

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 340**

51 Int. Cl.:

C12N 9/26

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2009** **E 09718114 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015** **EP 2268805**

54 Título: **Producción a gran escala de hialuronidasa soluble**

30 Prioridad:

06.03.2008 US 68622 P

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

05.06.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BAKER, DAVID y
BOOKBINDER, LOUIS

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 537 340 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

Producción a gran escala de hialuronidasa soluble**5 Campo de la invención**

Se proporcionan métodos para la producción a gran escala de una proteína humana recombinante.

Antecedentes

10 Las hialuronidasas son una familia de enzimas que degradan el ácido hialurónico (también conocido como hialuronano o hialuronato), un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente principal de la barrera intersticial. Al catalizar la hidrólisis de ácido hialurónico, la hialuronidasa reduce la viscosidad del ácido hialurónico, lo que aumenta la permeabilidad del tejido. Como tales, se han utilizado hialuronidasas, por ejemplo, como un agente de diseminación o de dispersión junto con otros agentes, fármacos y proteínas para mejorar su dispersión y liberación. Las hialuronidasas también tienen otros usos terapéuticos y cosméticos. Debido a la creciente utilización de hialuronidasas para usos terapéuticos y cosméticos, hay una necesidad de cantidades a gran escala de hialuronidasa purificada. Por lo tanto, entre los objetos de la presente memoria, existe el objeto de proporcionar métodos para la producción y purificación de hialuronidasas.

20 La Publicación de los Estados Unidos Núm. 2004026825 describe glicoproteínas hialuronidasas activas neutras solubles (sHASECP), incluyendo formas solubles de PH20 humana (sHuPH20). Los métodos para la producción de sHASEGP se describen, pero no se extienden a la producción a gran escala de hialuronidasas solubles.

25 Compendio

En la presente memoria se proporcionan métodos para la producción y purificación de rHuPH20 soluble. Los métodos proporcionados en este documento se pueden utilizar para producir y purificar cualquier cantidad de rHuPH20 soluble. Por ejemplo, los métodos y etapas descritos en la presente memoria son modificables para el aumento de la escala o la disminución de la escala, como sería evidente para un experto en la técnica.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para producir rHuPH20 soluble, en donde rHuPH20 soluble se refiere a una forma soluble de PH20 humana (también conocida como proteína PH20 de la superficie de espermatozoides) que se expresa de forma recombinante por ejemplo en células de ovario de hámster chino (CHO), comprendiendo el método:

35 a) inocular medio celular en un biorreactor con un inóculo de células que codifican rHuPH20 soluble para producir un cultivo celular, en donde:

40 las células comprenden entre 150 y 300 copias de ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble;
el biorreactor contiene al menos 100 litros de cultivo celular;
se inoculan 10^{10} - 10^{11} células por 100 litros de cultivo celular; y
las células se cultivan a una temperatura de ajuste;

45 b) alimentar las células con un primer medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, insulina humana y extracto de levadura en cantidades suficientes para aumentar el crecimiento celular y la densidad de células máxima, y para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble, en donde el medio de alimentación se añade al cultivo en un volumen de 0,5% a 20% del volumen de cultivo celular;

50 c) alimentar las células con un segundo medio de alimentación que contienen glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble e inducir la detención del ciclo celular; y
reducir la temperatura en comparación con la temperatura en la etapa a) a una temperatura suficiente para aumentar la detención del ciclo celular, aumentar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble; en donde:

55 la cantidad de L-alanil-L-glutamina se reduce en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina de la etapa b);
la cantidad de extracto de levadura aumenta en comparación con la cantidad de extracto de levadura de la etapa b); y
se añade el medio de alimentación al cultivo en un volumen de 0,5% a 20% del volumen de cultivo celular;

60 d) alimentar las células con un tercer medio de alimentación que contienen glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble y aumentar la detención del ciclo celular, y

reducir la temperatura en comparación con la temperatura en la etapa c) a una temperatura suficiente para aumentar la detención del ciclo celular, aumentar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble; en donde:

5 la cantidad de L-alanil-L-glutamina se reduce en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina de la etapa c);
las cantidades de extracto de levadura, glucosa y butirato de sodio aumentan en comparación con las cantidades de extracto de levadura, glucosa y butirato de sodio de la etapa c); y
se añade el medio de alimentación al cultivo en un volumen de 0,5% o al 20% del volumen de cultivo celular;

10 e) alimentar las células con un cuarto medio de alimentación que contienen glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble y aumentar la detención del ciclo celular, y
15 reducir la temperatura en comparación con la temperatura de la etapa d) a una temperatura suficiente para aumentar la detención del ciclo celular, aumentar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble; en donde:

20 la cantidad de L-alanil-L-glutamina y la glucosa se reduce en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina y glucosa de la etapa d);
la cantidad de butirato de sodio se reduce en comparación con la cantidad de butirato de sodio de la etapa d); y
se añade el medio de alimentación al cultivo en un volumen de 0,5% a 20% del volumen de cultivo celular;

25 f) continuar cultivando las células hasta que la viabilidad cae por debajo de al menos 50%;
g) obtener el líquido de cultivo celular recolectado; y
h) purificar rHuPH20 del fluido del cultivo celular recolectado.

30 El líquido de cultivo celular recolectado se puede filtrar antes de la purificación. En algunos ejemplos, la temperatura en la etapa a) es de 37°C, la temperatura en la etapa c) es 36,5°C, la temperatura en la etapa d) es de 36°C y la temperatura en la etapa e) es 35,5°C. La purificación de rHuPH20 soluble se puede efectuar mediante cromatografía en columna, tal como cromatografía en columna con cuentas de agarosa entrecruzada, cromatografía en columna con cuentas de agarosa sustituida con fenilo entrecruzada, cromatografía en columna con aminofenilboronato y cromatografía en columna con hidroxipatita.

35 En un ejemplo, el método para producir rHuPH20 soluble de acuerdo con el primer aspecto de la invención indicado anteriormente, incluye las etapas (a) a (h) en donde:

en la etapa a), las células se cultivan a 37°C;
en la etapa b) el primer medio de alimentación contiene 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 32 mM, 16,6 g/L de extracto de levadura y 33 mg/L de insulina, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular;
40 en la etapa c) el segundo medio de alimentación contiene 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 16 mM, 33,4 g/L de extracto de levadura y 0,92 g/L de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade a la de cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular; y
45 la temperatura se reduce a 36,5°C;
en la etapa d) el tercer medio de alimentación contiene 50 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 10 mM, 50 g/L de extracto de levadura y 1,8 g/L de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular; y
la temperatura se reduce a 36°C;
50 en la etapa e) el cuarto medio de alimentación contiene 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 6,6 mM, 50 g/L de extracto de levadura y 0,92 g/L de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular; y
la temperatura se reduce a 35,5°C; comprendiendo adicionalmente
filtrar el líquido de cultivo celular recolectado obtenido en la etapa g) y
55 en la etapa h) purificar rHuPH20 del líquido de cultivo recolectado utilizando cromatografía en columna con cuentas de agarosa entrecruzada, cromatografía en columna con cuentas de agarosa sustituida con fenilo entrecruzada, cromatografía en columna con aminofenilboronato y cromatografía de columna con hidroxipatita.

60 En otro ejemplo, el método para producir rHuPH20 soluble de acuerdo con el primer aspecto de la invención indicado anteriormente incluye las etapas (a) a (h) en donde:

en la etapa a) las células se inoculan a una densidad celular de 4×10^5 células/mL; y
las células se cultivan a 37°C;
en la etapa b) el primer medio de alimentación contiene 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 32 mM, 83,3

g/L de extracto de levadura y 33 mg/L de insulina, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4 del volumen de cultivo celular;

en la etapa c) el segundo medio de alimentación contiene 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 13 mM, 166,7 g/L de extracto de levadura y 0,92 g/L de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular; y

la temperatura se reduce a 36,5°C;

en la etapa d) el tercer medio de alimentación contiene 50 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 10 mM, 250 g/L de extracto de levadura y 1,8 g/L de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular; y

la temperatura se reduce a 36°C;

en la etapa e) el cuarto medio de alimentación contiene 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 6,7 mM, 250 g/L de extracto de levadura y 0,92 g/L de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4 del volumen de cultivo celular; y

la temperatura se reduce a 35,5°C; comprendiendo adicionalmente

filtrar el líquido de cultivo celular recolectado obtenida en la etapa g) y

en la etapa h) purificar rHuPH20 del líquido de cultivo recolectado utilizando cromatografía en columna con cuentas de agarosa entrecruzada, cromatografía en columna con cuentas de agarosa sustituida con fenilo entrecruzada, cromatografía en columna con aminofenilboronato y cromatografía de columna con hidroxiapatita.

En algunos ejemplos, el volumen de cultivo celular en el biorreactor es o es de aproximadamente 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 o 3500 litros. En algunos ejemplos, la cantidad de rHuPH20 soluble producida por 100 L de cultivo celular utilizando los métodos proporcionados en la presente memoria es al menos o aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 gramos de rHuPH20 soluble. La actividad específica de rHuPH20 soluble puede ser al menos o aproximadamente 80000, 100000, 120000, 140000, 160000 o 180000 unidades/mg. Las células que codifican rHuPH20 soluble pueden, en algunos casos, ser células CHO DG44. Adicionalmente, la rHuPH20 puede ser codificada por el ácido nucleico mostrado en el SEQ ID NO: 47.

Descripción detallada

Esquema

A. Definiciones

B. Información general

C. Hialuronidasa

1. Estructura y función

2. PH20

3. Usos terapéuticos de las hialuronidasas

a. Uso como agente de dispersión

b. Uso en hipodermocclisis

c. Uso en vitrectomía y trastornos y afecciones oftálmicas

d. Uso en terapia génica

e. Usos cosméticos

f. Uso en el trasplante de órganos

g. Uso en el tratamiento del cáncer

h. Uso en el tratamiento de la acumulación de glicosaminoglicanos en el cerebro

i. Uso en el tratamiento de la acumulación de glicosaminoglicanos en enfermedades cardiovasculares

j. Uso en enfermedades pulmonares

k. Otros usos

D. Células que expresan hialuronidasa

a. Células 3D35M

b. Células 2B2

E. Expansión del cultivo celular

F. Producción de proteínas

G. Concentración de proteína G y cambio de tampón

H. Purificación

1. Columna con cuentas de agarosa entrecruzada

2. Columna con cuentas de agarosa sustituida con fenilo entrecruzada

3. Columna con aminofenilboronato

4. Columna con hidroxiapatita

6. Eliminación de virus, concentración de proteína y cambio de tampón

I. Carga

J. Seguimiento y análisis**1. Condiciones de seguimiento****2. Seguimiento de la producción de rHuPH20 soluble****K. Ejemplos****A. Definiciones**

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente comprendido por un experto en la técnica a la que pertenecen la invención o invenciones.

En caso de que haya una pluralidad de definiciones de términos en la presente memoria, prevalecerán los de esta sección. Cuando se haga referencia a una URL u otro identificador o dirección, se entiende que tales identificadores pueden cambiar y la información concreta en Internet se sucede, pero se puede encontrar información equivalente buscando en Internet. La referencia a esto evidencia la disponibilidad y difusión pública de dicha información.

Según se utiliza en la presente memoria, hialuronidasa se refiere a una enzima que degrada ácido hialurónico. Las hialuronidasas incluyen hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.99.1), hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos (EC 3.2.1.36), y hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35). Las hialuronidasas también incluyen cualquiera de origen no humano, incluyendo, pero no limitado a, murino, canino, felino, leporino, aviar, bovino, ovino, porcino, equino, de peces, de ranas, bacteriano, y cualquiera de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas no humanas ilustrativas incluyen, hialuronidasas de vacas (SEQ ID NO: 10), avispa chaqueta amarilla (SEQ ID NOS: 11 y 12), abeja melífera (SEQ ID NO: 13), avispa de cara blanca (SEQ ID NO: 14), avispa de papel (SEQ ID NO: 15), ratón (SEQ ID NOS: 16-18, 29), cerdo (SEQ ID NOS: 19-20), rata (SEQ ID NOS: 21-23, 28), conejo (SEQ ID NO: 24), oveja (SEQ ID NO: 25), orangután (SEQ ID NO: 26), mono cynomolgus (SEQ ID NO: 27), cobaya (SEQ ID NO: 30), *Staphylococcus aureus* (SEQ ID NO: 31), *Streptococcus pyogenes* (SEQ ID NO: 32), y *Clostridium perfringens* (SEQ ID NO: 33). Las hialuronidasas humanas ilustrativas incluyen HYAL1 (SEQ ID NO: 34), HYAL2 (SEQ ID NO: 35), HYAL3 (SEQ ID NO: 36), HYAL4 (SEQ ID NO: 37), y PH20 (SEQ ID NO: 1). También se incluyen entre las hialuronidasas PH20 humana soluble y rHuPH20 soluble.

Las referencias a las hialuronidasas incluyen polipéptidos de hialuronidasa precursores y polipéptidos de hialuronidasa maduros (tales como aquellos en los que se ha eliminado una secuencia de señal), formas truncadas de los mismos que tienen actividad, e incluyen variantes y variantes de especie alélica, variantes codificadas por variantes de empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia con los polipéptidos precursores mostrados en los SEQ ID NOS: 1 y 10-37, o la forma madura de los mismos. Por ejemplo, la referencia a la hialuronidasa también incluye las variantes de polipéptidos precursores de PH20 humana mostrados en los SEQ ID NOS: 48-49. Las hialuronidasas también incluyen aquellas que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y aquellas que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, albuminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y otras modificaciones de polipéptidos conocidos en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, PH20 humana soluble o sHuPH20 incluyen polipéptidos maduros que carecen de toda o una porción del sitio de anclaje a glicosilfosfatidil inositol (GPI) en el extremo C-terminal de manera que tras la expresión, los polipéptidos son solubles. Los polipéptidos sHuPH20 ilustrativos incluyen polipéptidos maduros que tienen una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOS: 4-9 y 45-46. Los polipéptidos precursores para tales polipéptidos sHuPH20 ilustrativos incluyen una secuencia señal. Los ejemplos de los precursores son los mostrados en los SEQ ID NOS: 3 y 38-44, cada uno de los cuales contiene una secuencia señal de 35 aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1-35. Los polipéptidos HuPH20 solubles incluyen también los degradados durante o después de los métodos de producción y purificación descritos en la presente memoria.

Según se utiliza en la presente memoria, rHuPH20 soluble 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 soluble es codificada por el ácido nucleico que incluye la secuencia señal y se muestra en SEQ ID NO: 47. También se incluyen moléculas de ADN que son variantes alélicas de la misma y otras variantes solubles. El ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble se expresa en células CHO que secretan el polipéptido maduro. A medida que se produce en el medio de cultivo existe heterogeneidad en el extremo C-terminal de manera que el producto incluye una mezcla de especies que pueden incluir uno o más de los SEQ ID NOS: 4-9 en diversa abundancia. También se incluyen las variantes alélicas correspondientes y otras variantes, incluyendo las correspondientes a los polipéptidos PH20 humanos precursores mostrados en los SEQ ID NOS: 48-49. Otras variantes pueden tener 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con cualquiera de los SEQ ID NOS: 4, siempre que conserven actividad hialuronidasa y sean solubles.

Según se utiliza en la presente memoria, "células que expresan rHuPH20 soluble" se refiere a cualquier célula CHO que exprese rHuPH20 soluble. Las células que expresan rHuPH20 soluble ilustrativas incluyen células 2B2 y 3D35M. Las células que expresan rHuPH20 soluble son células CHO en las que se ha introducido el ácido nucleico que contiene la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 55.

Según se utiliza en la presente memoria, la actividad hialuronidasa se refiere a cualquier actividad exhibida por un polipéptido de hialuronidasa. Tales actividades se pueden someter a ensayo *in vitro* y/o *in vivo* e incluyen, pero no se limitan a, la actividad enzimática, por ejemplo para efectuar la escisión de ácido hialurónico, capacidad para actuar como agente de dispersión o de diseminación y antigenicidad. La actividad de la hialuronidasa se refiere a cualquier actividad exhibida por un polipéptido de hialuronidasa.

Según se utiliza en la presente memoria, la actividad enzimática se refiere a la actividad de una hialuronidasa, tal como se evaluó en análisis enzimáticos *in vitro*, para escindir un sustrato, tal como ácido hialurónico. Los análisis *in vitro* para determinar la actividad enzimática de la hialuronidasas, tales como rHuPH20 soluble, son conocidos en la técnica y se describe en la presente memoria. Los análisis ilustrativos incluyen el análisis de microturbidez descrito a continuación (véase p. ej. el Ejemplo 9 y la sección I) que mide la escisión de ácido hialurónico por la hialuronidasa indirectamente mediante la detección del precipitado insoluble formado cuando el ácido hialurónico no escindido se une a la albúmina sérica.

Según se utiliza en la presente memoria, la actividad específica con referencia a rHuPH20 soluble es la actividad enzimática relativa a la cantidad de rHuPH20 soluble. La actividad específica se calcula dividiendo la actividad enzimática (unidades/mL) por la concentración de proteína (mg/mL).

Según se utiliza en la presente memoria, "exhibe al menos una actividad" o "conserva al menos una actividad" se refiere a la actividad exhibida por una variante rHuPH20 soluble en comparación con cualquier rHuPH20 soluble mostrada en los SEQ ID NO: 4-9 bajo las mismas condiciones. Típicamente, una variante de rHuPH20 soluble que conserva o exhibe al menos una actividad de una rHuPH20 soluble mostrada en el SEC ID NOS: 4-9 conserva una actividad de, o de aproximadamente, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% la actividad de una rHuPH20 soluble mostrada en los SEQ ID NO: 4-9. Las actividades ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, la actividad de la hialuronidasa y la actividad enzimática.

Según se utiliza en la presente memoria, cromatografía en columna con cuentas de agarosa entrecruzada se refiere a cromatografía utilizando una columna cargada con cuentas de agarosa entrecruzada. La agarosa entrecruzada ilustrativa en cuentas es Q Sepharose™.

Según se utiliza en la presente memoria, cromatografía en columna con cuentas de agarosa sustituida con fenilo entrecruzada se refiere a cromatografía utilizando una columna cargada con cuentas de agarosa sustituida con fenilo entrecruzada. La agarosa sustituida con fenilo entrecruzada es Phenyl Sepharose™.

Según se utiliza en la presente memoria, cromatografía en columna con aminofenilboronato se refiere a cromatografía utilizando una columna empaquetada con aminofenilboronato-agarosa.

