |  |

5  
 <210> 192  
 <211> 495  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10  
 <220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-495  
 <400> 192

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 |
|  |     |     |     |     |     |     | 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 |
|  |     |     |     | 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 |     |     |     |     |
|  | 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 |     |
|  | 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 |     |     |     |
|  | 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 |     |
|  | 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 |     |     |     |
|  | 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 |     |
|  |     |     |     | 485 |     |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |

<210> 193  
 <211> 493  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursora 1-493

10 <400> 193

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 485 490



ES 2 531 630 T3

<210> 194  
 <211> 491  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-491

10

<400> 194

```

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
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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 485 490

<210> 195  
 <211> 489  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-489

10 <400> 195

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  
 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  
 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-  
 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  
 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  
 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  
 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  
 485

<210> 196  
 <211> 490  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-490

10 <400> 196

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 485 490

<210> 197  
 <211> 487  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-487

<400> 197

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  
 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  
 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  
 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  
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln

ES 2 531 630 T3

```

      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
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
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
      485

```

<210> 198  
 <211> 485  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-485

10

<400> 198

```

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

```

ES 2 531 630 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 485

<210> 199  
 <211> 484  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-484

10

<400> 199

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

ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|-----|
|     | 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 |  |  |  |     |
|     |     |     | 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 |     |     |     |     |  |  |  |     |
| 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 |
| 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 |     |     |     |  |  |  |     |
| 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 |
| 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 |     |     |     |  |  |  |     |
| 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 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |     |

<210> 200  
 <211> 476  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-476

10 <400> 200

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 |
|     |     |     | 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |     |     |     |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     |

<210> 201  
 <211> 475  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-475

5

10

<400> 201

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 |
|     |     |     | 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |     |     |     |     |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     |     |

ES 2 531 630 T3

<210> 202  
 <211> 474  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-474

10

<400> 202

```

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
      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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 465 470

<210> 203

<211> 473

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> HuPH20 precursor 1-473

10

<400> 203

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
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
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
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
                305                310                315
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
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
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
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
                465                470

```

<210> 204  
 <211> 472  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-472

10 <400> 204

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1      5      10
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20
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
      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
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
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
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
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
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
465      470

```

<210> 205  
 <211> 471  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-471

10 <400> 205

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 |
|     |     |     |     |     |     | 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 |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 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 |
|     |     |     |     |     |     | 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 |     |     |
| Ala | Ala | Thr | Leu | Tyr | Val | Arg | Asn | Arg | Val | Arg | Glu | Ala | Ile | Arg | Val |
|     |     |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Ser | Lys | Ile | Pro | Asp | Ala | Lys | Ser | Pro | Leu | Pro | Val | Phe | Ala | Tyr | Thr |
|     |     |     |     |     |     | 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| Val | Thr | Leu | Ala | Ala | Lys | Met | Cys | Ser | Gln | Val | Leu | Cys | Gln | Glu | Gln |
|     |     |     |     |     |     | 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 |     |
| 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 |
|     |     |     |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Val | Lys | Asp | Thr | Asp | Ala | Val | Asp | Val | Cys | Ile | Ala | Asp | Gly | Val | Cys |
|     |     |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Ile | Asp | Ala | Phe | Leu | Lys | Pro |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 465 |     |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 206  
<211> 470

ES 2 531 630 T3

<212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-470

5

<400> 206

```

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
          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
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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 465 470

<210> 207  
 <211> 469  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-469

10

<400> 207

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

ES 2 531 630 T3

```

      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
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
      260
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
      275
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
      290
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
      305
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
      325
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
      340
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
      355
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
      370
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
      385
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
      405
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
      420
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
      435
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
      450
Ile Asp Ala Phe Leu
      465

```

<210> 208  
 <211> 468  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-468

10

<400> 208

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
  1      5      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
      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 |
|     |     | 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| Val | Lys | Asp | Thr | Asp | Ala | Val | Asp | Val | Cys | Ile | Ala | Asp | Gly | Val | Cys |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     |     | 460 |     |     |     |
| Ile | Asp | Ala | Phe |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 465 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 209  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursora 1-466

<400> 209

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys  
 450 455 460

Ile Asp  
 465

<210> 210  
 <211> 465

ES 2 531 630 T3

<212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-465

5

<400> 210

```

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
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
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
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
    