Según se utiliza en la presente memoria, cromatografía de columna con hidroxipatita se refiere a cromatografía utilizando una columna empaquetada con hidroxipatita.

Según se utiliza en la presente memoria, líquido de cultivo celular recolectado o líquido de cultivo celular cosechado (HCCF) se refiere al líquido obtenido después de la recolección de las células del biorreactor y la separación del medio de cultivo celular de las células, restos celulares y otros productos agregados. El cultivo celular que es cosechado del biorreactor se puede filtrar para aclarar el cultivo, eliminando las células, los restos celulares y otros productos agregados para dejar el líquido de cultivo celular cosechado.

Según se utiliza en la presente memoria, la densidad celular se refiere al número de células en un volumen dado de medio.

Según se utiliza en la presente memoria, la cultura o cultivo celular se refiere a una población de células que se suspende en un medio en condiciones adecuadas para mantener la viabilidad de las células o crecer las células.

Según se utiliza en la presente memoria, medio, medio celular o medio de cultivo celular se refiere a una disolución que contiene suficientes nutrientes para promover el crecimiento de las células en un cultivo. Típicamente, estas disoluciones contienen aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y/o oligoelementos. El medio también puede contener suplementos adicionales, tales como hormonas, factores de crecimiento e inhibidores del crecimiento. Se incluye la referencia a medio de cultivo celular

Según se utiliza en la presente memoria, los residuos de los α -aminoácidos de origen natural son los residuos de los 20 α -aminoácidos encontrados en la naturaleza que se incorporan a la proteína mediante el reconocimiento específico de la molécula de ARNt cargado con su codón de ARNm cognado en los seres humanos.

Según se utiliza en la presente memoria, "en cantidades suficientes para aumentar" cuando se refiere a una sustancia que incrementa parámetros tales como la velocidad de crecimiento celular, la densidad celular máxima, la síntesis de proteínas o la detención del ciclo celular se refiere a la cantidad de una sustancia que efectúa un aumento en uno de estos parámetros en comparación con el observado en ausencia de la sustancia. Los parámetros se pueden evaluar en presencia y ausencia de una sustancia, y se puede determinar la cantidad de sustancia que aumenta el parámetro (tal como la tasa de crecimiento celular, la densidad celular máxima, la síntesis de proteínas o la detención del ciclo celular) en comparación con la ausencia de la sustancia. La tasa de crecimiento, la densidad celular máxima, la síntesis de proteínas o detención del ciclo celular en presencia de la sustancia puede aumentarse en, o aproximadamente, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60 %, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más en comparación con la tasa de crecimiento, la densidad celular máxima, la síntesis de proteínas o la detención del ciclo celular en ausencia de la sustancia.

Según se utiliza en la presente memoria, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo ácidos peptidonucleicos (PNA) y mezclas de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla o doble. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, que están opcionalmente marcados, por ejemplo con un marcador detectable, tal como una marca fluorescente o radiomarca, se contemplan las moléculas de cadena sencilla. Dichas moléculas tienen típicamente una longitud tal que su diana es estadísticamente única o de bajo número de copias (típicamente menos de 5, generalmente menos de 3) para sondear o cebar una biblioteca. Generalmente una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de la 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.

Según se utiliza en la presente memoria, un péptido se refiere a un polipéptido que tiene de 2 a 40 aminoácidos de longitud.

Según se utiliza en la presente memoria, los aminoácidos que aparecen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente memoria se identifican de acuerdo con sus abreviaturas de tres letras o de una letra conocidas (Tabla 1). Los nucleótidos que aparecen en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las denominaciones de una sola letra convencionales utilizadas rutinariamente en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, un "aminoácido" es un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para los propósitos de la presente memoria, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos de origen natural, aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos en los que el carbono α tiene una cadena lateral).

Según se utiliza en la presente memoria, "residuo de aminoácido" se refiere a un aminoácido formado tras la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Se supone que los residuos de aminoácido descritos en la presente memoria están en la forma isomérica "L". Los residuos en la forma isomérica "D", que son designados de ese modo, pueden ser sustituidos por cualquier residuo de L-aminoácido, siempre que la propiedad funcional deseada sea retenida por el polipéptido. NH_2 se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino terminal de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxilo terminal de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura de polipéptidos convencional descrita en J. Biol. Chem., 243: 3552-3559 (1969), y adoptada 37 C. F. R. □ §§ 1.821-1.822, las abreviaturas para los residuos de aminoácidos se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1 - Tabla de Correspondencia

SÍMBOLO		
1-Letra	3-Letras	AMINOÁCIDOS
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina

SÍMBOLO		
1-Letra	3-Letras	AMINOÁCIDOS
I	ÉI	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	Su	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Áspid	Ácido aspártico
N	Asn	Asparagina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

- Cabe señalar que todas las secuencias de residuos de aminoácidos representadas en la presente memoria por fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional del extremo amino al extremo carboxilo-terminal. Además, la frase "residuo de aminoácido" se define ampliamente para incluir los aminoácidos que figuran en la Tabla de Correspondencia (Tabla 1) y aminoácidos modificados e inusuales, como los mencionados en 37 CFR §§ 1.821-1.822. Además, se debe tener en cuenta que un guión al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácidos indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos, a un grupo amino-terminal tal como NH_2 o a un grupo carboxilo-terminal tal como COOH .
- 5 Según se utiliza en la presente memoria, "aminoácidos de origen natural" se refiere a los ácidos 20 L-aminoácidos que aparecen en los polipéptidos.
- 10 Según se utiliza en la presente memoria, "aminoácido no natural" se refiere a un compuesto orgánico que tiene una estructura similar a un aminoácido natural pero que ha sido modificado estructuralmente para imitar la estructura y reactividad de un aminoácido natural. Los aminoácidos de origen no natural por lo tanto incluyen, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos de origen natural e incluyen, pero no se limitan a, los D-isostereómeros de aminoácidos. Los aminoácidos no naturales ilustrativos se describen en la presente memoria y son conocidos por los expertos en la técnica.
- 15 Según se utiliza en la presente memoria, un constructo de ADN es una molécula de ADN monocatenario o bicatenario, lineal o circular que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera que no se encuentra en la naturaleza. Existen constructos de ADN como resultado de la manipulación humana, e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.
- 20 Según se utiliza en la presente memoria, "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud puede basarse en el grado de identidad y/u homología de las secuencias de residuos y los residuos contenidos en las mismas. Los métodos para evaluar el grado de similitud entre las proteínas o los ácidos nucleicos son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en un método de evaluación de la similitud de secuencia, dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se alinean de una manera que produce un nivel máximo de identidad entre las secuencias. "Identidad" se refiere al grado en el que las secuencias de aminoácido o de nucleótidos son invariantes. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos, y hasta cierto punto de las secuencias de nucleótidos, también puede tomar en cuenta las diferencias conservativas y/o las sustituciones frecuentes en los aminoácidos (o nucleótidos). Diferencias conservativas son aquellas que preservan las propiedades físico-químicas
- 25
- 30

de los residuos implicados. Los alineamientos pueden ser globales (alineamiento de las secuencias comparadas en toda la longitud de las secuencias e incluyendo todos los residuos) o locales (el alineamiento de una porción de las secuencias que incluye únicamente la región o regiones más similares).

"Identidad" per se tiene un significado reconocido en la técnica y puede calcularse utilizando técnicas publicadas. (Véanse, p. ej.: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). Si bien existen diversos métodos para medir la identidad entre dos polinucleótidos o polipéptidos, el término "identidad" es bien conocido por los expertos en la técnica (Carillo, H. & Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988)).

Según se utiliza en la presente memoria, homólogo (con respecto a las secuencias ácidos nucleicos y/o de aminoácidos) significa aproximadamente mayor que o igual a 25% de homología de secuencia, típicamente mayor que o igual a 25%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de homología de secuencia; el porcentaje preciso se puede especificar si fuera necesario. Para los fines de la presente memoria, los términos "homología" e "identidad" se usan indistintamente, a menos que se indique lo contrario. En general, para la determinación de la homología o porcentaje de identidad, las secuencias se alinean de modo que se obtiene el emparejamiento de mayor orden (véase, p. ej.: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carillo et al. (1988) SIAMJ Applied Math 48:1073). Mediante homología de secuencia, el número de aminoácidos conservados se determina mediante programas de algoritmos de alineamiento convencionales, y se puede utilizar con penalizaciones por hueco por defecto establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas podrían hibridar típicamente a rigurosidad moderada o a alta rigurosidad en toda la longitud del ácido nucleico de interés. También se contemplan las moléculas de ácido nucleico que contienen codones degenerados en lugar de codones en la molécula de ácido nucleico que hibrida.

El que cualquiera de las dos moléculas tienen secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos que son al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% "idéntica" u "homóloga" puede determinarse utilizando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa "FASTA", utilizando, 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(1): 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 de Información sobre Biotecnología se puede utilizar para determinar la identidad. Otros programas comercialmente o públicamente disponibles incluyen, el programa "MegAlign" DNASTar (Madison, WI) y el programa "Gap" del Genetics Computer Group de la Universidad de Wisconsin (UWG) (Madison WI). El porcentaje de homología o identidad de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico se pueden determinar, por ejemplo, comparando la información de secuencia utilizando un programa de ordenador GAP (p. ej., Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48:443, revisado por Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482). En resumen, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos), que son similares, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación 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 describen Schwartz y Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, págs. 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 los huecos finales.

Por lo tanto, según se utiliza en la presente memoria, el término "identidad" u "homología" representa una comparación entre una prueba y un polipéptido o polinucleótido de referencia. Según se utiliza en la presente memoria, el término al menos "90% idéntica a" se refiere a identidades por ciento desde 90 hasta 99,99 con respecto a la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de referencia del polipéptido. Identidad a un nivel de 90% o más es indicativa del hecho de que, suponiendo fines ilustrativos, se compara una longitud del polipéptido de ensayo y referencia de 100 aminoácidos. No más de 10% (es decir, 10 de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de ensayo difiere del del polipéptido de referencia. Se pueden realizar comparaciones similares entre polinucleótidos de ensayo y de referencia. Tales diferencias pueden ser representadas como mutaciones puntuales distribuidas al azar a lo largo de toda la longitud de un polipéptido o pueden ser agrupadas en una o más localizaciones de longitud variable hasta el máximo permisible, p. ej., diferencia de 10/100 aminoácidos (aproximadamente 90% de identidad). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácido nucleico o aminoácidos. A nivel de

homologías o identidades por encima de aproximadamente 85-90%, el resultado debería ser independiente del programa y del ajuste de parámetros de los huecos; dichos altos niveles de identidad pueden evaluarse fácilmente, a menudo por medio de alineamiento manual sin depender del soporte lógico.

Según se utiliza en la presente memoria, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similitud y/o identidad) para alinear las posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Típicamente, dos o más secuencias que están relacionadas por 50% o más de identidad están alineadas. Un conjunto alineado de secuencias se refiere a 2 o más secuencias que se alinean en posiciones correspondientes y pueden incluir el alineamiento de secuencias derivadas de ARN, tales como EST y otros ADNc, alineados con la secuencia de ADN genómico.

Según se utiliza en la presente memoria, "cebador" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ADN dirigida por molde en condiciones apropiadas (p. ej., en presencia de cuatro nucleósidos trifosfato 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 ciertas moléculas de ácido nucleico pueden servir como "sonda" y como "cebador". Un cebador, sin embargo, tiene un grupo 3' hidroxilo para la extensión. Se puede utilizar un cebador en una variedad de métodos, incluyendo, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transcriptasa inversa (RT)-PCR, PCR con ARN, LCR, PCR múltiplex, PCR angosta, PCR de captura, PCR de expresión, RACE 3' y 5', PCR in situ, PCR mediada por ligación y otros protocolos de amplificación.

Según se utiliza en la presente memoria, una variante alélica o variación alélica hace referencia a cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de mutación, y puede dar como resultado polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos alterada. El término "variante alélica" también se utiliza en la presente memoria para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen. Típicamente, la forma de referencia del gen codifica una forma de tipo salvaje y/o una forma predominante de un polipéptido de una población o miembro de referencia individual de una especie. Típicamente, las variantes alélicas, que incluyen variantes inter- e intra-especie tienen típicamente al menos 80%, 90% o más de identidad de aminoácidos con una forma de tipo salvaje y/o predominante de la misma especie; el grado de identidad depende del gen y de si la comparación es interespecífica o intraespecífica. Generalmente, la variantes alélicas intraespecíficas tienen al menos aproximadamente 80%, 85%, 90% o 95% o más de identidad con una forma de tipo salvaje y/o predominante de un polipéptido, incluyendo 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una forma de tipo salvaje y/o predominante. La referencia a una variante alélica en la presente memoria generalmente se refiere a las variaciones de proteínas entre los miembros de la misma especie.

Según se utiliza en la presente memoria, "alelo", que se utiliza indistintamente en la presente memoria con "variante alélica" se refiere a formas alternativas de un gen o porciones 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 homocigótico para ese gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterocigótico para el gen. Los alelos de un gen específico pueden diferir entre sí en un solo nucleótido o varios nucleótidos, y pueden incluir sustituciones, deleciones e inserciones de nucleótidos. Un alelo de un gen también puede ser una forma de un gen que contiene una mutación.

Según se utiliza en la presente memoria, variantes de especie se refieren variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamíferos, tales como ratón y ser humano.

Según se utiliza en la presente memoria, una variante de empalme se refiere a una variante producida por procesamiento diferencial de un transcrito primario de ADN genómico que da como resultado más de un tipo de ARNm.

Según se utiliza en la presente memoria, la modificación es en referencia a la modificación de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico e incluye deleciones, inserciones, y sustituciones de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Métodos de modificación de un polipéptido son rutinarios para los expertos en la técnica, tal como mediante el uso de metodologías de ADN recombinante.

Según se utiliza en la presente memoria, el término promotor significa una porción de un gen que contiene secuencias de ADN que proporcionan la unión de la ARN polimerasa y la iniciación de la transcripción. Las secuencias promotoras se encuentran comúnmente, pero no siempre, en la región no codificante 5' de los genes.

Según se utiliza en la presente memoria, polipéptido o proteína o porción biológicamente activa de los mismos aislados o purificados están sustancialmente libres de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o

tejido del que deriva la proteína, o sustancialmente libres de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Se puede determinar que las preparaciones están sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables según se determina por medio de métodos de análisis convencionales, tales como cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), utilizadas por los expertos en la técnica para evaluar tal pureza, o son suficientemente puras de manera que la purificación adicional no alteraría de forma detectable las propiedades físicas y químicas, por ejemplo las actividades enzimática y biológicas, de la sustancia. Los métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros son conocidos por los expertos en la técnica. Un compuesto sustancialmente químicamente puro, sin embargo, puede ser una mezcla de estereoisómeros. En tales casos, la purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

El término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o produce de forma recombinante. En una realización, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de proteínas no enzimáticas (también denominadas en la presente memoria proteínas contaminantes), generalmente menos de aproximadamente 20% de proteínas no enzimáticas o 10% de proteínas no enzimáticas o menos de aproximadamente 5% de proteínas no enzimáticas. Cuando se produce de forma recombinante la proteína enzimática, también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa cantidades de menos de aproximadamente, o de, 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína enzimática.

Según se utiliza en la presente memoria, el término 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. El término incluye preparaciones de proteínas enzimáticas tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco) 20%, 10%, 5% o menos de precursores químicos o productos químicos no enzimáticos o componentes.

Según se utiliza en la presente memoria, sintético, con referencia a, por ejemplo, una molécula sintética de ácido nucleico o un gen sintético o un péptido sintético se refiere a una molécula de ácido nucleico o molécula de polipéptido que se produce por métodos recombinantes y/o por métodos de síntesis química.

Según se utiliza en la presente memoria, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que está conectado operativamente a secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de tales fragmentos de ADN. Tales 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 un constructo de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, virus recombinante u otro vector que, tras la introducción en una célula anfitriona apropiada, da como resultado la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen aquellos que son replicables en células eucarióticas y/o células procarióticas y aquellos que permanecen episómicos o aquellos que se integran en el genoma de la célula anfitriona.

En la presente memoria, vector también incluye "virus vectores" o "vectores virales". Los vectores virales son virus modificados genéticamente que están unidos operativamente a genes exógenos para transferir (como vehículos o lanzaderas) los genes exógenos a las células.

Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término 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, razón, porcentaje, valor visual u otro valor indicativo del nivel de actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta y las especies químicas detectadas realmente no tienen que ser, por supuesto, el propio producto de la proteólisis, sino que puede ser por ejemplo un derivado de la misma o alguna sustancia adicional. Por ejemplo, la detección de un producto de escisión de una proteína del complemento, por ejemplo mediante SDS-PAGE y tinción de proteínas con azul de Coomassie.

Según se utiliza en la presente memoria, una composición se refiere a cualquier mezcla. Puede ser una disolución, suspensión, líquido, polvo, pasta, acuosos, no acuosos o cualquier combinación de los mismos. Según se utiliza en la presente memoria, un kit es una combinación empaquetada que opcionalmente incluye otros elementos, tales como reactivos adicionales e instrucciones de uso de la combinación o elementos de los mismos.

Según se utiliza en la presente memoria, "enfermedad o trastorno" se refiere a una afección patológica en un organismo que resulta de causa o afección, incluyendo, pero no limitada a, infecciones, afecciones adquiridas, afecciones genéticas, y se caracterizan por síntomas identificables.

Según se utiliza en la presente memoria, "tratar" un sujeto con una enfermedad o afección significa que los síntomas del sujeto se alivian parcialmente o totalmente, o permanecen estáticos después del tratamiento. Por lo tanto el tratamiento abarca la profilaxis, terapia y/o cura. La profilaxis se refiere a la prevención de una enfermedad potencial y/o una prevención de empeoramiento de los síntomas o la progresión de una enfermedad. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de un interferón modificado y de la composiciones proporcionadas en la presente memoria.

Según se utiliza en la presente memoria, un agente farmacéuticamente eficaz, incluye cualquier agente terapéutico o agentes bioactivos, incluyendo, pero no limitados a, por ejemplo, anestésicos, vasoconstrictores, agentes dispersantes, fármacos terapéuticos convencionales, incluyendo fármacos de moléculas pequeñas y proteínas terapéuticas.

Según se utiliza en la presente memoria, tratamiento significa cualquier forma en la que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad u otra indicación, mejoran o resultan alterados por lo demás de manera beneficiosa.

Según se utiliza en la presente memoria, un paciente se refiere a un sujeto humano.

Según se utiliza en la presente memoria, una cantidad eficaz es la cantidad de un agente terapéutico necesaria para prevenir, curar, mejorar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.

Según se utiliza en la presente memoria, animal incluye cualquier animal, tal como, pero no limitado a 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; ganado porcino, tal como cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen los seres humanos como el animal contemplado. Las hialuronidasas proporcionadas en la presente memoria son de cualquier fuente, animal, vegetal, procariótica y fúngica. La mayoría de las enzimas son de origen animal, incluidas las procedentes de mamíferos.

Según se utiliza en la presente memoria, 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 se trata de una muestra de plasma, puede ser de un voluntario normal no afectado de la afección de interés. Un control puede ser también un control interno.

Según se utiliza en la presente memoria, las formas singulares "un", "una", "el", y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a un compuesto, que comprende "un dominio extracelular" incluye compuestos con uno o una pluralidad de dominios extracelulares.

Según se utiliza en la presente memoria, los intervalos y las cantidades se pueden expresar como "aproximadamente" un valor o rango concreto. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. De ahí que "aproximadamente 5 mM" signifique "aproximadamente 5 mM" y también "5 mM".

Según se utiliza en la presente memoria, las abreviaturas para los grupos protectores, aminoácidos y otros compuestos, son, a menos que se indique lo contrario, de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas, o de la Comisión sobre Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB (véase, (1972) Biochem. 11: 1726).

B. Esquema

En la presente memoria se proporcionan métodos para la producción a gran escala de rHuPH20 soluble. Los métodos utilizan típicamente biorreactores para cultivar células que producen la rHuPH20 soluble, es decir, células CHO (p. ej., células CHO DG44). Son ilustrativas de tales células las células 2B2, que producen rHuPH20 soluble. El volumen de cultivo celular en el biorreactor es típicamente o es de aproximadamente 200, 300, 400, 500, 1000, 1504, 2000, 2500, 3000 o 3500 litros. Antes de la inoculación del biorreactor, las células se expanden a través de una serie de volúmenes crecientes de cultivo celular para generar el número necesario de células para la siembra del biorreactor. Típicamente, el cultivo celular en el biorreactor se siembra con 10^5 a 10^6 células/mL, pero se puede sembrar con más o menos. Las células se incuban a continuación en el biorreactor durante 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o más días.

Durante esta incubación, se añadió medio de alimentación al cultivo celular para suministrar nutrientes y suplementos adicionales. Los suplementos o nutrientes incluidos en los medios de alimentación incluyen, pero no están limitados a, glucosa, glutamina o sucedáneo de glutamina, tal como L-alanil-L-glutamina, insulina, y butirato de sodio. El tipo y la cantidad de suplemento añadido pueden influir en el crecimiento celular y la producción de proteínas. Por ejemplo, la insulina y el sucedáneo de glutamina se incorporan a los primeros medios de alimentación añadidos al cultivo celular para aumentar el crecimiento celular y la densidad celular máxima. Los medios de alimentación posteriores están diseñados para promover la producción de proteínas más que el crecimiento celular.

Suplementos tales como la insulina se excluyen y se reduce la cantidad de suplementos tales como la glutamina o el sucedáneo de glutamina, por ejemplo la L-alanil-L-glutamina. En contraste, se aumenta la cantidad de suplementos tales como extracto de levadura que mejora la síntesis de proteínas. Además, también se incluye butirato de sodio que mejora la detención del ciclo celular y, por lo tanto, aumenta la producción de proteína.

Después de la producción de proteínas en el biorreactor, las células se recogen y la rHuPH20 soluble, que ha sido secretada al medio de cultivo celular se concentra antes del comienzo del procedimiento de purificación. La rHuPH20 soluble se purifica a continuación a partir de la disolución de proteína concentrada utilizando una serie de etapas de purificación. Los métodos de purificación ilustrativos que se utilizan para los métodos de la presente invención es una combinación de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de afinidad. La proteína purificada se concentra y se somete a diafiltración.

Utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria, se producen entre aproximadamente 0,5-50 gramos de rHuPH20 soluble, por 100 L de cultivo celular. En algunos ejemplos, la cantidad de rHuPH20 soluble producida por 100 L de cultivo es o es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, o 40 gramos o más. En algunos ejemplos, el rendimiento de rHuPH20 soluble después de la purificación puede variar entre o entre aproximadamente 10% a 50% de la cantidad producida antes de la purificación. Por ejemplo, el rendimiento después de la purificación puede ser o es aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% de la cantidad producida antes de la purificación. Generalmente, la actividad específica de rHuPH20 soluble producida utilizando los métodos en la presente memoria es al menos o aproximadamente de 80000, 100000, 120000, 140000, 160000 o 180000 unidades/mg.

C. Hialuronidasas

Las hialuronidasas son una familia de enzimas que degradan el ácido hialurónico (también conocido como hialuronano o hialuronato), un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente principal de la barrera intersticial. Por medio de la catálisis de la hidrólisis de ácido hialurónico, la hialuronidasa reduce la viscosidad de ácido hialurónico, lo que aumenta la permeabilidad del tejido. Como tales, las hialuronidasas se han utilizado, por ejemplo, como un agente de de diseminación o dispersión junto con otros agentes, fármacos y proteínas para mejorar su dispersión y liberación.

1. Estructura y función de la hialuronidasas

Existen tres clases generales de hialuronidasas; hialuronidasa mamíferos, hialuronidasa bacteriana e hialuronidasa de las sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas de tipo mamífero (CE 3.2.1.35) son *endo-β-N-acetil-hexosaminidasas* que hidrolizan enlace glicosídico β1 → 4 del ácido hialurónico a varias longitudes de oligosacáridos tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. Tienen actividades hidrolítica y transglicosidasa y pueden degradar ácido hialurónico y sulfatos de condroitina, tales como C4-S y C6-S. Las hialuronidasas de este tipo incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas de vacas (SEQ ID NO: 10), avispa chaqueta amarilla (SEQ ID NOS: 11 y 12), abeja melífera (SEQ ID NO: 13), avispa de cara blanca (SEQ ID NO: 14), avispa de papel (SEQ ID NO: 15), ratón (SEQ ID NOS: 16-18, 29), cerdo (SEQ ID NOS: 19-20), rata (SEQ ID NOS: 21- 23, 228), conejo (SEQ ID NO: 24), oveja (SEQ ID NO: 25), orangután (SEQ ID NO: 26), mono cynomolgus (SEQ ID NO: 27), cobaya (SEQ ID NO: 30) e hialuronidasas humanas.

Hay seis genes de tipo hialuronidasa en el genoma humano: HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 y PH20/SPAM1. HYALP1 es un pseudogen, y no se ha demostrado que HYAL3 (SEQ ID NO: 36) posea actividad enzimática frente a ningún sustrato conocido. HYAL4 (polipéptido precursor mostrado en el SEQ ID NO: 37) es una condroitinasa y exhibe poca actividad frente el ácido hialurónico. HYAL1 (polipéptido precursor mostrado en el SEQ ID NO: 34) es la enzima prototípica activa a pH ácido y PH20 (polipéptido precursor mostrado en el SEQ ID NO: 1) es la enzima prototípica activa a pH neutro. Las hialuronidasas activas a pH ácido, tales como HYAL1 y HYAL2 (polipéptido precursor mostrado en el SEQ ID NO: 35) generalmente carecen de actividad catalítica a pH neutro (es decir, pH 7). Por ejemplo, HYAL1 tiene poca actividad catalítica *in vitro* por encima de pH 4,5 (Frost et al. (1997) Anal Biochemistry 251:263-269). HYAL2 es una enzima activa a pH ácido con una actividad específica muy baja *in vitro*. Las enzimas de tipo hialuronidasa también pueden ser caracterizadas por aquellas que generalmente se bloquean en la membrana plasmática a través de un ancla de glicosilfosfatidil inositol tal como HYAL2 humana y PH20 humana (Danilkovitch-Miagkova, et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA. 100(8):4580-5), y aquellas que son generalmente solubles, tales como HYAL1 humana (Frost et al, (1997) Biochem Biophys Res Commun. 236(1):10-5). Por medio de la catálisis de la hidrólisis de ácido hialurónico, un constituyente principal de la barrera intersticial, la hialuronidasa reduce la viscosidad del ácido hialurónico, lo que aumenta la permeabilidad del tejido. También se ha demostrado que muestra actividades anti-cáncerosa y anti-carcinogénica.

La glicosilación de algunas hialuronidasas ligadas a N puede ser muy importante para su actividad y estabilidad catalítica. Si bien la alteración del tipo de glicano que modifica una glicoproteína puede tener efectos drásticos sobre la antigenicidad de una proteína, el plegamiento estructural, la solubilidad y estabilidad, no se considera que muchas

enzimas requieran glicosilación para una actividad óptima de la enzima. Las hialuronidasas son, por lo tanto, únicas en este sentido, ya que la eliminación de la glicosilación ligada a N puede dar como resultado la inactivación casi completa de la actividad hialuronidasa. Para tales hialuronidasas, la presencia de glicanos ligados a N es crítica para generar una enzima activa.

Existen siete sitios de glicosilación ligados a N potenciales en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de PH20 humana ilustrada en el SEQ ID NO: 1. Los enlaces disulfuro se forman entre los residuos de cisteína C60 y C351 y entre C224 y C238 para formar el dominio hialuronidasa central. Sin embargo, se requieren cisteínas adicionales en el extremo carboxi terminal para la actividad catalítica de la enzima neutra de manera que los aminoácidos 36 a 464 del SEQ ID NO: 1 contienen el dominio hialuronidasa PH20 humano mínimamente activo. Por lo tanto, no se requiere el sitio de glicosilación ligado a N N490 para la actividad hialuronidasa adecuada.

Oligosacáridos ligados a N se clasifican en varios tipos principales (oligomanosa, complejos, híbridos, sulfatados), todos los cuales tienen (hombre) núcleos de 3-GlcNAc-GlcNAc unidos mediante el nitrógeno amídico de los residuos de Asn que caen dentro de las secuencias -Asn-Xaa-Thr/Ser- (donde Xaa no es Pro). Se ha referido la glicosilación en un sitio -Asn-Xaa-Cys- para la proteína C de la coagulación. En algunos casos, la hialuronidasa puede contener enlaces tanto N-glucosídicos como O-glucosídicos. Por ejemplo, rHuPH20 (según se produce en los métodos descritos en la presente memoria) tiene oligosacáridos ligados a O, así como los oligosacáridos ligados a N.

Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan un procedimiento para la producción y purificación de grandes cantidades de una preparación soluble de preparación de hialuronidasa PH20 humana.

2. PH20

La PH20 humana (también conocida como proteína de la superficie de espermatozoides PH20), como se señaló anteriormente, es la enzima activa a pH neutro prototípica que es generalmente bloqueada en la membrana plasmática a través de un ancla de glicosilfosfatidil inositol (GPI). Está implicada de forma natural en la adherencia espermatozoide-óvulo y ayuda a la penetración por espermatozoide de la capa de células del cumulus por digestión del ácido hialurónico. El transcrito de ARNm de PH20 se traduce normalmente para generar una proteína precursora de 509 aminoácidos que contiene una secuencia señal de 35 aminoácidos en el extremo N-terminal (posiciones de residuos de aminoácidos 1-35). El polipéptido maduro PH20 es, por lo tanto, un polipéptido de 474 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 2.

La forma soluble de PH20 humana (sHuPH20), rHuPH20, puede ser producida y purificada utilizando los métodos descritos en la presente memoria. La generación de sHuPH20 se describe en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Núms. 10/795.095, 11/065.716 y 11/238.171 (referidas también en estas solicitudes como sHASEGP o rHuPH20) relacionadas, y en los Ejemplos 1 y 4, a continuación. Las formas solubles se producen mediante la expresión del ácido nucleico que codifica truncamientos C-terminales del polipéptido maduro PH20 que carece de los sitios de anclaje de GPI. La forma soluble de PH20 humana, rHuPH20, se produce y se purifica utilizando los métodos proporcionados en la presente memoria.

3. Usos terapéuticos de las hialuronidasas

Varias formas de hialuronidasas se han preparado y aprobado para uso terapéutico en humanos. Por ejemplo, la preparaciones de hialuronidasa de derivadas de animales incluyen Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular ovina purificada y Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular bovina. Hylenex® (Halozyme Therapeutics) es una hialuronidasa humana recombinante producida por células de ovario de hámster chino (CHO) modificadas genéticamente que contienen ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble. Los usos terapéuticos aprobados para la hialuronidasa incluyen el uso como un coadyuvante para aumentar la absorción y la dispersión de otros fármacos inyectados, por hipodermoclisis (administración subcutánea de líquidos), y como un complemento en urografía subcutánea para mejorar la resorción de agentes radiopacos. Además de estas indicaciones, las hialuronidasas, incluyendo sHuPH20, se pueden utilizar como un agente terapéutico o cosmético para el tratamiento de enfermedades y afecciones adicionales.

Como se señaló anteriormente, la hialuronidasa es una sustancia de diseminación o difusión que modifica la permeabilidad de tejido conectivo a través de la hidrólisis del ácido hialurónico, un polisacárido que se encuentra en la sustancia fundamental intercelular del tejido conectivo, y de ciertos tejidos especializados, tales como el cordón umbilical y el humor vítreo. Cuando no está presente factor de dispersión, los materiales inyectados por vía subcutánea, tales como fármacos, proteínas, péptidos y ácidos nucleicos, se diseminan muy lentamente. La inyección simultánea con hialuronidasa, sin embargo, puede causar la diseminación rápida. La velocidad de difusión es proporcional a la cantidad de enzima, y el grado de difusión es proporcional al volumen de la disolución. La absorción y dispersión de fármacos y agentes inyectados se pueden mejorar mediante la adición de 10-1000 unidades de hialuronidasa a la disolución inyectable. En algunos ejemplos, se añaden 150 U de hialuronidasa. Las hialuronidasas tienen múltiples usos, incluyendo y, además de su uso como un agente de diseminación. La

hialuronidasa se utiliza comúnmente, por ejemplo, para bloqueo peribulbar en la anestesia local de la cirugía oftálmica anterior. La presencia de la enzima evita la necesidad de bloques adicionales y acelera el tiempo para la aparición de acinesia (pérdida de movimiento ocular). El bloqueo peribulbar y sub-Tenon son las aplicaciones más comunes de la hialuronidasa para procedimientos oftálmicos. La hialuronidasa también puede promover la acinesia en la cirugía estética, por ejemplo en blefaroplastias y estiramientos faciales. Los usos terapéuticos y cosméticos ilustrativos para la hialuronidasa se describen a continuación.

a. Uso como agente de diseminación

La rHuPH20 soluble producida utilizando los métodos descritos en la presente memoria, se puede utilizar para promover o mejorar los agentes de liberación y las moléculas en cualquiera de una variedad de tejidos de mamíferos *in vivo*. Se puede utilizar para facilitar la difusión y, por lo tanto, promover la liberación, de agentes farmacológicos de molécula pequeña, así como agentes farmacológicos de molécula más grandes, tales como proteínas, ácidos nucleicos y ácidos ribonucleicos, y composiciones macromoleculares que puede contener una combinación de componentes que incluye, pero no se limita a, ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos, lípidos, moléculas y fármacos basados en lípidos. Por ejemplo, las moléculas y los complejos macromoleculares que varían de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 500 nm de diámetro, pueden exhibir mejoras drásticas en la liberación a través de espacios intersticiales cuando el espacio intersticial ha sido previamente, o está coincidentemente, expuesto a la hialuronidasa (véanse por ejemplo, las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Núms. 10/795.095, 11/065.716 y 11/238.171).

Los ejemplos de los agentes y moléculas farmacéuticos, terapéuticos y cosméticos que se pueden administrar con rHuPH20 incluyen, pero no se limitan a, anestésicos; antimetabolitos, antineoplásicos y otros agentes anticancerosos; antivirales; antiinfecciosos, incluyendo antibacterianos y otros antibióticos, antifúngicos y otros antiinfecciosos; agentes inmunomoduladores; antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos; beta bloqueadores; simpaticomiméticos; ducosanoides, prostaglandinas y análogos de prostaglandinas; mióticos, colinérgicos y anti-colinesterasa; anti-alérgicos y descongestivos; agentes hormonales; factores de crecimiento; inmunosupresores; vacunas y toxoides; sueros inmunológicos; anticuerpos; y cualquier combinación de los mismos. En un ejemplo, se administra rHuPH20 con una catepsina, tales como la catepsina L.

b. Uso en hipodermoclis

La hipodermoclis, la infusión de líquidos y electrolitos en la hipodermis de la piel, es una técnica de hidratación útil y simple adecuada para pacientes adultos ligeramente a moderadamente deshidratados, especialmente ancianos. Aunque se considera segura y efectiva, el efecto adverso más frecuente es un edema subcutáneo leve que puede ser tratado por medio de un masaje local o diuréticos sistémicos. Se pueden administrar aproximadamente 3 L en un período de 24 horas en dos sitios separados. Los sitios de infusión comunes incluyen el pecho, el abdomen, los muslos y los brazos. Las disoluciones utilizadas en la hipodermoclis incluyen, por ejemplo, solución salina normal, solución salina semi-normal, glucosa con solución salina y glucosa al 5%. El cloruro de potasio también se puede añadir a la disolución. La adición de hialuronidasa a la disolución puede mejorar la absorción de líquido y aumentar la tasa global de administración.

c. Uso en vitrectomía y trastornos y afecciones oftálmicos

La hialuronidasa se puede utilizar para minimizar el desprendimiento o desgarro de la retina durante la vitrectomía. Esto podría causar, por ejemplo, el desacoplamiento o "desinserción" del cuerpo vítreo de la retina, antes de la eliminación del cuerpo vítreo. Tal desinserción o desacoplamiento del cuerpo vítreo pueden minimizar la probabilidad de que se produzca más desgarro o desprendimiento de la retina a medida que se retira el cuerpo vítreo.

La hialuronidasa se puede utilizar para diversas aplicaciones oftálmicas, incluida la aplicación como complemento de la vitrectomía descrita en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.292.509. El uso de una hialuronidasa altamente purificada, tal como rHuPH20 soluble producida y purificada mediante los métodos descritos en la presente memoria, es preferible para procedimientos intraoculares para minimizar la inmunogenicidad y la toxicidad. En algunos ejemplos, se puede utilizar una hialuronidasa pegilada para prolongar su residencia en el vítreo y prevenir la captación localizada.