```

ES 2 531 630 T3

```

          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
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
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
          450                      455                      460
Ile
  465

```

<210> 211  
 <211> 464  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursora 1-464

10

<400> 211

```

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
      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
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
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
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
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
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
      450                               455                               460

```

<210> 212  
 <211> 462  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-462

10 <400> 212

```

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

```

```

Val Gln Leu Ser 165 170 175
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
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
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
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305 310 315
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
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
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
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly
450 455 460

```

<210> 213  
 <211> 460  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-460

10

<400> 213

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 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
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80

```



ES 2 531 630 T3

```

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
      260                               265                               270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
      275                               280
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
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
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
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
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala
      450                               455                               460

```

<210> 214  
 <211> 458  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-458

10

<400> 214

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys  
 450 455

<210> 215  
 <211> 456  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>

<223> HuPH20 precursor 1-456

<400> 215

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 |
|     |     |     | 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| Val | Lys | Asp | Thr | Asp | Ala | Val | Asp |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

ES 2 531 630 T3

<210> 216  
 <211> 454  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-454

10

<400> 216

```

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
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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Val Lys Asp Thr Asp Ala  
 450

<210> 217  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-452

10

<400> 217

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
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
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
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
      305                310                315
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
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
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
Val Lys Asp Thr
      450

```

<210> 218  
 <211> 450  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-450

10 <400> 218

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
  1      5      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
      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

```

ES 2 531 630 T3

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Val Lys  
 450

<210> 219  
 <211> 508  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-508

<400> 219

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 |
|     |     |     | 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| Val | Lys | Asp | Thr | Asp | Ala | Val | Asp | Val | Cys | Ile | Ala | Asp | Gly | Val | Cys |



ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | 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 |     |
| Ser | Ile | Leu | Phe | Leu | Ile | Ile | Ser | Ser | Val | Ala | Ser |     |     |     |     |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 220  
 <211> 506  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-506

10

<400> 220

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 |
|     |     |     | 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 |     |     |     |     |
| 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
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
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
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
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
Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val
          500          505

```

<210> 221  
 <211> 504  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-504

10

<400> 221

```

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

```

ES 2 531 630 T3

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser  
 500

<210> 222  
 <211> 502  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-502

10

<400> 222

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
          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
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
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
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
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
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
Ser Ile Leu Phe Leu Ile

```

500

<210> 223  
 <211> 500  
 <212> PRT

5

ES 2 531 630 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> HuPH20 precursor 1-500

5

<400> 223

```

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
      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
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
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

```

ES 2 531 630 T3

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  
 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  
 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  
 Ser Ile Leu Phe  
 500

<210> 224  
 <211> 498  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-498

<400> 224

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
      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
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
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
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
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
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
Ser Ile

```

<210> 225  
 <211> 496  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-496

10 <400> 225

```

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

```

ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     | 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 |
|     |     |     | 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |

<210> 226  
 <211> 494  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursora 1-494

<400> 226

5

10



ES 2 531 630 T3

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 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  
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  
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  
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  
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  
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

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  
485 490

<211> 492  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-492

<400> 227

```

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
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
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
    
```

10

```

                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
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
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
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
                485                                490

```

<210> 228  
 <211> 488  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-488

10 <400> 228

```

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 485

<210> 229  
 <211> 486  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 precursor 1-486

10

<400> 229

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 |
|     |     |     | 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 |     |     |     |     |
| 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 |
| 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 |     |     |     |
| 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 |
| 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 |     |     |     |
| 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 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 230  
 <211> 472  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-507

10 <400> 230

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 465 470

ES 2 531 630 T3

<212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 5 <223> HuPH20 madura 36-505

<400> 231

```

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
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
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
 65      70      75
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
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
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
 145     150     155
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
 165     170     175
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
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
 225     230     235
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
 245     250     255
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
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
 305     310     315
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
    
```

ES 2 531 630 T3

```

                325                330                335
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
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
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
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
                465                470

```

<210> 232  
 <211> 468  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-503

10 <400> 232

```

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1      5      10
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
                20      25
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
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
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
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
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

```



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  
 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  
 Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys 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  
 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  
 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  
 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  
 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu  
 450 455 460  
 Phe Leu Ile Ile  
 465

<210> 233  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-501

10

<400> 233

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  
 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  
 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  
 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
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
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
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
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
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
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
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
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
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu
   450                455                460
Phe Leu
   465