Las hialuronidasas pueden ser utilizadas para tratar y/o prevenir trastornos oftálmicos, por ejemplo, la prevención de la neovascularización y el aumento de la tasa de aclaramiento del humor vítreo de materiales tóxicos para la retina. La hialuronidasa puede ser administrada en una cantidad eficaz para licuar el humor vítreo del ojo sin causar daño tóxico al ojo. La licuefacción del humor vítreo aumenta la tasa de cambio de líquido de la cámara vítrea. Este aumento del intercambio elimina los materiales contaminantes cuya presencia puede causar daños oftalmológicos y de la retina.

La hialuronidasa también se puede utilizar para reducir la presión postoperatoria. El ácido hialurónico se ha utilizado

en el ojo principalmente como un espaciador durante los procedimientos quirúrgicos de cataratas y de la lente intraocular. También se utiliza en otros procedimientos quirúrgicos oculares tales como glaucoma, cirugía del humor vítreo y la retina y en el trasplante de córnea. Un efecto secundario común que ocurre en el postoperatorio de los pacientes con cataratas es un aumento de la presión intraocular temprano significativo, y ocasionalmente prolongado. Tal afección es a veces grave, especialmente en pacientes con cambios de disco óptico glaucomatoso. La hialuronidasa puede ser co-administrada con ácido hialurónico al ojo antes de la cirugía para reducir la presión postoperatoria en el ojo. La hialuronidasa se administra en una cantidad eficaz para reducir la presión intraocular a los niveles pre-operatorios al romper el ácido hialurónico sin disminuir su eficacia durante la cirugía y no causar efectos secundarios en el paciente (Patente de los Estados Unidos Núm. 6.745.776).

La hialuronidasa también se puede administrar a pacientes con glaucoma para eliminar los glicosaminoglicanos de la malla trabecular y reducir la presión intraocular, y se puede aplicar al humor vítreo para promover la resolución de hemorragias vítreas (es decir, extravasación de sangre al humor vítreo), que se puede producir en conexión con afecciones tales como la retinopatía diabética, la neovascularización retiniana, la oclusión de la vena retiniana, el desprendimiento posterior del humor vítreo, los desgarramientos retinianos, los traumas oculares y similares. La presencia de hemorragias vítreas, que suelen ser lentas de resolver, puede retrasar, complicar o evitar procedimientos que requieren que la retina sea visualizada a través del humor vítreo para el diagnóstico y/o para los procedimientos de tratamiento, como la fotocoagulación con láser y similares, que a menudo son los tratamientos primarios para afecciones tales como la retinopatía diabética proliferativa.

d. Uso en terapia génica

La eficacia de la mayoría de los vehículos de liberación génica *in vivo* no se corresponde con la eficacia encontrada observada *in vitro*. Los glicosaminoglicanos pueden obstaculizar la transferencia y difusión de ADN y vectores virales a muchos tipos de células. Los niveles de semejante material de matriz extracelular pueden dificultar considerablemente el proceso. La administración de hialuronidasa puede abrir canales en la matriz extracelular, mejorando así la liberación de la terapia génica. Por ejemplo, la hialuronidasa se puede administrar con colagenasa para facilitar la transducción de ADN *in vivo* (Dubensky et al. (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81(23): 7529-33). La hialuronidasa también puede mejorar la terapia génica utilizando virus adeno-asociados (Favre et al., (2000) Gene Therapy 7(16):1417-20). Los canales abiertos después de la administración de hialuronidasa son de un tamaño que normalmente mejora la difusión de moléculas más pequeñas tales como retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados y complejos de ADN (así como otros agentes terapéuticos y farmacológicos de interés). Los poros no son tan grandes, sin embargo, como para promover la dislocación y el movimiento de las células.

En algunos ejemplos, los virus pueden modificarse por ingeniería genética para expresar hialuronidasa para facilitar su replicación y propagación dentro de un tejido diana. El tejido diana puede ser, por ejemplo, un tejido canceroso por medio del cual el virus es capaz de replicar selectivamente dentro del tumor. El virus también puede ser un virus no lítico en donde el virus replica selectivamente bajo un promotor específico de tejido. A medida que los virus replican, la co-expresión de hialuronidasa con genes virales puede facilitar la propagación del virus *in vivo*.

e. Usos cosméticos

Las hialuronidasas pueden ser administradas para eliminar los glicosaminoglicanos implicados en la acumulación de la celulitis y para promover el flujo linfático. En algunos ejemplos, se utilizan hialuronidasas humanas, como por ejemplo, rHuPH20 soluble, para el tratamiento de la celulitis. La hialuronidasa se puede administrar a través de inyecciones subcutáneas repetidas, a través de administración transdérmica en forma de pomadas o cremas o a través del uso de formulaciones de liberación lenta inyectables para promover la degradación continua de glicosaminoglicanos y evitar su regreso.

La hialuronidasa también se puede utilizar para tratar afecciones tales como el edema "piel de cerdo" o el edema "piel de naranja". Las hialuronidasas pueden efectuar la despolimerización de las largas cadenas de mucopolisacáridos que se pueden acumular en la dermis y que son responsables de la retención de agua unida y de la desaceleración, por compresión capilar, de la difusión de líquidos orgánicos, que eliminan los desechos metabólicos. Dicha retención de agua y desechos asociados con la sobrecarga de grasa de los lipocitos, constituye el clásico edema "piel de cerdo" o edema "piel de naranja". La despolimerización puede cortar las cadenas largas de mucopolisacáridos en cadenas más cortas, dando como resultado la eliminación del agua unida y los desechos y la restauración de la circulación venosa y linfática, culminando con la desaparición del edema local.

f. Uso en el trasplante de órganos

El contenido de ácido hialurónico en un órgano puede aumentar con la inflamación. Se ha observado un aumento de la concentración de ácido hialurónico en el tejido de diferentes órganos caracterizados por lesión inmunológica inflamatoria tal como alveolitis (Nettelbladt et al. (1991) Am. Rev. Resp. Dis. 139: 759-762) e infarto de miocardio (Waldenstrom et al. (1991) J. Clin. Invest. 88(5): 1622-28). Otros ejemplos incluyen el rechazo del aloinjerto después

de un trasplante renal (Ha'llgren et al. (1990) J. Exp. Med. 171: 2063-2076; Wells et al. (1990) Transplantation 50: 240-243), intestino delgado (Wallander et al. (1993) Transplant. Int. 6: 133-137) o cardíaco (Haellgren et al. (1990) J Clin Invest 185: 668-673); o una inflamación del miocardio de origen viral (Waldenstrom et al. (1993) Eur. J. Clin. Invest. 23: 277-282). La aparición de edemas intersticiales en relación con el injerto de un órgano constituye un grave problema en el campo de la cirugía de trasplantes. Los injertos con edemas intersticiales se pueden hinchar hasta un grado tal que se puede perder la función temporalmente. En algunos casos, la inflamación puede causar la alteración del riñón, dando como resultado una hemorragia masiva. Las hialuronidasas se pueden utilizar para degradar los glicosaminoglicanos acumulados en un trasplante de órgano. La eliminación de dichos glicosaminoglicanos promueve la eliminación de agua del injerto y por lo tanto mejora la función del órgano.

g. Uso en el tratamiento del cáncer

La hialuronidasa tiene efectos anticancerígenos directos. La hialuronidasa impide el crecimiento de tumores trasplantados en ratones (De Maeyer et al., (1992) Int. J. Cancer 51: 657-660) e inhibe la formación de tumores tras la exposición a agentes carcinógenos (Pawlowski et al. (1979) Int. J. Cancer 23: 105-109). La hialuronidasa es eficaz como único agente terapéutico en el tratamiento de cáncer de cerebro (gliomas) (documento WO 198802261). Además de estos efectos, las hialuronidasas también se pueden utilizar para mejorar la penetración de agentes quimioterapéuticos en tumores sólidos. Se pueden inyectar por vía intratumoral con agentes anticancerígenos o intravenosa para los cánceres diseminados o los tumores de difícil acceso. El agente anticanceroso puede ser un agente quimioterápico, un anticuerpo, un péptido, o un vector de terapia génica, virus o ADN. Además, la hialuronidasa se puede utilizar para reclutar células tumorales de la reserva en ciclo para la sensibilización en los tumores previamente refractarios a quimioterapia que han adquirido resistencia a múltiples fármacos (St Croix et al., (1998) Cancer Lett Septiembre 131(1): 35-44). Las hialuronidasas, tales como, por ejemplo la rHuPH20 soluble, también pueden mejorar la liberación de productos biológicos tales como anticuerpos monoclonales, citocinas y otros fármacos en tumores que acumulan glicosaminoglicanos.

Las hialuronidasas también se pueden utilizar para aumentar la sensibilidad de los tumores que son resistentes a la quimioterapia convencional. Por ejemplo, la hialuronidasa, tal como rHuPH20 soluble, se puede administrar a un paciente que tiene un tumor asociado con un defecto de HYAL1 en una cantidad eficaz para aumentar la difusión alrededor del sitio del tumor (p. ej., para facilitar la circulación y/o concentraciones de agentes quimioterápicos en y alrededor del sitio del tumor), inhibir la motilidad de las células tumorales, por ejemplo por degradación del ácido hialurónico, y/o para disminuir el umbral de apoptosis de las células tumorales. Esto puede llevar a la célula o las células tumorales a un estado de anoikis, que hace que a la célula tumoral más susceptible a la acción de agentes quimioterapéuticos. La administración de hialuronidasa puede inducir la capacidad de respuesta de los tumores de páncreas, estómago, colon, ovarios y mama anteriormente resistentes a la quimioterapia (Baumgartner et al. (1988) Reg. Cancer Treat. 1: 55-58; Zanker et al. (1986) Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 27: 390).

En un ejemplo, se utilizan hialuronidasas en el tratamiento de cánceres metastásicos y no metastásicos, incluyendo aquellos que tienen una menor actividad hialuronidasa endógena con respecto a las células no cancerosas. Las hialuronidasas se pueden utilizar como un agente quimioterapéutico solo o combinado con otros agentes quimioterapéuticos. Los cánceres ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células escamosas, y cánceres de mama, ovarios, cabeza y cuello, o cualquier otro cáncer asociado con niveles deprimidos de actividad hialuronidasa o disminución del catabolismo de ácido hialurónico.

h. Uso en el tratamiento de la acumulación de glicosaminoglicanos en el cerebro

Los niveles de ácido hialurónico son elevados en una serie de afecciones patológicas cerebroespinales. Los niveles de ácido hialurónico cerebroespinal son normalmente menores de 200 µg/L en adultos (Laurent et al. (1996) Acta Neurol Scand Septiembre 94(3): 194-206), pero se pueden elevar a niveles de más de 8000 µg/L en enfermedades tales como meningitis, estenosis espinal, lesión en la cabeza y infarto cerebral. Las hialuronidasas, tales como, por ejemplo, la rHuPH20 soluble, se pueden utilizar para degradar niveles críticamente elevados de sustrato.

La falta de vasos linfáticos eficaces en el cerebro también puede conducir a un edema que amenace la vida tras un traumatismo craneal. La acumulación de ácido hialurónico es el resultado de un aumento de la síntesis por las ácido hialurónico sintasas y una disminución de la degradación. La acumulación de ácido hialurónico puede servir inicialmente para el propósito beneficioso de aumentar el contenido de agua en el tejido dañado para facilitar la extravasación de leucocitos, pero la acumulación continua puede ser letal. La administración de hialuronidasa, por ejemplo por vía intratecal o intravenosa, a un paciente que padece traumatismo craneal puede servir para eliminar la acumulación de ácido hialurónico en el tejido y el agua asociada con él.

Las hialuronidasas también se pueden utilizar en el tratamiento del edema asociado con tumores cerebrales, particularmente el asociado con glioblastoma multiforme. El edema asociado con tumores cerebrales resulta de la acumulación de ácido hialurónico en las porciones no cancerosas del cerebro adyacente al tumor. La administración

de hialuronidasa en los sitios de acumulación de ácido hialurónico (p. ej, por medio de inyección intravenosa o a través de un shunt) puede aliviar el edema asociado con tales tumores malignos por degradación del exceso de ácido hialurónico en estos sitios.

5 **i. Uso en el tratamiento de la acumulación de glicosaminoglicanos en la enfermedad cardiovascular**

La hialuronidasa se puede utilizar en el tratamiento de alguna enfermedad cardiovascular. La administración de hialuronidasa en modelos animales después de infarto de miocardio experimental puede reducir el tamaño del infarto (Maclean, et al (1976), Science 194 (4261): 199-200). Un mecanismo propuesto por el cual se puede producir esto es mediante la reducción de la acumulación de ácido hialurónico que se produce después de la reperusión de la isquemia. Se cree que la reducción del tamaño del infarto se produce a partir del drenaje linfático y el aumento de la oxigenación del tejido y la reducción del contenido de agua del miocardio.

Las hialuronidasas también se pueden utilizar para limitar las placas coronarias de la arterioesclerosis. Tales placas acumulan glicosaminoglicanos y median la adherencia celular de macrófagos y células espumosas (Kolodgie et al. (2002) Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22 (10): 1642-8).

j. Uso en la enfermedad pulmonar

Los niveles de ácido hialurónico en lavados broncoalveolares (BAL) de individuos normales están generalmente por debajo de 15 ng/mL. Sin embargo, los niveles de ácido hialurónico en el BAL aumentan drásticamente en condiciones de dificultad respiratoria (Bjerner et al. (1987) Br Med J (Clin Res Ed) 295 (6602): 803-6). El aumento del ácido hialurónico en el pulmón puede impedir la difusión de oxígeno y el intercambio gaseoso, así como la activación de respuestas de neutrófilos y macrófagos. Las preparaciones purificadas de rHuPH20 soluble, tales como las producidas utilizando los métodos proporcionados en la presente memoria, pueden ser liberadas por medio de liberación pulmonar o intravenosa a los pacientes que se presentan con tales afecciones para reducir los niveles de hialuronano. Las hialuronidasas también se pueden administrar a pacientes que padecen otras complicaciones pulmonares que están asociadas con glicosaminoglicanos elevados o para aumentar la liberación de otras moléculas co-liberadas en el pulmón.

k. Otros usos

En otros ejemplos de su uso terapéutico, la hialuronidasa se puede utilizar para fines tales como un antídoto para la necrosis local procedente de inyección paravenosa de sustancias necróticas como alcaloides de Vinca (Few et al. (1987) Amer. J. Matern. Child Nurs. 12, 23-26), el tratamiento de quistes ganglionares (Paul et al. (1997) J Hand Surg. 22(2): 219-21) y el tratamiento de la necrosis del tejido debida a insuficiencia venosa (Elder et al. (1980) Lancet 648-649). Las hialuronidasas también se pueden utilizar para tratar quistes ganglionares (también conocidos como quistes de muñeca, quiste Bible, o quiste dorsal del tendón), que son la masa de tejido blando más común de la mano y son sacos llenos de líquido que se pueden sentir por debajo de la piel.

Las hialuronidasas se pueden utilizar en el tratamiento de la lesión de la médula espinal mediante la degradación de los proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG). Después de una lesión de la médula espinal, los astrocitos producen cicatrices gliales que contienen CSPG. Los CSPG desempeñan un papel crucial en la inhibición del crecimiento axonal. Además, se ha demostrado que la expresión de CSPG aumenta después de una lesión del sistema nervioso central (SNC). Las hialuronidasas se pueden utilizar también para el tratamiento de discos herniados en un proceso conocido como quimionucleólisis. La condroitinasa ABC, una enzima que escinde sustratos similares a los de la hialuronidasa, puede inducir la reducción de la presión intradiscal en la columna vertebral lumbar. Hay tres tipos de lesiones del disco. Un disco sobresaliente es uno que está intacto pero abultado. En un disco extruido, la envoltura fibrosa ha roto y el NP ha rezumado, pero todavía está conectado al disco. En un disco secuestrado, un fragmento de NP se ha desprendido del disco y está libre en el canal espinal. La quimionucleólisis es típicamente eficaz en discos sobresalientes y extruidos, pero no en lesiones de disco secuestrado.

D. Células que expresan rHuPH20 soluble

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para generar y purificar grandes cantidades de rHuPH20 soluble. La rHuPH20 soluble se expresa en células CHO que se cultivan en cultivo celular a gran escala. La expresión se lleva a cabo utilizando un vector de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 3 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 482 del polipéptido PH20 humano precursor mostrado en el SEQ ID NO: 1). Después de la traducción, la secuencia señal de 35 aminoácidos se escinde y la rHuPH20 soluble se secreta al medio. El vector también contiene un IRES aguas abajo de la región codificante de rHuPH20 soluble, un gen de dihidrofolato reductasa de ratón y la secuencia de SV40 pA. El vector de expresión se introdujo en células DG44, que deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr-) que han sido adaptadas para crecer en cultivo en suspensión en un medio libre de producto animal definido químicamente. Las células que expresan rHuPH20 solubles resultantes incluyen aquellas descritas en los Ejemplos

1 y 4, más abajo, e incluyen las células denominadas células 3D35M, 2B2, 3E10B, 1B3, 5C1, 1G11 y 2G10.

Se pueden utilizar otras células para producir hialuronidasas similares a rHuPH20. Generalmente, se utilizan sistemas de expresión de proteínas adecuados para la introducción de residuos de glicosilación unidos a N críticos en hialuronidasas. Tales células incluyen, por ejemplo, células de levadura, células fúngicas, células vegetales, células de insectos y células de mamíferos. Se encuentran disponibles muchas líneas celulares para la expresión en mamífero incluyendo células de ratón, rata, humano, mono, pollo y hámster. Las líneas celulares ilustrativas incluyen, pero no se limitan a líneas celulares CHO (incluyendo células DG44 y células CHO-S), Balb/3T3, HeLe, MT2, NS0 de ratón (no segregante) y otras líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, células SP2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8, y HKB. También se encuentran disponibles líneas celulares adaptadas a medios libres de suero, lo que facilita la purificación de las proteínas secretadas a partir de los medios de cultivo celular.

a. Células 3D35M

Son ilustrativas de las células que expresan rHuPH20 soluble las células 3D35M, descritas en el Ejemplo 1, a continuación, y en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos 20040268425, 20050260186y 20060104968. Las células 3D35M son células CHO DG44 deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr) que expresan la rHuPH20 soluble. Las células se transformaron con un vector de expresión HZ24 que tenía la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 50. Este vector contiene un promotor de CMV que dirige la expresión de ácido nucleico que codifica un polipéptido de 482 aminoácidos (SEQ ID NO: 3) que corresponde a las posiciones de aminoácidos 1 a 482 de PH20 humana completa mostrada en el SEQ ID NO: 1. Esto incluye una secuencia señal N-terminal de 35 aminoácidos. El vector también contiene un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) después de la secuencia codificante de PH20, seguido de un gen de dihidrofolato reductasa de ratón y la secuencia de poliadenilación de SV40. Después de la traducción, el polipéptido de 482 aminoácidos se procesa para eliminar la secuencia señal de 35 aminoácidos, lo que da como resultado la secreción de rHuPH20 soluble.