```

- <210> 234
- <211> 464
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- <220>
- <223> HuPH20 madura 36-499
- 10 <400> 234

```

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
  1                5                10                15

```

ES 2 531 630 T3

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  
 Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr  
 50 55 60  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu  
 450 455 460

<210> 235  
 <211> 462  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> esHuPH20 36-497

5

10

<400> 235

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
  
 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  
 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  
 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser  
 450 455 460

5 <210> 236  
 <211> 460  
 <212> PRT

ES 2 531 630 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> esHuPH20 36-495

5

<400> 236

```

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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile
      450                455                460

```

<210> 237  
 <211> 458  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> esHuPH20 36-493

<400> 237

```

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
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
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
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
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
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

```

ES 2 531 630 T3

Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu  
 210 215 220  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met  
 450 455

<210> 238  
 <211> 456  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> esHuPH20 36-491

10 <400> 238

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  
 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  
 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  
 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

ES 2 531 630 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Tyr | Lys | Asn | Arg | Ser | Ile | Glu | Leu | Val | Gln | Gln | Gln | Asn | Val | Gln | Leu |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| Ala | Ser | Pro | Ser | Thr | Leu | Ser | Ala |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 450 |     |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 239  
 <211> 454  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-489

10 <400> 239

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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  |     |     |



ES 2 531 630 T3

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Ala Ser Pro Ser Thr Leu  
 450

<210> 240  
 <211> 455  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-490

<400> 240

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser  
 450 455

<210> 241  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

## ES 2 531 630 T3

<220>

<223> HuPH20 madura 36-487

5 <400> 241

ES 2 531 630 T3

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Ala Ser Pro Ser  
 450

<210> 242  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 531 630 T3

<220>

<223> HuPH20 madura 36-485

5

<400> 242

```

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
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
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
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
 100     105
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
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
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
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
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
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
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
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
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
Ala Ser
 450

```

ES 2 531 630 T3

<210> 243  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-484

10

<400> 243

```

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
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
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
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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Ala

<210> 244  
 <211> 441  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-476

10

<400> 244

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  
 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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
                               435                              440

```

<210> 245  
 <211> 440  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-475

10

<400> 245



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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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

435

440

5 <210> 246  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-474

<400> 246

```

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1      5      10
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
      20      25
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
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
      65      70      75
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
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
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
      145      150      155
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
      165      170      175
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
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
      225      230      235
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
      245      250      255
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
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
      305      310      315
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
      325      330      335
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
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
      385      390      395
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
      405      410      415
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
      435

```

5

<210> 247  
 <211> 438  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>

<223> HuPH20 madura 36-473

<400> 247

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
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
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
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
      100     105
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
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
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
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
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
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
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
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
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
      435

```

<210> 248

<211> 437  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>  
 <223> HuPH20 madura 36-472

<400> 248

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala  
 420 425 430  
 Phe Leu Lys Pro Pro  
 435

10

ES 2 531 630 T3

<210> 249  
 <211> 436  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-471

10

<400> 249

```

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
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
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
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
    
```

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala  
 420 425 430  
 Phe Leu Lys Pro  
 435

<210> 250  
 <211> 435  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-470

10 <400> 250

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  
 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  
 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  |     |
| 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 |     |     |     |     |
| 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 |
| 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| Thr | Asp | Ala | Val | Asp | Val | Cys | Ile | Ala | Asp | Gly | Val | Cys | Ile | Asp | Ala |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Phe | Leu | Lys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     | 435 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 251  
 <211> 434  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-469

10

<400> 251

ES 2 531 630 T3

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala  
 420 425 430  
 Phe Leu

<210> 252  
 <211> 433  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-468

<400> 252

5

10



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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala  
 420 425 430  
 Phe

5 <210> 253  
 <211> 431  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> HuPH20 madura 36-466

<400> 253

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
  
 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  
 Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp  
 420 425 430

5

<210> 254  
 <211> 430  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

ES 2 531 630 T3

<220>

<223> HuPH20 madura 36-465

<400> 254

5

```

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1      5      10
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
 20
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
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
 65      70      75
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
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
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
 145      150      155
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
 165      170      175
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
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
 225      230      235
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
 245      250      255
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
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
 305      310      315
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
 325      330      335
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
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
 385      390      395
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
 405      410      415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile
 420      425      430

```

<210> 255

<211> 429

<212> PRT

10

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> HuPH20 madura 36-464

5

<400> 255