La caracterización de las células 3D35M demostró que la región de ácido nucleico que codifica la rHuPH20 soluble está presente en las células a un número de copias de aproximadamente 318 copias/célula. La rHuPH20 soluble producida a partir de las células 3D35M por los métodos de la presente invención es una mezcla de especies que puede incluir uno o más de los polipéptidos que tienen las secuencias mostradas en los SEQ ID NO: 4-9. En una caracterización ilustrativa de estas especies (descritas en el Ejemplo 11), la especie mostrada en el SEQ ID NO: 4 estuvo presente a una abundancia de 0,2%, la especie mostrada en el SEQ ID NO: 5 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 446 del SEQ ID NO: 4) estuvo presente a una abundancia de 18,4%, la especie mostrada en el SEQ ID NO: 6 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 445 del SEQ ID NO: 4) estuvo presente a una abundancia de 11,8%, la especie mostrada en el SEQ ID NO: 7 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 444 del SEQ ID NO: 4) estuvo presente a una abundancia de 56,1%; y la especie mostrada en el SEQ ID NO: 8 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 443 del SEQ ID NO: 4) estuvo presente a una abundancia de 13,6%. Tal heterogeneidad en la preparación rHuPH20 soluble es probablemente un resultado de la escisión C-terminal por las peptidasas presentes durante los métodos de producción y purificación proporcionados en la presente memoria.

Las células 3D35M se pueden cultivar en medio de cultivo celular con o sin metotrexato. También se pueden añadir suplementos adicionales, tales como glutamina. En algunos ejemplos, las células se cultivan en medio de cultivo celular que contiene, por ejemplo, metotrexato 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM, o 2 µM y carente de hipoxantina y timidina. En un ejemplo, las células 3D35M se cultivan a 37°C en CO₂ al 5-7% en medio de cultivo (tal como medio CD CHO, Invitrogen) sin hipoxantina o timidina y con metotrexato 100 nM y glutamina o un sustituto de glutamina, tal como L-Alanil-L-Glutamina, una forma dipeptídica estabilizada de L-glutamina. Se pueden utilizar otros medios de cultivo celular apropiados para las células CHO para el cultivo de células 3D35M incluyendo, pero no limitados a, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), medio de Eagle modificado de Iscove (IMEM), F12 y RPMI. Las células 3D35M cultivadas bajo tales condiciones en matraces oscilante pueden producir más de 1000 unidades/mL de actividad hialuronidasa. Cuando se cultivan en un biorreactor, tal como se describe en el Ejemplo 3, a continuación, las células 3D35M pueden producir rHuPH20 soluble con actividad enzimática superior a 2000 unidades/mL.

b. Células 2B2

Los ejemplos de las células que expresan rHuPH20 soluble para la producción de rHuPH20 en los métodos proporcionados en la presente memoria se describen en el Ejemplo 4 y se denominan células 2B2. Las células 2B2 se generaron mediante la adaptación de células 3D35M a niveles más altos de metotrexato (es decir 20 µM) y la selección de clones que crecían en la concentración de metotrexato más alta. Esta adaptación aumentó la actividad hialuronidasa producida por las células. Las células DG44 son deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr-) y, por lo tanto, no pueden elaborar nucleósidos. El vector de expresión presente en las células 3D35M y 2B2 contiene, además del gen H20, la secuencia codificante para dihidrofolato reductasa de ratón. El metotrexato es un fuerte inhibidor competitivo de la dihidrofolato reductasa. Por lo tanto, mediante el aumento de la concentración de

metotrexato en el medio de cultivo, las células que expresan hialuronidasa se ven obligadas a producir más dihidrofolato reductasa de ratón para seguir siendo viables. Esto se puede efectuar, por ejemplo, mediante amplificación de genes o reordenamiento del ADN integrado a una disposición más estable y productiva. Por lo tanto, forzando un aumento en la producción de dihidrofolato reductasa de ratón también se puede producir un aumento en la producción de sHuPH20. Una comparación de la actividad enzimática de la rHuPH20 soluble producida por las células 2B2 y las células 3D35M demostró que la actividad era típicamente entre 80% y 100% más alta en las células 2B2 (véase, p. ej. el Ejemplo 5, a continuación) en comparación con las células 3D35M.

Las células 2B2 fueron seleccionados entre los clones celulares que fueron aislados después de la selección con metotrexato 20 μ M como la línea celular que producía rHuPH20 soluble que tenía una mayor actividad enzimática (véase, p. ej., el Ejemplo 4). Cuando se caracterizó, se observó que la región de ácido nucleico que codificaba rHuPH20 soluble estaba presente en las células 2B2 en un número de copias de aproximadamente 206 copias/célula. El análisis de transferencia Southern de ADN genómico de células 2B2 digerido con Spe I-, Xba I y BamH I/Hind III utilizando una sonda específica para la región de ácido nucleico que codificaba rHuPH20 soluble reveló el siguiente perfil de digestión de restricción: una banda principal de hibridación de $\sim 7,7$ kb y cuatro bandas de hibridación menores ($\sim 13,9$, $\sim 6,6$, $\sim 5,7$ y $\sim 4,6$ kb) con ADN digerido con Spe I; una banda principal de hibridación de $\sim 5,0$ kb y dos bandas de hibridación menores ($\sim 13,9$ y $\sim 6,5$ kb) con ADN digerido con Xba I; y una banda de hibridación única de $\sim 1,4$ kb observada utilizando ADN de 2B2 digerido con BamH I/Hind III.

Las células 2B2 se pueden cultivar en medio de cultivo celular con o sin metotrexato. También se pueden añadir otros suplementos, tales como glutamina, insulina y extracto de levadura. En algunos ejemplos, las células se hacen crecer en medio de cultivo celular que contiene, por ejemplo, metotrexato 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M o más y carente de hipoxantina y timidina. En un ejemplo, las células 2B2 se cultivan a 37°C en CO₂ al 5-7% en medio de cultivo (tal como Medio CD CHO, Invitrogen) sin hipoxantina ni timidina y con metotrexato 20 nM y glutamina o L-alanil-L-glutamina, una forma dipeptídica estabilizada de L-glutamina. Se pueden utilizar otros medios de cultivo celular apropiados para cultivar las células CHO para cultivar las 2B2 células, incluyendo, pero no limitados a, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), medio de Eagle modificado de Iscove (IMEM), F12 y RPMI. Las células 2B2 cultivadas bajo tales condiciones en matraces oscilante pueden producir más de 3000 unidades/mL de actividad hialuronidasa. Cuando se cultivan en un biorreactor, tal como se describe en el Ejemplo 8, a continuación, las células 2B2 pueden producir rHuPH20 soluble que tiene actividad enzimática de más de 17.000 unidades/mL de actividad hialuronidasa.

La rHuPH20 soluble producida a partir de células 2B2 por los métodos de la presente invención es una mezcla de especies de polipéptidos que tienen las secuencias mostradas en los SEQ ID NOS: 4-9. En una caracterización ilustrativa el producto de la rHuPH20 soluble producida por las células 2B2 (descrito en el Ejemplo 11), la especie mostrada en el SEQ ID NO: 4 estuvo presente en una abundancia de 1,9%, la especie mostrada en el SEQ ID NO: 5 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 446 del SEQ ID NO: 4) estuvo presente en una abundancia de 46,7%, la especie mostrada en el SEQ ID NO: 6 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 445 de SEQ ID NO: 4) estuvo presente en una abundancia de 16,7%, la especie mostrada en el SEQ ID NO: 7 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 444 del SEQ ID NO: 4) estuvo presente en una abundancia de 27,8%; y la especie mostrada en el SEQ ID NO: 8 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 443 del SEQ ID NO: 4) estuvo presente en una abundancia de 6,9%. Como se ha señalado para la rHuPH20 soluble producida a partir de células 3D35M, la heterogeneidad en la preparación de rHuPH20 soluble de células 2B2 es probablemente resultado de la escisión C-terminal por peptidasas presentes durante los métodos de producción y purificación proporcionados en la presente memoria.

E. expansión del cultivo celular

Los métodos descritos en la presente memoria emplean biorreactores para hacer crecer grandes volúmenes de cultivo celular para producir grandes cantidades de rHuPH20 soluble. Como se describe en detalle más adelante, estos métodos incluyen una fase de expansión celular, una fase de producción de proteínas, una fase de concentración de proteína y cambio de tampón, y una fase de purificación. Las células que expresan rHuPH20 solubles, tales como células 2B2, se expanden inicialmente a partir de un inóculo original, tal como una alícuota de células de un banco de células de trabajo (WCB) o banco de células maestro (MCB), a un volumen más grande antes del cultivo en el biorreactor para la fase de producción. El volumen de cultivo final en la fase de expansión es directamente proporcional al volumen del biorreactor utilizado en la siguiente fase de producción. Típicamente, se inocula un biorreactor más grande utilizando un volumen de cultivo final de la fase de expansión más grande que es un biorreactor más pequeño.

Las células que expresan rHuPH20 soluble se expanden a través de una serie de cultivos, incrementando cada uno en volumen con respecto a la anterior, y utilizándose cada uno como el inóculo para el cultivo posterior. Los ejemplos de tales células son las células 2B2. El inóculo original es típicamente uno en el que la pureza y la identidad de las células y el número de células están definidos. Estas células se pueden almacenar congeladas, tal como a -20°C, -70°C o -80°C, o se pueden mantener en medios líquidos, por ejemplo, a 4°C, o mantener en cultivo, por ejemplo, a 37°C. En algunos casos, el inóculo original es una alícuota de un banco de células maestro o un banco de células de trabajo que se ha almacenado congelado. En tales casos, el inóculo se descongela, por ejemplo

en un baño de agua a 37°C. El inóculo celular original se centrifuga típicamente y las células se resuspenden en un medio de cultivo celular apropiado. Por ejemplo, las células 2B2 se pueden resuspender, y posteriormente, cultivar en medios basales, tales como medios CD CHO (Invitrogen), o medios CD CGO AGT™ en polvo reconstituidos (Invitrogen), con un suplemento de glutamina o L-alanil-L- glutamina 8 mM y metotrexato 20 mM. En otro ejemplo, las células pueden ser cultivadas en medios basales con un suplemento de glutamina o L-alanil-L-glutamina 8 mM y metotrexato 100 mM. También se puede utilizar cualquier otro medio de cultivo celular adecuado para expandir las células que expresan hialuronidasa. Por ejemplo, se pueden cultivar las células en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), medio de Eagle modificado de Iscove (IMEM), F12, RPMI, u otros medios químicamente definidos o indefinidos, con o sin suplementos adicionales. Típicamente, las células se hacen crecer en medio libre de suero, pero también se pueden cultivar en medios que contienen suero. Un experto en la técnica podría preparar medios de cultivo celular utilizando otros medios de cultivo celular basales a la que se pueden añadir diversos nutrientes como suplemento para elaborar medios de cultivo celular en los que se cultivan las células que expresan rHuPH20 soluble.

El inóculo de las células se añade al primero de una serie de volúmenes crecientes de medio de cultivo celular, expandiendo así el cultivo celular. Después de la inoculación inicial, las células se expanden en un incubador humidificado o biorreactor a una temperatura apropiada con una cantidad apropiada de CO₂. Típicamente, la cantidad de CO₂ se encuentra entre 4% y 9%, típicamente entre 6,0% y 8,0%, tal como 7,0% y la temperatura se encuentra entre 35°C y 39°C, típicamente entre 36°C y 38°C, tal como 37°C. Por ejemplo, las células 2B2 y 3D35M se pueden cultivar en un incubador humidificado a 37°C con CO₂ al 7%. El cultivo puede ser agitado, por ejemplo a 90-130 rpm, durante este proceso. Cuando las células alcanzan la densidad deseada, tal como, por ejemplo, más de $1,0 \times 10^6$ células/mL (p. ej., entre $1,5 \times 10^6$ células/mL y $2,5 \times 10^6$ células/mL), el cultivo celular se utiliza para inocular un volumen más grande de medios de cultivo celular frescos. Por ejemplo, las células pueden ser inoculadas en el siguiente cultivo a una densidad de 4×10^4 a 4×10^6 células/mL, típicamente de 2×10^5 a 6×10^5 células/mL, tal como 4×10^5 células/mL. El proceso se repite hasta que las células se han ampliado hasta el volumen y la densidad celular deseados para la siembra, por ejemplo, de 4×10^4 a 4×10^6 células/mL en el biorreactor.

En un ejemplo, las células que expresan rHuPH20 soluble, tales como las células 2B2, se añaden inicialmente a aproximadamente 20 mL de medio de cultivo celular fresco en un matraz oscilante de 125 mL, dando como resultado un volumen de cultivo de 20-30 mL, típicamente 25 mL. Después de la incubación a 37°C, CO₂ al 7% y expansión de las células a una densidad de más de $1,5 \times 10^6$ células/mL, se añade medio fresco al matraz para expandir el cultivo celular a 40 mL. Las células se incuban de nuevo hasta que se alcanza una densidad de más de $1,5 \times 10^6$ células/mL, después de lo cual se añade todo el cultivo celular (aproximadamente 40 mL) a medios fresco hasta hacer 100 mL de volumen de cultivo en un matraz de agitación de 125 mL. Este proceso se repite transfiriendo todo el cultivo celular (aproximadamente 100 mL) a un matraz de agitación de 250 mL que contiene suficiente medio fresco para alcanzar un volumen de cultivo final de 200 mL, a continuación, a un matraz de agitación de 1 L que contiene suficiente medio fresco para alcanzar un volumen de cultivo final de 800 mL, a continuación, un matraz de agitación de 6 L que contiene suficiente medio fresco para alcanzar un volumen de cultivo final de 5 L, y finalmente a un matraz de agitación de 36 L que contiene suficiente medio fresco para alcanzar un volumen de cultivo final de 32 L. Entre cada transferencia, las células se incuban hasta que el cultivo alcanza una densidad de más de $1,5 \times 10^6$ células/mL. En algunos ejemplos, se logra una mayor densidad celular después de la incubación del matraz de agitación de 36 L final. Por ejemplo, las células en el matraz de agitación de 36 L se pueden expandir a una densidad celular de $3,55 \times 10^6$ células/mL a $6,05 \times 10^6$ células/mL. Este proceso se puede utilizar para expandir las células que expresan rHuPH20 soluble antes de la introducción en un biorreactor de 400 L (volumen de cultivo 300 L) para la fase de producción de proteínas (véase, p. ej., el Ejemplo 8).

Este proceso, como cualquiera de los procesos descritos en la presente memoria, también puede ser aumentado a escala por un experto en la técnica para la introducción de las células en un biorreactor con un volumen de cultivo más grande que 300 L. Por ejemplo, el proceso se puede aumentar a escala para la introducción de las células en un biorreactor con un volumen de cultivo 2.500 L, tal como se describe en el Ejemplo 12. Por lo tanto, en un ejemplo de los métodos proporcionados en la presente memoria, después de la descongelación, las células se expanden en serie por medio de un matraz oscilante de 125 mL (volumen de trabajo de 20-30 mL, tal como 25 mL), un matraz oscilante de 250 mL (volumen de trabajo de 45-55 mL, tal como 50 mL), un matraz oscilante de 1 L (volumen de trabajo de 190-210 mL, tal como 200 mL), dos matraces oscilantes de 2 L (volumen de trabajo de 350-450 mL por matraz, tal como 400 mL por matraz), seis matraces oscilantes de 2 L (volumen de trabajo de 350 a 450 mL por matraz, tal como 400 mL por matraz), un biorreactor de ola de 25 L (volumen de trabajo de 14 a 16 L, tal como 15 L), un biorreactor de ola de 100 L (volumen de trabajo de 75-85 L, tal como 80 L), y un biorreactor de siembra de 600 L (volumen de trabajo de 440 a 520 L, tal como 480 L).

F. Producción de proteínas

Después de la expansión celular, las células que expresan rHuPH20 soluble se transfieren a un biorreactor para la fase de producción, durante la cual se secretan grandes cantidades de rHuPH20 soluble al medio celular. Esta fase

normalmente está diseñada de tal manera que el crecimiento de las células se maximiza en la primera mitad de la ronda en el biorreactor, y la producción de rHuPH20 soluble se maximiza en la segunda mitad de la ronda en el biorreactor. Se proporciona a las células una serie de medios de alimentación en puntos de tiempo concretos a lo largo de la producción para regular este proceso. Las condiciones del biorreactor también son controladas típicamente para asegurar que se mantienen unas condiciones óptimas durante todo el proceso. Los métodos descritos en la presente memoria para la proteínas pueden ser reducidos o aumentados a escala por un experto en la técnica. Además, las modificaciones, por ejemplo, de los medios, los tiempos de incubación, los protocolos de alimentación. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente las condiciones apropiadas para la producción de proteínas para cualquier biorreactor y tipo de célula dados.

Se pueden utilizar biorreactores de diferentes tamaños y diseños en los métodos de la presente memoria. En algunos ejemplos, se utiliza un biorreactor de 125 L, 400 L o 3500 L en los métodos de la presente memoria para cultivar células en volúmenes de aproximadamente 100L, 300L y 2. 500 L, respectivamente. Típicamente, el biorreactor se esteriliza antes de la adición de medios de cultivo celular o células. La esterilización se puede efectuar mediante tratamiento en autoclave o tratamiento de otro modo con vapor de agua para algunos biorreactores, o mediante tratamiento con una solución esterilizante, tal como hidróxido de sodio diluido, ácido nítrico diluido o hipoclorito de sodio. En algunos ejemplos, el biorreactor se esteriliza por medio de vapor de agua a 121°C, 1,41 kg/cm² durante 30 minutos. Después de la esterilización, se pueden añadir medios de cultivo celular al biorreactor y luego evaluar la contaminación, tal como la contaminación microbiana, después de un período de tiempo para asegurar que el proceso de esterilización fue eficaz.