```

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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
          420          425

```

10

<210> 256

<211> 427

ES 2 531 630 T3

<212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 5 <223> HuPH20 madura 36-462

<400> 256

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly  
 420 425

10

<210> 257

<211> 425  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>  
 <223> HuPH20 madura 36-460

<400> 257

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  
 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  
 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

10

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala  
 420 425

<210> 258

<211> 423  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>  
 <223> HuPH20 madura 36-458

<400> 258

10

```

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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys
          420
    
```

ES 2 531 630 T3

<210> 259  
 <211> 421  
 <212> PRT  
 5 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-456

10 <400> 259

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Thr Asp Ala Val Asp  
 420



# ES 2 531 630 T3

<210> 260  
<211> 419  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<220>  
<223> HuPH20 madura 36-454

10

<400> 260

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Thr Asp Ala

<210> 261  
 <211> 417  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-452

<400> 261

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Thr

5

<210> 262  
 <211> 415  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>

<223> HuPH20 madura 36-450

<400> 262

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 405 410 415

5

<210> 263

<211> 473

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> HuPH20 madura 36-508

<400> 263

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 465 470

ES 2 531 630 T3

<210> 264

<211> 471

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> HuPH20 madura 36-506

10 <400> 264

```

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
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
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
    
```

ES 2 531 630 T3

```

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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
      465      470

```

<210> 265  
 <211> 469  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-504

10 <400> 265

ES 2 531 630 T3

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu  
 450 455 460  
 Phe Leu Ile Ile Ser  
 465

<210> 266

<211> 467



ES 2 531 630 T3

<212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 5 <223> HuPH20 madura 36-502

<400> 266

```

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
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
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
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
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
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
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
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
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
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
  
```

ES 2 531 630 T3

```

                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
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                390                395
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                410                415
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
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu
450                455                460
Phe Leu Ile
465

```

<210> 267  
 <211> 465  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-500

10 <400> 267

```

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1      5      10
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
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
 50      55      60
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
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
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
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
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225     230     235     240

```

ES 2 531 630 T3

Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile  
 245 250 255  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu  
 450 455 460  
 Phe  
 465

<210> 268  
 <211> 463  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-498

10 <400> 268

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  
 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  
 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  
 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
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145              150              155
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
      165              170              175
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
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225              230              235
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
      245              250              255
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
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305              310              315
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
      325              330              335
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
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385              390              395
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
      405              410              415
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
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile
      450              455              460

```

<210> 269  
 <211> 461  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> esHuPH20 36-496

10

<400> 269

```

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1              5              10
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

```

ES 2 531 630 T3

```

Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
 50      55      60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65      70      75
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
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
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145     150     155
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
165     170     175
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
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225     230     235
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
245     250     255
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
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305     310     315
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
325     330     335
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
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385     390     395
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
405     410     415
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
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
450     455     460

```

<210> 270  
 <211> 459  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> esHuPH20 36-494

10

<400> 270

ES 2 531 630 T3

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe  
 450 455

<210> 271  
 <211> 457  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

# ES 2 531 630 T3

<220>

<223> esHuPH20 36-492

5 <400> 271

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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
  
 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  
 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  
 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  
 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr  
 450 455

<210> 272  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*



ES 2 531 630 T3

<220>

<223> HuPH20 madura 36-488

5

<400> 272

```

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1      5      10
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
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
      50      55      60
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
Ala Ser Pro Ser Thr
      450

```

ES 2 531 630 T3

<210> 273  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> HuPH20 madura 36-486

10

<400> 273

```

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1      5      10
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
      20      25
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
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
      65      70      75
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
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
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 |     |
| 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |     |
| 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 |     |
| 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 |     |     |     |
| Ala | Ser | Pro |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     | 450 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

## REIVINDICACIONES

1. Una composición de insulina de acción súper rápida, que comprende:

5 una concentración terapéuticamente eficaz de un análogo de insulina de acción rápida para mantener los niveles de glucosa en sangre normales, donde:

el análogo de insulina de acción rápida es insulina glulisina o insulina aspart;

los niveles de glucosa en sangre son niveles de glucosa en sangre postprandiales; y

10 una concentración de una enzima degradante de hialuronano suficiente para hacer que la composición sea una composición de insulina de acción súper rápida tras la administración, donde la composición de insulina de acción súper rápida tiene un inicio de acción que se asemeja estrechamente a la liberación de insulina postprandial endógena de un sujeto no diabético; y

15 la composición de insulina de acción súper rápida se formula para una vía de administración seleccionada de entre la administración subcutánea, intramuscular, intradérmica e intraperitoneal.

2. La composición de la reivindicación 1, donde la cantidad de enzima degradante de hialuronano es funcionalmente equivalente a 10 Unidades, 20 Unidades, 30 Unidades, 40 Unidades, 50 Unidades, 100 Unidades, 150 Unidades, 200 Unidades, 250 Unidades, 300 Unidades, 350 Unidades, 400 Unidades, 450 Unidades, 500 Unidades, 600

20 Unidades, 700 Unidades, 800 Unidades, 900 Unidades, 1000 Unidades, 2.000 Unidades, 3.000 Unidades, 4.000 o más de actividad hialuronidasa.

3. La composición de la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde la cantidad de enzima degradante de hialuronano para insulina en la composición es 1 U de hialuronidasa /U de insulina (1:1) a 50:1, o es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1.

25

4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que se formula para administración de dosis individual, donde la cantidad de enzima degradante de hialuronano se formula para administrar al sujeto una dosificación prandial para una única comida y es 1 U, 2 U, 3 U, 4 U, 5 U, 10 U, 20 U, 30 U, 40 U, 50 U, 100 U, 150 U, 200 U, 250