El cultivo celular de la fase de expansión, descrito anteriormente, se añade al biorreactor esterilizado que contiene medio de cultivo celular fresco. Las células que expresan rHuPH20 soluble se inoculan en el medio de cultivo celular fresco a una densidad celular de 14^5 a 10^6 células/mL. En un ejemplo, las células que expresan rHuPH20 soluble se inoculan a una densidad celular de 4×10^5 células/mL. El recuento total de células después de la inoculación depende del tamaño del biorreactor y de la densidad celular. Por ejemplo, un volumen de cultivo celular de 100 L puede tener una densidad celular después de la inoculación de aproximadamente 10^{10} o 10^{11} células.

Los volúmenes de inoculación de cultivo celular y los medios de cultivo frescos utilizados dependen del tamaño del biorreactor y de la densidad celular del inóculo. Por ejemplo, se pueden añadir aproximadamente 30 L de células que expresan rHuPH20 soluble, tales como células 2B2, a un biorreactor de 400 L que contiene 230 L de medio de cultivo celular fresco, para un volumen total de aproximadamente 260 L y una densidad celular de inoculación de 4×10^5 células/mL (recuento total de células de aproximadamente 10^{11} células). Esto se puede aumentar o disminuir a escala según sea necesario, dependiendo del biorreactor.

En un ejemplo, para la producción en un biorreactor de 3500 L, se añaden las células 2B2 a medios de cultivo celular frescos para un volumen total de cultivo celular de 1900-2300 L, tal como 2100 L.

El medio de cultivo celular fresco contiene los suplementos apropiados para proporcionar los nutrientes necesarios a las células para promover el crecimiento celular. Los suplementos que se pueden añadir al medio de células basales incluyen, pero no se limitan a, glucosa, insulina, butirato de sodio, extracto de levadura y glutamina o un sustituto de glutamina, tal como L-alanil-L-glutamina. En algunos casos, el medio basal contiene glucosa suficiente para que no haya necesidad de añadir más glucosa. En otros casos, se añade glucosa a los medios más tarde en el proceso de producción, tal como en un medio de alimentación posterior. La adición de insulina al medio puede promover el crecimiento celular y aumentar la densidad celular máxima. La glutamina o los sustitutos de glutamina, tales como L-alanil-L-glutamina, puede apoyar el progreso del ciclo celular y también mejorar el crecimiento celular. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad y la calidad de los nutrientes que se pueden añadir como complemento al medio basal. En algunos ejemplos, se añaden glutamina o sustituto de glutamina al medio de cultivo celular basal a 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 15 mM o 20 mM. La insulina se puede añadir al medio de cultivo celular, por ejemplo, de 0,5 mg/L a 50 mg/L, tal como de 1 mg/L a 40 mg/L, de 2 mg a 30 mg/L, o de 5 mg/L, a 20 mg/L. Por ejemplo, medio de cultivo celular basal con suplemento de 5 mg/L de insulina y L-alanil-L-glutamina 8 mM se puede utilizar como medio de cultivo celular fresco en el que se inoculan las células que expresan rHuPH20 soluble. También se pueden añadir suplementos adicionales, tales como antibióticos, antifúngicos, indicadores, sales, vitaminas, aminoácidos y factores de crecimiento.

Los parámetros individuales del biorreactor se pueden ajustar para mantener las condiciones óptimas a lo largo de todo el proceso de producción de proteínas. Los parámetros específicos que se pueden establecer dependen del biorreactor utilizado, y pueden incluir, pero no se limitan a, la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, la velocidad del impulsor, la presión del recipiente, el burbujeo de aire y la superposición de aire. En un ejemplo, las condiciones de un biorreactor de 125 L que contiene 100 L de cultivo celular de células 3D35M se establecen para; temperatura: 37°C; oxígeno disuelto: 25% $\pm$ 10%; velocidad del impulsor: 50 RPM; presión del recipiente: 0,21 kg/cm²; burbujeo de aire: 1 L/minuto; superposición de aire: 1 L/minuto, pH: 7,2. En otro ejemplo, las condiciones de un biorreactor de 400L que contiene un volumen de cultivo celular inicial de 260 L se ajustan a; temperatura: 37°C; velocidad del impulsor 40-55 RPM; presión del recipiente: 0,21 kg/cm²; burbujeo de aire: 0,5-1,5 L/minuto; superposición de aire: 1 L/minuto. En un ejemplo adicional, las condiciones de un biorreactor 3000 L que contiene un volumen de cultivo

inicial de 2100 L se ajustan a; temperatura: 37°C (o entre 36,5°C y 37,5°C; velocidad del impulsor: 35 RPM (o 70-80 RPM); presión del recipiente: 0,35 kg/cm² (o 0,21-0,49 kg/cm²); burbujeo de aire: 12 L/minuto (u 11-13 L/minuto); oxígeno disuelto: 25%, o > 25%; pH pre-inoculación: 7,2 (o pH 7,1 a 7,3); pH post-inoculación: ≤ 7, 2 (o ≤ 7,3). Un experto en la técnica puede determinar empíricamente las condiciones apropiadas para el crecimiento de una célula que expresa rHuPH20 soluble particular, en un biorreactor particular.

Las células que expresan rHuPH20 soluble son normalmente cultivadas en el biorreactor durante entre 10 y 25 días. En algunos ejemplos, las células que expresan rHuPH20 soluble son cultivadas en el biorreactor durante 12, 13, 14, 15 o 16 días antes de la cosecha. Las células se cosechan cuando el recuento de células viables (VCC) cae a un nivel concreto, tal como, por ejemplo, 25%, 30%, 35%, 40%, o 45%. En un ejemplo, las células se cosechan cuando la VCC está entre 30% y 35%. En otro ejemplo, las células se cosechan a las 24 horas de que la VCC caiga por debajo de 50%.

Durante el cultivo en el biorreactor, las células se hacen crecer como cultivos alimentados por lotes y se proveen de una serie de medios de alimentación en puntos de tiempo concretos para complementar los nutrientes y la glucosa. En algunos casos, los nutrientes proporcionados en el medio de cultivo celular en el que se inoculan las células se han agotado a los 3, 4, 5, 6, 7 días o más después de la inoculación. Por lo tanto, proporcionar nutrientes o suplementos adicionales puede producir rendimientos más altos de proteína que en los cultivos por lotes. En un ejemplo, las células cuentan con medios de alimentación en los días 6, 9 y 11 después de la inoculación. En otro ejemplo, las células cuentan con medios de alimentación en los días 7, 9 y 11 después de la inoculación. En un ejemplo adicional, las células cuentan con medios de alimentación en los días 5, 7, 9 y 11 después de la inoculación. El volumen de los medios de alimentación añadido al biorreactor de cultivo oscila entre 0,5% y 20%, tal como 1-20%, 2-15%, 3-10% o 4-5% del volumen de cultivo celular. En algunos casos, los medios de alimentación se añaden a un volumen equivalente al 4% del volumen de cultivo celular.

La adición de varios suplementos a los medios de alimentación se utiliza para regular el crecimiento y/o el ciclo celular de las células. Los nutrientes y suplementos que se incluyen en los medios de alimentación incluyen, pero no se limitan a, glutamina o sustituto de glutamina, tal como L-Alanil-L-Glutamina, insulina, extracto de levadura, glucosa y butirato de sodio o butirato de sodio. Además, los medios basales utilizados en los medios de alimentación también pueden ser concentrados, proporcionando así nutrientes adicionales, tales como aminoácidos esenciales, que pueden haberse agotado durante el cultivo celular. Los medios basales en los medios de alimentación pueden ser concentrados 2 × 3 ×, 4 ×, × 5, 6 × o más. En otros ejemplos, los medios basales están menos concentrados, o tienen la misma concentración que el medio de cultivo celular en el biorreactor.

Los suplementos incluidos en los medios de alimentación pueden ser utilizados para regular el crecimiento celular y la producción de proteínas. El primer medio de alimentación añadió al cultivo celular incluye nutrientes que mejoran el progreso del ciclo celular, el crecimiento celular y la densidad celular máxima. Los medios de alimentación posteriores promueven la detención del crecimiento celular y/o la síntesis de proteínas. La cantidad de cada suplemento en cada medio de alimentación puede variar, como por ejemplo mediante el aumento o la disminución de un medio de alimentación al siguiente, o puede ser la misma de un medio de alimentación al siguiente. En algunos ejemplos, la cantidad de suplemento aumenta de un medio de alimentación al siguiente, por ejemplo un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100 %, 150%, 200%, 300%, 400% o más. En otros ejemplos, la cantidad de suplemento disminuye de un medio de alimentación al siguiente, por ejemplo un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90 % o más. En un ejemplo, se omite un suplemento de un medio de alimentación. En otros ejemplos, la cantidad de un suplemento en el medio de alimentación sigue siendo la misma. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad óptima de cada suplemento para cada medio de alimentación para promover la cantidad deseada de crecimiento celular y la producción de proteínas.

Los suplementos o nutrientes que se incluyen en los medios de alimentación incluyen, pero no se limitan a, glucosa, glutamina o sustituto de glutamina, tal como L-alanil-L-glutamina, insulina, y butirato de sodio. El tipo y la cantidad de suplemento añadido pueden influir en el crecimiento celular y la producción de proteínas.

La insulina y el sustituto de glutamina L-Alanil-L-Glutamina se incorporan al primer medio de alimentación añadido al cultivo celular para aumentar el crecimiento celular y la densidad celular máxima. Los medios de alimentación posteriores están diseñados para promover la producción de proteínas más que el crecimiento celular. El suplemento de insulina se excluye y se reduce la cantidad de L-Alanil-L-Glutamina. En contraste, se aumenta la cantidad del suplemento de extracto de levadura, que mejora la síntesis de proteínas. También se incluye butirato de sodio que mejora la detención del ciclo celular y, por lo tanto, aumenta la producción de proteína.

La adición de la insulina puede aumentar la densidad celular máxima, por ejemplo, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o más. La insulina se añade a los medios de alimentación tempranos, es decir, los primeros medios de alimentación, para promover el crecimiento celular máximo en la fase inicial del proceso del biorreactor. Por ejemplo, el primer medio de alimentación, puede contener una cantidad de insulina de, o aproximadamente de, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L, 30 mg/L, 35 mg/L, 40 mg/L, 45 mg/L, 50 mg/L, 55 mg/L, 60 mg/L o más.

El sustituto de glutamina, L-Alanil-L-Glutamina, también se añade a los medios de alimentación. La cantidad de sustituto de glutamina añadido al primer medio de alimentación es mayor que la cantidad de sustituto de glutamina añadido a los medios de alimentación posteriores. La cantidad de sustituto de glutamina añadido a cada medio de alimentación posterior se reduce en comparación con la cantidad añadida a los primeros medios de alimentación. La cantidad óptima añadida a cada medio de alimentación puede ser determinada empíricamente por un experto en la técnica, y puede incluir, por ejemplo, concentraciones de sustituto de glutamina de o alrededor de 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM o más.

Por lo general, los medios basales utilizados en los medios de alimentación también se complementan con glucosa. La cantidad de glucosa añadida a cada medio de alimentación puede ser aumentada o disminuida con respecto a los medios de alimentación anteriores, o puede permanecer aproximadamente constante. En algunos ejemplos, la cantidad de glucosa añadida a los medios de alimentación es de, o aproximadamente de, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L, 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L, 55 g/L, 60 g/L, 75 g/L, 80 g/L o más.

Además, también se incluyen los suplementos que promueven la síntesis de proteínas. Estos nutrientes incluyen extracto de levadura. En algunos casos, se incrementa la cantidad de extracto de levadura incluido en los medios de alimentación durante la ronda del biorreactor. Por ejemplo, la cantidad de extracto de levadura en los terceros medios de alimentación se puede aumentar en comparación con la cantidad en el segundo medio de alimentación, que se puede aumentar en comparación con la cantidad en el segundo medio de alimentación. En algunos ejemplos, la cantidad de extracto de levadura añadida a los medios de alimentación es de entre 5 y 1.000 g/L, por ejemplo o aproximadamente 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L, 50 g/L, 75 g/L, 100 g/L, 125 g/L, 150 g/L, 175 g/L, 200 g/L, 250 g/L, 300 g/L, 350 g/L, 400 g/L o más.

También se incluyen suplementos que mejoran la detención del ciclo celular y, por lo tanto, aumentan la producción de proteína, es decir, butirato de sodio. Típicamente, tal suplemento se incluye en los medios de alimentación que se añaden al biorreactor más adelante en la ronda y no se incluyen en el primer medio de alimentación. El butirato de sodio que mejora la detención del ciclo celular se añade a los segundos medios de alimentación y a los medios de alimentación posteriores. En algunos ejemplos, la cantidad de butirato de sodio añadida a los medios de alimentación es de entre 0,1 g/L y 10 g/L, por ejemplo o aproximadamente 0,2 g/L, 0,3 g/L, 0,4 g/L, 0,5 g/L, 0,6 g/L, 0,7 g/L, 0,8 g/L, 0,9 g/L, 1,0 g/L, 1,1 g/L, 1,2 g/L, 1,3 g/L, 1,4 g/L, 1,5 g/L, 1,6 g/L, 1,7 g/L, 1,8 g/L, 1,9 g/L, 2,0 g/L, 2,5 g/L, 3,0 g/L, 3,5 g/L, o más.

Además, una o más cualesquiera de las condiciones del biorreactor pueden ser alterada durante la fase de producción para optimizar la producción de proteínas. La temperatura se disminuye. Esto sirve para promover la detención del ciclo celular, prolongar la viabilidad celular (aumentando de ese modo la producción de proteína total), y ayudar a estabilizar la hialuronidasa que se ha secretado. Por ejemplo, la temperatura del biorreactor puede ser reducida en cada alimentación, por ejemplo desde 37°C a 36,5°C en la segunda alimentación, a 36°C en la tercera alimentación y a 35,5°C en la cuarta alimentación. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente los medios de alimentación apropiados y el momento en el cual proporcionar la alimentación, así como las condiciones apropiadas en el biorreactor.

En un ejemplo, se provee a las células de medios de alimentación en los días 6, 9 y 11 después de la inoculación. En otro ejemplo, se provee a las células de medios de alimentación en los días 7, 9 y 11 después de la inoculación.

En un ejemplo adicional, se provee a las células de medios de alimentación en los días 5, 7, 9 y 11 después de la inoculación. Los medios de alimentación provistos en cada punto del tiempo son diferentes, e incluyen suplementos tales como, pero no limitados a, glucosa, butirato de sodio, insulina, glutamina o un sustituto glutamina y extracto de levadura tal como se definen en las reivindicaciones. Por ejemplo, las células 2B2 que crecen en un cultivo de 260 L en un biorreactor de 400 L pueden proveerse de una primera alimentación el día 5 que contiene 10,4 L de 4 × medio basal (p. ej., medio CD CHO) con 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 32 mM, 16,6 g/L de extracto de levadura y 33 mg/L de insulina, una segunda alimentación el día 7 que contiene 10,8 L de 2 × medio basal (p. ej., medio CD CHO), 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 16 mM, 33,4 g/L de extracto de levadura y 0,92 g/L de butirato de sodio, una tercera alimentación el día 9 que contiene 10,8 L 1 × medio basal (p. ej., medio CD CHO), 50 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 10 mM, 50 g/L de extracto de levadura y 1,80 g/L de butirato de sodio, y una cuarta alimentación el día 11 que contiene 1 × medio basal (p. ej., medio CD CHO), 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 6,6 mM, 50 g/L de extracto de levadura y 0,92 g/L de butirato de sodio. Esto puede ser aumentado o disminuido a escala por un experto en la técnica para la producción de rHuPH20 en biorreactores más grandes o más pequeños, respectivamente. Además, un experto en la técnica puede alterar la cantidad o el tipo de uno más suplementos añadidos a los medios para mejorar el crecimiento celular y/o la producción de proteínas.

En otro ejemplo, se provee a las células de los siguientes medios de alimentación en los días 5, 7, 9 y 11: Medio de Alimentación núm. 1: medio basal + 33 g/L de glucosa + L-alanil-L-glutamina 26,6 mM + 83.3 g/L de Yeastolate + 33 mg/L de rHuInsulina; Alimentación núm. 2: medio basal + 33 g/L de glucosa + L-alanil-L-glutamina 13,4 mM + 166,7 g/L de Yeastolate + 0,92 g/L de butirato de sodio; Alimentación núm. 3: medio basal + 50 g/L de glucosa + L-alanil-L-

glutamina 10 mM + 250 g/L de Yeastolate + 1,8 g/L de butirato de sodio; Alimentación núm. 4: medio basal + 33,3 g/L de glucosa + L-alanil-L-glutamina 6,7 mM + 250 g/L de Yeastolate + 0,92 g/L de butirato de sodio.

G. Cosecha del cultivo celular, concentración de proteína y cambio de tampón

Después de la fase de producción de proteínas, las células se cosechan y la rHuPH20 soluble que ha sido secretada al medio de cultivo celular se concentra antes del inicio del proceso de purificación. Además de la concentración de la proteína, el medio de cultivo celular se puede intercambiar por un tampón apropiado en este momento. Múltiples sistemas y procesos para efectuar la concentración de proteína y el cambio de tampón se conocen en la técnica y se pueden utilizar en los métodos de la presente memoria. A continuación se describen métodos ilustrativos de los mismos, y un experto en la técnica reconocerá que estos métodos pueden ser modificados o sustituidos por otros métodos eficaces para alcanzar un nivel satisfactorio de concentración de proteína y cambio de tampón.

Las células se cosechan del biorreactor y se procesan a través de un sistema de eliminación y acalamiento celulares para separar el líquido de cultivo celular que contiene la hialuronidasa a partir de las células y los desechos celulares. Un ejemplo de semejante sistema es aquel que contiene una serie de filtros que permiten que solamente la proteína pase a través y se recoja. Se puede utilizar cualquier filtro o serie de filtros capaces de separar la hialuronidasa de las células y los desechos celulares. Por ejemplo, la cosecha del cultivo celular se puede hacer pasar a través de una serie de filtros en cápsulas, tales como filtros de polietersulfona. Estos pueden tener tamaños de poro decrecientes para eliminar de forma gradual, por ejemplo, células, desechos celulares y partículas más pequeñas, tales como virus. En algunos ejemplos, se utiliza una serie de cuatro filtros con tamaños de poro de 8,0 µm, 0,65 µm, 0,22 µm y 0,22 µm para aclarar el cultivo celular para obtener el líquido de cultivo celular cosechado (HCCF). Otro ejemplo de un sistema de eliminación y aclarado celulares que se puede utilizar en los métodos de la presente memoria es una serie de filtros que en la primera etapa contiene cuatro módulos en paralelo, que contienen cada uno una capa de tierra de diatomeas graduada a 4-8 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a 1,4-1,1 µm, seguido de una membrana de celulosa. La segunda etapa contiene un único módulo que contiene una capa de tierra de diatomeas graduada a 0,1-0,11 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a <0,1 µm seguido de una membrana de celulosa, y la tercera etapa es un filtro de cápsula de polietersulfona de 0,22 µm.