30 U, 300 U, 350 U, 400 U, 450 U, 500 U, 600 U, 700 U, 800 U, 900 U, 1000 U, 2.000 U, 3.000 U, 4.000 Unidades, 5.000 U o más.

5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que se formula para administración de dosis múltiple o administración de dosis individual.

35

6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que se formula para suministro por un sistema de bucle cerrado, un bolígrafo de insulina o una bomba de insulina.

7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 donde, cuando la composición se formula para administración de dosificación individual, la cantidad de insulina para una única dosis es de 0,05 Unidades, 0,06

40 Unidades, 0,07 Unidades, 0,08 Unidades, 0,09 Unidades, 0,1 Unidades, 0,2 Unidades, 0,3 Unidades, 0,4 Unidades, 0,5 Unidades, 0,6 Unidades, 0,7 Unidades, 0,8 Unidades, 0,9 Unidades, 1 Unidad, 2 Unidades, 5 Unidades, 10 Unidades, 15 Unidades, 20 Unidades, 25 Unidades, 30 Unidades, 35 Unidades, 40 Unidades o 50 Unidades.

8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que comprende además uno o más ingredientes opcionales seleccionados de entre un agente quelante, cinc, un estabilizador, un conservante y un eliminador de oxígeno.

45

9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 donde el análogo de insulina se selecciona de entre una insulina que tiene una cadena A con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC N°: 103 y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 147 o 149.

50

10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la enzima degradante de hialuronano es una hialuronidasa o una condroitinasa.

55

11. La composición de la reivindicación 10, donde la hialuronidasa es una PH20, o una forma truncada de la misma para retirar todo o una parte de un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI).

60

12. La composición de la reivindicación 11, donde la PH20 se selecciona de una PH20 ovina, bovina o humana truncada.

60

13. La composición de la reivindicación 12, donde la PH20 humana truncada se selecciona de entre los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID N°: 4-9, o variantes de los mismos que tienen 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con los polipéptidos expuestos en cualquiera de SEC ID N°: 4-9 y que conservan la actividad hialuronidasa.

65

14. La composición de la reivindicación 1, donde una composición de insulina de acción súper rápida, que tiene un inicio de acción que es más rápido que el análogo solo, y una duración de acción que es más corta que el análogo solo, por lo que, tras la administración, la composición se asemeja estrechamente a la respuesta de insulina postprandial fisiológica de un sujeto no diabético para conseguir control glucémico.
- 5 15. Una jeringa o frasco, que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
16. Un sistema de bucle cerrado, que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
- 10 17. Una bomba de insulina, que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
18. Un bolígrafo de insulina, que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
- 15 19. Un sistema de bucle cerrado para controlar los niveles de glucosa en sangre en el sujeto, que comprende:  
 un análogo de insulina de acción rápida, donde el análogo de insulina de acción rápida es insulina glulisina o insulina aspart, y una enzima degradante de hialuronano;  
 el análogo de insulina de acción rápida y la enzima degradante de hialuronano están en el mismo o diferentes depósitos,  
 20 donde el sistema de bucle cerrado se asemeja estrechamente a la respuesta de insulina endógena en un sujeto no diabético.
20. El sistema de bucle cerrado de la reivindicación 19, que comprende además uno o más de un sensor de glucosa, un sistema de suministro para suministrar la enzima degradante de hialuronano e insulina de acción rápida, y software programado para integrar las funciones de bombeo y control, por lo que la enzima degradante de hialuronano y la insulina de acción rápida se suministran para conseguir control glucémico que se asemeja al control glucémico en un sujeto no diabético.
- 25 21. El sistema de bucle cerrado de la reivindicación 20, donde el análogo de insulina se selecciona de entre una insulina con una cadena A con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 103 y una cadena B con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 147 o 149.
- 30 22. El sistema de bucle cerrado de cualquiera de las reivindicaciones 19-21, donde el depósito que contiene la insulina de acción rápida contiene 0,1 Unidades, 0,2 Unidades, 0,3 Unidades, 0,4 Unidades, 0,5 Unidades, 0,6 Unidades, 0,7 Unidades, 0,8 Unidades, 0,9 Unidades, 1 Unidad, 2 Unidades, 5 Unidades, 10 Unidades, 15 Unidades, 20 Unidades, 25 Unidades, 30 Unidades, 35 Unidades, 40 Unidades, 50 Unidades, 100 Unidades, 200 Unidades, 300 Unidades, 400 Unidades, 500 Unidades, 600 Unidades, 700 Unidades, 800 Unidades, 900 Unidades, 1000 Unidades, 2000 Unidades, 5000 Unidades, 6000 Unidades, 7000 Unidades o más de insulina.
- 35 23. El sistema de bucle cerrado de cualquiera de las reivindicaciones 19-22, donde el sistema es capaz de suministrar la insulina de acción rápida en incrementos de dosis individuales de 0,1 Unidades, 0,2 Unidades, 0,3 Unidades, 0,4 Unidades, 0,5 Unidades, 0,6 Unidades, 0,7 Unidades, 0,8 Unidades, 0,9 Unidades, 1 Unidad, 2 Unidades, 5 Unidades, 10 Unidades, 15 Unidades, 20 Unidades, 25 Unidades, 30 Unidades, 35 Unidades, 40 Unidades, 50 Unidades o más de insulina.