Una vez que las células y los desechos han sido separados del HCCF, la proteína del HCCF se concentra típicamente y el medio de cultivo celular se cambia por un tampón apropiado. La proteína se puede concentrar 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 11x, 12x, 13x o más. En algunos ejemplos, la proteína se concentra 10x. En otros ejemplos, la proteína se concentra 6x. Se puede utilizar cualquier método de concentración de proteínas conocido en la técnica. Los ejemplos de tales métodos incluyen la concentración utilizando sistemas de filtración de flujo tangencial (TFF) con filtros con corte de peso molecular (MWCO). Por ejemplo, el HCCF aclarado se puede hacer pasar a través de una serie de dos filtros de polietersulfona espirales MWCO de 30 kDa para concentrar la proteína 10x. En otro ejemplo, el HCCF se hace pasar a través de una serie de cuatro filtros MWCO de 30 kDa. Para la producción a gran escala de hialuronidasa, tal como, por ejemplo, cultivos de 100 L y 300 L, se emplean típicamente filtros con áreas de superficie de entre 0,5 y 5 metros cuadrados para este propósito. En algunos ejemplos, se utilizan filtros con un área de superficie de 1,2 metros cuadrados o 2,8 metros cuadrados.

El cambio de tampón se realiza después de la concentración de proteínas. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente el tampón apropiado. Los ejemplos de los tampones adecuados son un tampón Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0, o un tampón Tris 10 mM, Na₂SO₄, pH 7,5. Después de la cosecha, la concentración y el cambio de tampón, la disolución de proteína concentrada se hace pasar típicamente a través de otro filtro, tal como un filtro de cápsula de 0,22 µm, antes de ser almacenada en una bolsa de almacenamiento estéril.

En algunos ejemplos, la disolución de proteína concentrada se trata para inactivar cualquier contaminación por virus residual. La inactivación de virus se puede llevar a cabo por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la disolución de proteína concentrada se puede mezclar con Triton X-100 al 10%, fosfato de tri-(n-butilo) al 3% (TNBP), a una concentración final de Triton X-100 al 1%, TNBP al 0,3%, a la temperatura ambiente entre 15 y 75 minutos. En algunos ejemplos, la proteína se expone a la disolución inactivación viral durante 30-45 minutos.

H. Purificación

La rHuPH20 soluble se purifica a partir de la disolución de proteína concentrada utilizando una serie de etapas de purificación. Se conocen en la técnica muchos mecanismos de purificación y se pueden utilizar en los métodos de la presente memoria. Tales métodos pueden incluir, pero no se limitan a, métodos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad (AC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de fase inversa (RPC) y cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), y métodos de filtración en gel, o cualquier combinación de los mismos.

Los ejemplos de los métodos de purificación que se utilizan para los métodos de la presente invención son una combinación de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de afinidad. En la cromatografía de intercambio iónico, las proteínas se pueden separar de una disolución compleja o una mezcla basándose en las fuerzas electrostáticas entre grupos funcionales cargados de las proteínas y los

grupos funcionales cargados de la matriz de la columna de cromatografía. Las resinas de intercambio catiónico tienen grupos funcionales cargados negativamente que atraen a los grupos funcionales cargados positivamente de las proteínas, y las resinas de intercambio aniónico tienen grupos funcionales cargados positivamente que atraen a los grupos funcionales cargados negativamente de las proteínas. Las proteínas unidas a través de fuerzas electrostáticas a la matriz se pueden hacer eluir mediante el aumento de la fuerza iónica de la disolución tampón dentro de la columna de cromatografía con el tiempo. En la cromatografía de interacción hidrófoba, una proteína se puede separar de una disolución compleja o una mezcla basándose en su carácter hidrófobo. Una disolución compleja que contiene la proteína se aplica a una columna de cromatografía equilibrada con un tampón con alto contenido de sal que facilita la unión de la proteína a la resina. A continuación se introduce una fase móvil con gradiente salino con fuerza iónica decreciente en la columna de cromatografía para liberar las proteínas unidas de la matriz. Alternativamente, la cromatografía de interacción hidrófoba puede separar una proteína monomérica de una disolución compleja o una mezcla mediante la unión de impurezas hidrófobas, incluyendo dímeros inactivos y agregados de la proteína, a la vez que permite que la proteína monomérica fluya través de la columna de cromatografía relativamente sin impedimentos. En la cromatografía de afinidad, se puede separar una proteína de una solución compleja basándose en la afinidad de la proteína por un ligando o una entidad de unión al ligando que está unido covalentemente a la matriz. Otras proteínas de la disolución compleja o la mezcla con una afinidad débil, o que carecen de afinidad, por el ligando o la entidad de unión al ligando fluyen a través de la columna de cromatografía sin impedimentos, dejando la proteína de interés unida a la matriz. La proteína puede entonces ser eluida de la columna de cromatografía mediante la alteración de las condiciones del tampón para disminuir la afinidad por el ligando o la entidad de unión al ligando.

En un ejemplo, la rHuPH20 soluble se purifica a partir de la disolución de proteína concentrada mediante purificación secuencial a través de una columna de cuentas agarosa entrecruzada, tal como una columna Q Sepharose™ (cromatografía de intercambio iónico), columna de cuentas de agarosa entrecruzada sustituida con fenilo, tal como una columna Phenyl Sepharose™ (cromatografía de interacción hidrófoba), una columna de Amino Fenil Boronato (cromatografía de afinidad) y, finalmente, a través de una columna de Hidroxiapatita (cromatografía de intercambio iónico). Cada una de estas columnas muestra diferentes propiedades de unión con respecto a la hialuronidasa, de tal manera que la columna de cuentas de agarosa entrecruzada (p. ej., columna Q Sepharose™) es una etapa de captura (es decir la rHuPH20 soluble se une a la resina mientras que algunas otras proteínas fluyen), las cuentas de agarosa entrecruzada sustituida con fenilo (p. ej., columna de Phenyl Sepharose™) es una etapa de flujo (es decir la rHuPH20 soluble fluye a través de la columna mientras que algunas otras proteínas son capturadas), la columna de Amino Fenil Boronato es otra etapa de captura, y la columna de Hidroxiapatita es una etapa de afinado para purificar adicionalmente la rHuPH20 soluble.

Antes de su uso, las columnas son típicamente esterilizadas y equilibradas. La esterilización se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, esterilización con NaOH 1,0 M. El equilibrado se puede efectuar mediante la adición de un tampón apropiado a la columna, tal como un tampón similar a o igual al tampón utilizado para lavar posteriormente la columna o el tampón en el que la proteína está contenida antes de la carga. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente tampones adecuados para su uso en el equilibrado cada columna. Los tampones ilustrativos se proporcionan a continuación. Entre cada etapa de cromatografía, la proteína eluida se puede filtrar, por ejemplo a través de un filtro de 0,22 µm, para eliminar cualquier microorganismo contaminante o grandes agregados. En algunos ejemplos, el producto eluido filtrado se almacena, por ejemplo en bolsas de almacenamiento estériles, antes de su uso en la siguiente etapa. Después de la cromatografía en columna, la hialuronidasa purificada se puede someter posteriormente a una etapa de eliminación de virus, seguida de concentración de proteína y cambio de tampón para la formulación final. Los métodos de purificación ilustrativos se describen con más detalle a continuación.

1. Columna de cuentas de agarosa entrecruzada

La proteína concentrada obtenida a partir del líquido de cultivo celular cosechado (HCCF) se puede cargar en una columna de cuentas de agarosa entrecruzada, tal como, por ejemplo, una columna Q Sepharose™, que es un intercambiador de aniones fuerte y captura la rHuPH20 soluble permitiendo al mismo tiempo que otras proteínas fluyan. La rHuPH20 soluble unida se puede hacer eluir después utilizando un tampón apropiado. Las dimensiones de la columna utilizada son típicamente dependientes del volumen de proteína concentrada obtenida del HCCF. Por ejemplo, la proteína concentrada obtenida a partir de cultivo de células que expresan hialuronidasa en un cultivo en biorreactor de 100 L se puede cargar en una columna que tiene 20 cm de alto, 14 cm de diámetro y contiene 3 L de resina. En otro ejemplo, la proteína concentrada obtenida a partir de cultivo de células que expresan rHuPH20 soluble en un cultivo en biorreactor de 300 L se puede cargar en una columna que tiene 29 cm de alto, 20 cm de diámetro y contiene 9 L de resina. Esto se puede aumentar o disminuir a escala según sea necesario, dependiendo del volumen de la disolución de proteína concentrada y la cantidad de proteína esperada. Por ejemplo, la proteína concentrada obtenida a partir del cultivo de células que expresan rHuPH20 soluble en un cultivo en biorreactor de 2500 L se puede cargar en una columna de Q Sepharose™ que tiene 26 cm de alto, 63 cm de diámetro y contiene 81 L de resina.

Antes de cargarla con la proteína, la columna se equilibra típicamente. El equilibrado se puede efectuar haciendo pasar a través de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más volúmenes de la columna de tampón. En algunos ejemplos, se hacen pasar 5 volúmenes de columna de tampón a través de la columna para el equilibrado. Los tampones adecuados para el equilibrado incluyen aquellos similares a los tampones que se utilizarán para lavar la columna después de haberse cargado la proteína. Por ejemplo, una columna de cuentas de agarosa entrecruzada, tal como una columna de Q Sepharose™ puede ser equilibrada con Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,5. Se pueden utilizar otros tampones de pH neutro, como será reconocido por un experto en la técnica.

Después de cargar el producto concentrado de proteína, la columna se lava y se hace eluir la proteína. Los tampones adecuados para el lavado de tales columnas que contienen rHuPH20 soluble unida incluyen, por ejemplo, Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0; Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0; y Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5. La columna se puede lavar con uno o más tipos de tampón. Por ejemplo, la columna se puede lavar con Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 y Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. Típicamente, el lavado se efectúa haciendo pasar a través de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más volúmenes de columna de tampón. En algunos ejemplos, se utilizan 5 volúmenes de columna de tampón para lavar la columna. La rHuPH20 soluble se hace eluir a continuación utilizando un tampón con una concentración de sal superior, tal como por ejemplo, Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0. En algunos ejemplos, la absorbancia a A₂₈₀ se controla para determinar cuándo recoger el producto eluido, como cualquier absorbancia durante este proceso generalmente se indica la presencia de rHuPH20 soluble. Por lo tanto, en un ejemplo, el producto eluido se recoge cuando la lectura de inicio de la absorbancia es de 0,025. Típicamente, el producto eluido se filtra a través de un filtro apropiado, tal como un filtro de 0,22 µm, antes de ser almacenado, por ejemplo en una bolsa de almacenamiento estéril.

2. Columna de cuentas de agarosa entrecruzada sustituida con fenilo

Después de la purificación a través de una columna de cuentas de agarosa entrecruzada, la disolución de proteína se puede someter a cromatografía de interacción hidrófoba utilizando una columna de cuentas de agarosa entrecruzada sustituida con fenilo, tal como una columna de Phenyl Sepharose™, en donde la rHuPH20 soluble fluye a través de la columna mientras otras proteínas contaminantes son capturadas. La columna utilizada en los métodos de la presente memoria puede variar de tamaño, dependiendo del volumen y la cantidad de proteína que está siendo purificada a través de ella. Los tamaños ilustrativos incluyen columnas que tienen 29 cm de alto, 20 cm de diámetro con 9 L de resina para su uso en la purificación de la rHuPH20 soluble a partir de células desarrolladas en un biorreactor de cultivo de 100 L, columnas que tienen 29 cm de alto, 30 cm de diámetro con 19- 21 L de resina para su uso en la purificación de hialuronidasa a partir de células desarrolladas en un biorreactor de cultivo de 300 L, y columnas que tienen 35 cm de alto, 80 cm de diámetro con 176 L de resina para su uso en la purificación de la rHuPH20 soluble a partir de células desarrolladas en un biorreactor de cultivo de 2.500 L. Un experto en la técnica puede aumentar o disminuir a escala, según corresponda.

La columna de cuentas de agarosa entrecruzada sustituida con fenilo esterilizada, tal como una columna de Fenil Sepharose™, se puede equilibrar antes de la carga de la proteína con un tampón apropiado, tal como, por ejemplo, fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, CaCl₂ 0,01 mM, pH 7,0. El producto eluido de proteína de la purificación en columna de Q Sepharose también se complementa con sulfato de amonio, fosfato de potasio y CaCl₂. Estos pueden complementar la proteína a concentraciones finales de, por ejemplo, aproximadamente fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. Después de la carga de la proteína, se añaden también a la columna fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0 y se recoge el flujo directo filtrado, por ejemplo en una bolsa estéril.

3. Columna de Amino Fenil Boronato

Después de cromatografía de interacción hidrófoba, la proteína purificada en la columna se puede cargar en una columna de Amino Fenil Boronato para una purificación adicional. La cromatografía mediada por ligando de Amino Fenil Boronato difiere de muchos otros ligandos utilizados para la cromatografía de afinidad. Mientras que la mayoría de los ligandos se unen a un sitio de unión concreto en una proteína por una mezcla de interacciones no covalentes, el fenil boronato interactúa predominantemente mediante la formación de un enlace covalente temporal con grupos 1,2-cis-diol. El ligando boronato se unirá a cualquier molécula que contenga el grupo apropiado, incluyendo rHuPH20 soluble, que está altamente glicosilada.

La columna de Amino Fenil Boronato utilizada en los métodos de la presente memoria puede variar de tamaño, dependiendo del volumen y la cantidad de proteína que se purifica a través de ella. Los tamaños ilustrativos incluyen columnas que tienen 29 cm de alto, 20 cm de diámetro con 6,3 L de resina para uso en la purificación de hialuronidasa a partir de células desarrolladas en un biorreactor de cultivo de 100 L, columnas que tienen 29 cm de alto, 30 cm de diámetro con 19-21 L de resina para su uso en la purificación de hialuronidasa a partir de células cultivadas en un biorreactor de cultivo de 300 L, y, columnas que tienen 35 cm de alto, 80 cm de diámetro con 176 L de resina para su uso en la purificación de hialuronidasa a partir de células desarrolladas en un biorreactor de cultivo de 2.500 L. Un experto en la técnica puede aumentar o disminuir a escala, según corresponda. Los tampones

adecuados para el equilibrado de la columna de Amino Fenil Boronato incluyen, por ejemplo, tampones que contienen fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0.

Después de la carga de la columna de proteína purificada en columna de Fenil-Sepharose en la columna de Amino Fenil Boronato, la columna se lava con tampones de lavado adecuados. Los tampones de lavado ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0, y bicina 20 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 9,0 y bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9,0. En un ejemplo, la columna de Amino Fenil Boronato con la hialuronidasa unida se lava primero con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0, a continuación, con bicina 20 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 9,0 y finalmente con bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9,0. La hialuronidasa unida hacerse eluir a continuación, por ejemplo con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0. Un experto en la técnica puede modificar uno o más de los tampones para llevar la purificación de manera similar. Típicamente, la rHuPH20 soluble eluida también se filtra para eliminar cualquier contaminación microbiana o grandes agregados.

4. Columna de hidroxiapatita

Después de la cromatografía en columna de Fenil Boronato, la disolución de proteína que contiene la rHuPH20 soluble se puede cargar en una columna de Hidroxiapatita en una etapa de afinado final. La hidroxiapatita es una forma cristalina de fosfato de calcio con la fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Se puede utilizar como una etapa de afinado para separar proteínas que se co-purifican muy próximamente, que opera mediante un intercambio iónico de modo fijo debido a su inclusión de radicales cargados tanto positivamente como negativamente. Se encuentran disponibles en el mercado diversos medios cromatográficos de hidroxiapatita, y se puede utilizar cualquier forma disponible del material en los métodos de la presente memoria. Los ejemplos de hidroxiapatitas incluyen, pero no se limitan a, los que se aglomeran para formar partículas y los que sinterizan a altas temperaturas en una masa cerámica porosa estable. El tamaño de partícula puede variar, oscilando por ejemplo de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 1000 μm de diámetro. La porosidad también puede variar, por ejemplo de aproximadamente 100 Å a aproximadamente 10.000 Å.

La columna de hidroxiapatita utilizada en los métodos de la presente memoria puede variar de tamaño, dependiendo del volumen y la cantidad de proteína que se purifica a través de ella. Los tamaños ilustrativos incluyen columnas que tienen 20 cm de alto, 30 cm de diámetro con 13 L de resina para su uso en la purificación de hialuronidasa a partir de células desarrolladas en un biorreactor de cultivo de 300 L, y columnas que tienen 23 cm de alto, 80 cm de diámetro con 116 L resina para uso en la purificación de hialuronidasa a partir de células desarrolladas en un biorreactor de cultivo de 2.500 L. Un experto en la técnica puede aumentar o disminuir a escala, según corresponda.

Para los métodos descritos en la presente memoria, la columna de Hidroxiapatita se puede equilibrar con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 200 mM o fosfato de potasio 5 mM, NaCl 200 mM, CaCl_2 0,1 mM, pH 7,0. El equilibrado utilizando disoluciones tales como éstas hace que la columna sea compatible con la hialuronidasa parcialmente purificada, que a su vez se complementa con fosfato de potasio y CaCl_2 a concentraciones finales de 5 mM y 0,1 mM, respectivamente. Después de la carga de la proteína en la columna, la columna se puede lavar, por ejemplo, con fosfato de potasio 10 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 0,1 mM, pH 7,0, para eliminar cualquier proteína contaminante no unida. La rHuPH20 soluble unida puede hacerse eluir a continuación con un tampón de elución apropiado. Por ejemplo, la elución se puede llevar a cabo mediante la adición de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0. En algunos ejemplos, el producto eluido se filtra, por ejemplo a través de un filtro de 0,22 μm .