- 40 24. El sistema de bucle cerrado de cualquiera de las reivindicaciones 19-23, donde el depósito que contiene la enzima degradante de hialuronano contiene una cantidad de enzimas degradante de hialuronano que es funcionalmente equivalente a 0,3 Unidades, 0,5 Unidades, 1 Unidad, 2 Unidades, 5 Unidades, 10 Unidades, 20 Unidades, 30 Unidades, 40 Unidades, 50 Unidades, 100 Unidades, 150 Unidades, 200 Unidades, 250 Unidades, 300 Unidades, 350 Unidades, 400 Unidades, 450 Unidades, 500 Unidades, 600 Unidades, 700 Unidades, 800 Unidades, 900 Unidades, 1.000 Unidades, 2.000 Unidades, 3.000 Unidades, 4.000 Unidades, 5.000 Unidades, 6.000 Unidades, 7.000 Unidades, 8.000 Unidades, 9.000 Unidades, 10.000 Unidades, 20.000 Unidades o más actividad hialuronidasa.
- 45 25. El sistema de bucle cerrado de cualquiera de las reivindicaciones 19-24, donde el sistema es capaz de suministrar la enzima degradante de hialuronano en incrementos de dosis individuales de una cantidad de enzima degradante de hialuronano que es funcionalmente equivalente a 0,3 Unidades, 0,5 Unidades, 1 Unidad, 2 Unidades, 3 Unidades, 5 Unidades, 10 Unidades, 20 Unidades, 30 Unidades, 40 Unidades, 50 Unidades, 100 Unidades, 150 Unidades o más de actividad hialuronidasa.
- 50 26. Un método para preparar una composición de insulina de acción súper rápida de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que comprende:  
 seleccionar un análogo de insulina de acción rápida, donde el análogo de insulina de acción rápida es insulina glulisina o insulina aspart; y combinarlo con una cantidad suficiente de enzima degradante de hialuronano para hacer que la composición sea una composición de insulina de acción súper rápida, donde una composición de
- 55  
60  
65

insulina de acción súper rápida tiene un inicio de acción que se asemeja estrechamente a la liberación de insulina postprandial endógena de un sujeto no diabético.

5 27. Uso de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para preparar un medicamento para mantener los niveles de glucosa en sangre normales en un sujeto.

28. Uso de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para preparar un medicamento para administración a un diabético menos de 15 minutos antes de una comida hasta 10 minutos después de una comida o con una comida para controlar los niveles de glucosa en sangre postprandiales en el sujeto.

10 29. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para uso para administración a un diabético menos de 15 minutos antes de una comida hasta 10 minutos después de una comida o con una comida para controlar los niveles de glucosa en sangre postprandiales en un sujeto.

Perfil farmacocinético de insulina de acción rápida con o sin co-administración de rHuPH20.

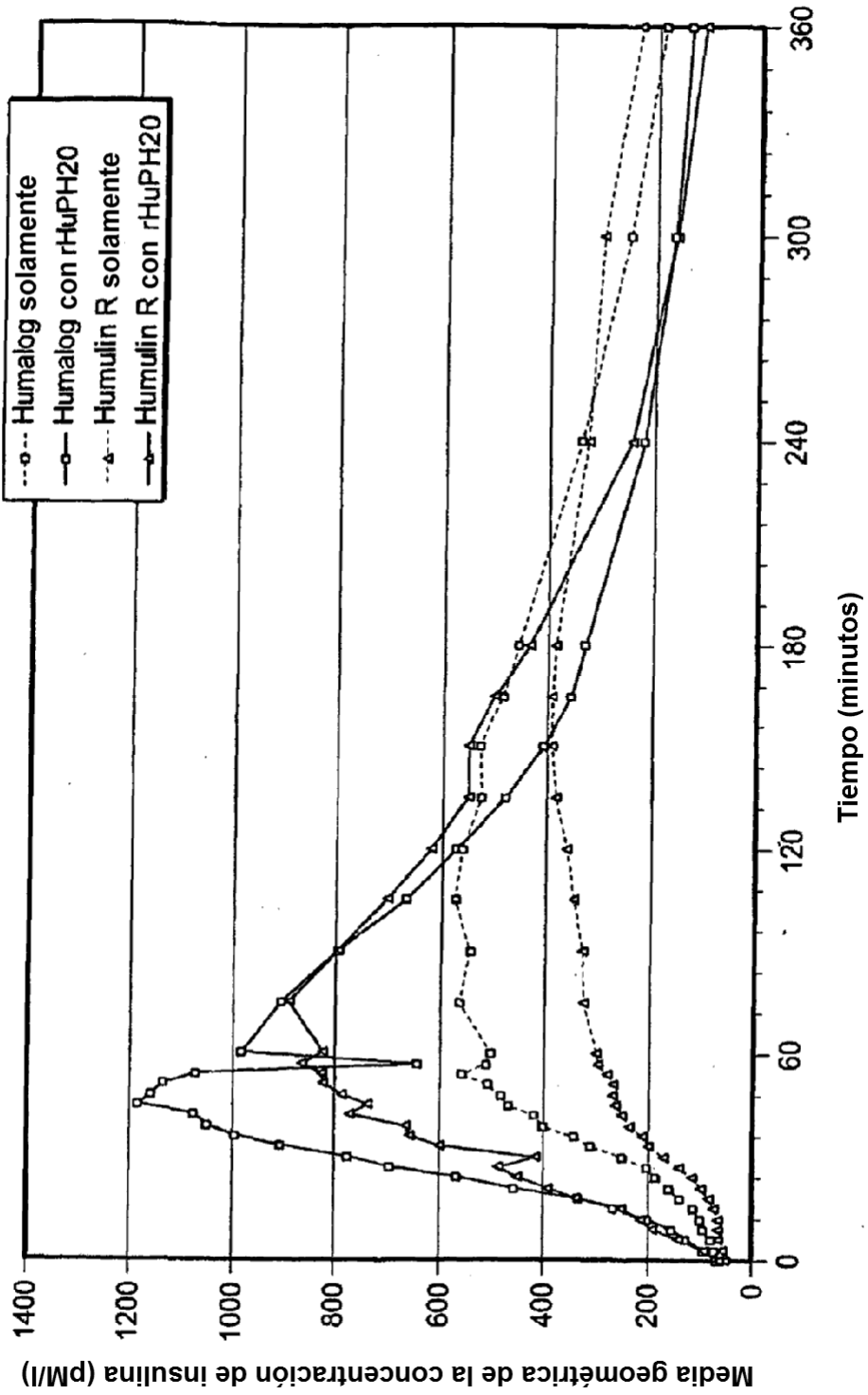


FIG. 1

Perfil farmacodinámico de insulina de acción rápida con o sin co-administración de rHuPH20.

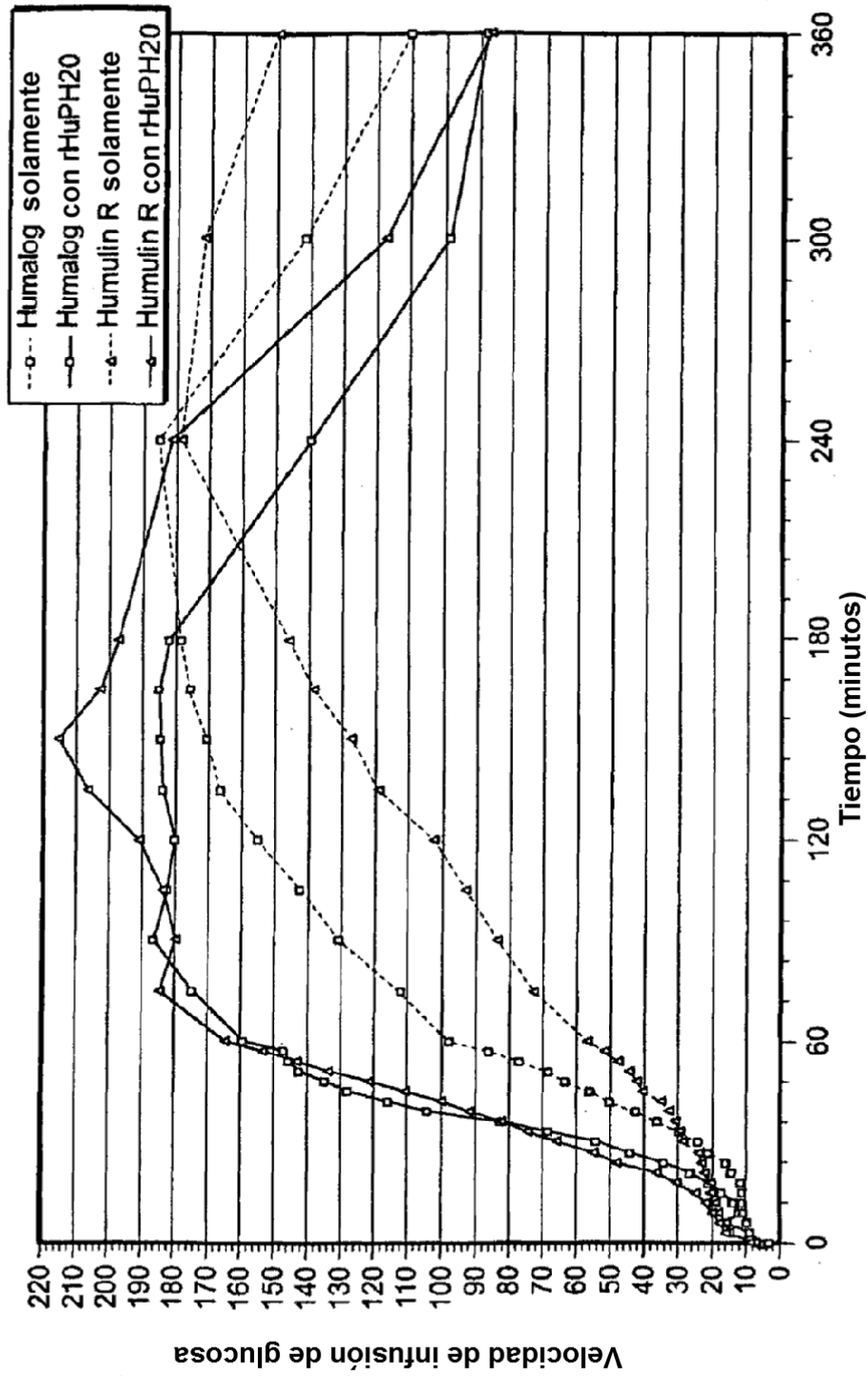


FIG. 2