6. Eliminación de virus, concentración de proteína y cambio de tampón

La rHuPH20 soluble obtenida después de la cromatografía en columna se puede someter a etapas de post-purificación que sirven para formular la proteína en el tampón deseado a la concentración deseada. La proteína también puede ser sometida a una etapa de eliminación viral para asegurarse de que está libre de contaminación y es adecuada para su uso como agente terapéutico. La eliminación viral se efectúa típicamente con el uso de un filtro que sólo permite solamente que la proteína soluble pase a través, a la vez que atrapa cualquier tipo de virus (y otros contaminantes que tienen un tamaño igual o más grande que los virus). Tales filtros se encuentran disponibles en el mercado, y cualquiera puede ser utilizado en los métodos de la presente memoria. Los tamaños de poro de los filtros útiles para la eliminación viral incluyen, pero no se limitan a, 10 nm, 15 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 75 nm y 100 nm. En un ejemplo, la hialuronidasa purificada se filtra a través de un filtro que contiene poros 20 nm. La proteína se puede bombear al filtro, por ejemplo, por medio de una bomba peristáltica o mediante el uso de un tanque de presión.

Después de la eliminación viral, la rHuPH20 soluble se puede concentrar y someter a cambio de tampón. La rHuPH20 soluble se puede concentrar 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 11x, 12x, 13x o más. En algunos ejemplos, la proteína se concentra aproximadamente 6x. Esto puede dar como resultado, por ejemplo, una concentración de entre 0,1 mg/mL y 50 mg/mL. En algunos ejemplos, la hialuronidasa purificada se concentra hasta aproximadamente 1 mg/mL. En otros ejemplos, la hialuronidasa purificada se concentra hasta aproximadamente 10 mg/mL. Se puede

utilizar cualquier método de concentración de proteína conocido en la técnica. Los ejemplos de tales métodos incluyen la concentración utilizando filtración de flujo tangencial (TFF) con sistemas con filtros de corte de peso molecular (MWCO). Por ejemplo, la hialuronidasa purificada se puede hacer pasar a través de filtros de polietersulfona espirales con MWCO de 10 kDa para concentrar la proteína 10x. En otro ejemplo, la proteína se hace

pasar a través de una serie de cuatro filtros con MWCO de 30 kDa. Para la producción a gran escala de hialuronidasa, tal como, por ejemplo, cultivos de 100 L y 300 L, se emplean típicamente filtros con áreas de superficie de entre 0,5 y 5 metros cuadrados para este propósito. En algunos ejemplos, se utilizan filtros con un área de superficie de 1,2 metros cuadrados o 2,8 metros cuadrados.

El cambio de tampón se realiza generalmente después de la concentración de proteína para formular la proteína en el tampón deseado para su uso posterior, por ejemplo, como un agente terapéutico. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente un tampón apropiado. Los ejemplos de los tampones adecuados son los tampones salinos, incluyendo, pero no limitados a, Hepes 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7,0, y Histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0. La hialuronidasa purificada puede, en algunos ejemplos, hacerse pasar a través de otro filtro, tal como un filtro de capsula de 0,22 µm, antes de ser almacenada en un ambiente estéril.

I. Carga

Los métodos descritos en la presente memoria para la producción y purificación de rHuPH20 soluble también pueden incluir una etapa de carga, en la que la proteína purificada se carga asépticamente en recipientes más pequeños para su almacenamiento y uso a largo plazo. La rHuPH20 soluble se puede cargar en los recipientes en forma de una formulación líquida, o en forma de un polvo, por ejemplo después de la liofilización. Para la producción a gran escala, se utilizan típicamente sistemas de carga automatizados que incluyen, por ejemplo, bombas para transferir la proteína a los contenedores y estaciones de pesaje para medir el volumen de carga y están ampliamente disponibles. Sin embargo, también se puede llevar a cabo una carga manual o una combinación de automática y manual de los recipientes. Los recipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, viales de vidrio o plástico, envases blíster, frascos, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, jeringas, botellas o cualquier otro recipiente adecuado. También se pueden utilizar cierres o tapas adecuados para sellar el recipiente. El proceso de carga puede incluir primero hacer pasar la rHuPH20 soluble a través de un filtro antes de la carga para eliminar los contaminantes microbianos y los agregados más grandes o los sedimentos. Por ejemplo, la proteína se puede filtrar a través de un filtro de 0,22 µm antes de repartirlo en alícuotas en recipientes adecuados. Un experto en la técnica puede determinar el volumen de carga apropiado y puede incluir, por ejemplo, volúmenes que van desde 0,1 mL a 100 mL. En algunos ejemplos, los viales se llenan asépticamente con 1 mL, 5 mL o 20 mL de rHuPH20 soluble. Después de cubrir o cerrar los recipientes, los recipientes se pueden almacenar a una temperatura apropiada. En algunos ejemplos, los recipientes se congelan instantáneamente y se almacenan entre -15°C y -35°C. En otros ejemplos, los recipientes se refrigeran, por ejemplo entre 3°C y 15°C. Típicamente, el almacenamiento a largo plazo de los líquidos se produce a temperaturas más bajas para minimizar la degradación. La rHuPH20 soluble en forma de polvo se puede almacenar durante largos períodos a temperatura ambiente sin degradación significativa.

J. Seguimiento y análisis

Los métodos descritos en la presente memoria pueden ser supervisados en una o más etapas, midiendo una o más condiciones, parámetros o productos en cada punto. Esto puede asegurar que las condiciones óptimas se mantienen, y también puede ser utilizado para evaluar la eficacia y la productividad del proceso. Se puede producir el seguimiento, por ejemplo, una o más veces durante la fase de expansión celular, la fase de producción de proteínas (es decir, en el biorreactor), y/o la etapa de purificación de proteínas, así como en cualquier momento entre, antes o después, por ejemplo durante los procesos de concentración/cambio de tampón o de carga. El seguimiento puede incluir, pero no se limita a, la medición del pH, la temperatura, los volúmenes, la contaminación, la pureza, la concentración de proteínas, la actividad enzimática, la viabilidad celular y el número de células. Además del seguimiento de las condiciones, los parámetros o los productos en todo el proceso, también se puede evaluar la rHuPH20 soluble purificada producida como producto final y se puede caracterizar con respecto a, por ejemplo, la concentración de proteínas, la actividad enzimática, las impurezas, la contaminación, la osmolaridad, la degradación, las modificaciones post-traduccionales y el contenido de monosacáridos.

1. Seguimiento de las condiciones

Las condiciones durante una o más de las etapas de los métodos proporcionados en la presente memoria pueden ser supervisadas para asegurar que las condiciones óptimas se mantienen durante todo el proceso. Si el seguimiento demuestra que las condiciones no están dentro de un intervalo óptimo, las condiciones pueden ser alteradas. Las condiciones que pueden ser supervisadas varían para cada proceso. Por ejemplo, durante las fases de cultivo celular (es decir, la expansión celular y la producción de proteínas en el biorreactor), las condiciones que se deben controlar incluyen, pero no se limitan a, temperatura, pH de cultivo celular, nutrientes de cultivo celular (p. ej., glucosa), niveles de CO₂ y niveles de O₂. Típicamente, las condiciones se supervisan automáticamente utilizando sistemas integrados, por ejemplo en la incubador o el biorreactor.

Durante la etapa de purificación de proteínas, las condiciones que se pueden supervisar incluyen, pero no se limitan a, pH, conductividad y velocidad de flujo. Estas condiciones pueden ser supervisadas antes, durante y/o después de una o más etapas de cromatografía en columna. Por ejemplo, los tampones utilizados para equilibrar, lavar o hacer eluir la columna pueden ser supervisados. Esto se puede realizar antes de que se cargue el tampón o después de que el tampón haya corrido a través de la columna.

2. Seguimiento de la producción de rHuPH20 soluble

La producción de rHuPH20 soluble, y los parámetros asociados con la producción de rHuPH20 soluble, también pueden ser supervisados durante todo el proceso. Estos incluyen, pero no se limitan a, el número de células, la viabilidad celular, la contaminación, la concentración de proteínas, la actividad enzimática, la pureza, la osmolaridad, las modificaciones post-traduccionales. Se puede utilizar cualquier método para evaluar estos parámetros. Por ejemplo, la viabilidad de células de mamífero se puede evaluar tomando una pequeña alícuota del cultivo celular y tiñendo con azul de tripano, que penetra solamente en las membranas celulares dañadas, tiñendo de ese modo sólo las células muertas. Las células pueden ser visualizadas bajo el microscopio y contadas utilizando, por ejemplo, un hemocitómetro. Otros métodos incluyen la evaluación de la viabilidad celular mediante la medición de la actividad metabólica. Por ejemplo, se puede incubar una alícuota del cultivo celular con una sal de tetrazolio (p. ej., MTT, XTT o WST-1) que es escindida a un producto de formazán coloreado por las células metabólicamente activas.

La concentración de rHuPH20 soluble en una muestra concreta se puede evaluar por medio de métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitados a, análisis de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA); SDS-PAGE; métodos Bradford, Lowry, y/o BCA; Absorbancia UV, y otros métodos de marcaje de proteínas cuantificables, tales como, pero no limitados a, métodos inmunológicos, radiactivos y fluorescentes y métodos relacionados. Además, la presencia y el grado de degradación se pueden medir mediante técnicas convencionales, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), transferencia Western de muestras que contienen hialuronidasa sometida a electroforesis y cromatografía, tales como, por ejemplo, RP-HPLC. La pureza de una muestra que contiene hialuronidasa se puede evaluar, por ejemplo, mediante SDS-PAGE, RP-HPLC, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio aniónico e isoelectroenfoque (IEF). Las muestras que contienen rHuPH20 soluble, tales como las muestras que contienen hialuronidasa purificada, se pueden caracterizar adicionalmente mediante la evaluación del contenido de ácido siálico y de monosacáridos. Esto se puede lograr, por ejemplo, hidrolizando la muestra con ácido trifluoroacético al 40%, etiquetando fluorescentemente los monosacáridos liberados y separándolos utilizando RP-HPLC (véase el Ejemplo 10).

La rHuPH20 soluble producida y purificada utilizando los métodos proporcionados en la presente memoria también se puede evaluar para determinar la presencia de modificaciones posteriores a la traducción. Dichos análisis son conocidos en la técnica e incluyen análisis para medir la glicosilación, hidroxilación, y carboxilación. En un análisis ilustrativo para la glicosilación, el análisis de carbohidratos se puede realizar, por ejemplo, mediante análisis SDS PAGE de la rHuPH20 soluble expuesta a hidrazinolisis o tratamiento con endoglicosidasa. La hidrazinolisis libera los glicanos unidos a N y O de las glicoproteínas mediante incubación con hidracina anhidra, mientras que la liberación de endoglicosidasa implica PNGasa F, que libera la mayoría de los N-glicanos de las glicoproteínas. La hidrazinolisis o el tratamiento con endoglicosidasa de los polipéptidos de rHuPH20 solubles generan un extremo reductor que puede ser etiquetado con una marca de fluoróforo o cromóforo. Los polipéptidos de rHuPH20 solubles marcados pueden ser analizados por electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo (FACE). La etiqueta fluorescente para los glicanos también se puede utilizar para el análisis de monosacáridos, perfilado o huella dactilar de los patrones de glicosilación complejos por HPLC. Los métodos de HPLC ilustrativos incluyen cromatografía de interacción hidrófila, interacción electrónica, intercambio iónico, interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño. Las sondas de glicano ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, 3- (acetilamino)-6-aminoacridina (AA-Ac) y ácido 2-aminobenzoico (2-AA). Los radicales carbohidrato también se pueden detectar a través del uso de anticuerpos específicos que reconocen el polipéptido de hialuronidasa glicosilado.

Un análisis ilustrativo para medir (3-hidroxilación comprende el análisis de HPLC de fase inversa de polipéptidos de rHuPH20 solubles que han sido sometidos a hidrólisis alcalina (Przysiecki et al. (1987) PNAS 84: 7856-7860). La carboxilación y la γ -carboxilación de los polipéptidos de hialuronidasa pueden ser evaluadas utilizando el análisis de espectrometría de masas con desorción/ionización mediante láser asistida por matriz de tiempo de vuelo (MALDI-TOF), como se describe en la técnica (véase, p. ej., Harvey et al. J Biol Chem 278: 8363-8369, Maum et al. Prot Sci 14: 1171-1180).

La actividad enzimática de rHuPH20 soluble en una muestra se puede evaluar en cualquier punto durante los métodos descritos en la presente memoria. En un ejemplo, la actividad se mide utilizando un análisis de microturbidez (véase, p. ej., el Ejemplo 10). Éste se basa en la formación de un producto precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une a la albúmina sérica. La actividad se mide mediante la incubación de rHuPH20 soluble con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un período determinado de tiempo (p. ej., 10 minutos) y posterior precipitación del hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina de suero acidulada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un período de desarrollo adicional. La disminución

de la turbidez resultante de la actividad de la enzima sobre el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad enzimática de la rHuPH20 soluble. En otro ejemplo, la actividad enzimática se mide utilizando un análisis de microtitulación en el que el ácido hialurónico biotinilado residual se mide después de la incubación con la muestra que contiene rHuPH20 soluble (véase, p. ej., Frost and Stem (1997) Anal. Biochem. 251: 263-269, Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 20050260186). Los grupos carboxilo libres en los residuos de ácido glucurónico del ácido hialurónico están biotinilados, y el sustrato de ácido hialurónico biotinilado es acoplado covalentemente a una placa de microtitulación. Después de la incubación con la muestra que contiene rHuPH20 soluble, se detecta el sustrato de ácido hialurónico biotinilado residual utilizando una reacción de avidina-peroxidasa, y se compara con la obtenida después de la reacción con patrones de hialuronidasa de actividad conocida. Otros análisis para medir la actividad enzimática también se conocen en la técnica y se pueden utilizar en los métodos de la presente memoria (véanse p. ej., Delpech et al., (1995) Anal. Biochem. 229: 35-41; Takahashi et al., (2003) Anal. Biochem. 322: 257-263).

También se puede supervisar la presencia de cualquier tipo de contaminación. La contaminación puede incluir, pero no se limita a, contaminación microbiana (por ejemplo, virus, bacterias y micoplasmas), contaminación con productos microbianos (p. ej., endotoxina), u otras impurezas relacionadas con el proceso. Se puede utilizar cualquier método o análisis adecuado. Por ejemplo, se pueden cultivar virus y bacterias utilizando métodos bien conocidos en la técnica para determinar si están presentes o no en una muestra, y si es así, en qué cantidades. También se puede utilizar la microscopía para detectar la contaminación microbiana. Por ejemplo, se puede evaluar una muestra para determinar la presencia de virus o bacterias utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM). La detección de micoplasmas se puede efectuar utilizando, por ejemplo, técnicas bioquímicas o moleculares, incluyendo, pero no limitadas a, PCR para amplificar el ácido nucleico específico del micoplasma, pruebas bioquímicas para detectar enzimas de micoplasmas y fluorescencia basada en células para detectar antígenos o ácidos nucleicos de micoplasmas.

La presencia de productos microbianos, tales como endotoxinas bacterianas, también se puede supervisar. Un ejemplo de un análisis adecuado para detectar la presencia de endotoxinas es el análisis Producto lisado de Amebocitos de Limulus (LAL). Se pueden utilizar dos tipos de análisis LAL: coágulo de gel y fotométrico (cromogénico y turbimétrico). LAL es un extracto acuoso de las células sanguíneas (amebocitos) del cangrejo de herradura. La endotoxina desencadena una cascada de reacciones enzimáticas, que dan como resultado la enzima de coagulación activada. En la presencia de endotoxinas bacterianas, a una temperatura elevada, el reactivo LAL se coagulará después de la adición de reactivo. La formación del coágulo de gel es proporcional a la concentración de la endotoxina. En el análisis cinético, la proenzima de LAL se activa cuando entra en contacto con endotoxinas producidas por bacterias gram negativas. La velocidad de activación es directamente proporcional a la concentración de endotoxina presente. El nivel de activación se puede medir a través de una reacción del sustrato posterior que se mide espectrofotométricamente.

K. Ejemplos

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

Ejemplo 1

Generación de una línea celular que expresa rHuPH20 soluble

El plásmido HZ24 (mostrado en el SEQ ID NO: 50) se utilizó para transfectar ovario de hámster chino (células CHO) (véase, p. ej. las solicitudes relacionadas Núms. 10.795.095, 11/065.716 y 11/238.171). El vector plasmídico HZ24 para la expresión de rHuPH20 soluble contiene una cadena principal de vector pCI (Promega), ADN que codifica los aminoácidos 1-482 de la hialuronidasa PH20 humana (SEQ ID NO: 47), un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus ECMV (Clontech), y el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón. La cadena principal del vector pCI también incluye ADN que codifica el gen de resistencia a Beta-lactamasa (AmpR), un origen de replicación fl, una región potenciadora/promotora temprana inmediata de citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El ADN que codifica el constructo 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 del aminoácido 482 de la hialuronidasa PH20 humana mostrada en el SEC ID NO: 1), seguido de un sitio de restricción BamHI. El constructo pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24), por lo tanto, da como resultado una sola especie de ARNm dirigido por el promotor de CMV que codifica los aminoácidos 1 a 482 de PH20 humana (mostrada en el SEQ ID NO: 3) y los aminoácidos 1-186 de la dihidrofolato reductasa de ratón (mostrados en el SEQ ID NO: 51), separados por el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

Las células CHO DG44 no transfectadas crecen en medios CD-CHO Modificados de GIBCO para células DHFR (-),

con un suplemento de glutamina 4 mM y 18 ml/L de Plurionic F68/L (Gibco), se sembraron a $0,5 \times 10^6$ células/mL en un matraz oscilante en la preparación para la transfección. Las células se cultivaron a 37°C en CO₂ al 5% en un incubador humidificado, con oscilación a 120 rpm. Las células CHO DG44 en crecimiento exponencial no transfectadas se sometieron a ensayo para determinar la viabilidad antes de la transfección.

Sesenta millones de células viables del cultivo de células CHO DG44 no transfectadas se sedimentaron y se resuspendieron a una densidad de 2×10^7 células en 0,7 ml de 2x tampón de transfección (2x HeBS: Hepes 40 mM, pH 7,0, NaCl 274 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 1,4 mM, dextrosa 12 mM). A cada alícuota de células resuspendidas, se le añadieron 0,09 ml (250 µg) del plásmido HZ24 lineal (linealizado mediante digestión durante la noche con Cla I (New England Biolabs) se añadió, y las disoluciones de células/ADN se transfirieron a cubetas de electroporación BTX con ranura de 0,4 cm (Gentronics) a temperatura ambiente. Se realizó una electroporación de control negativo sin ADN plasmídico mezclado con las células. Las mezclas de células/plásmido se sometió a electroporación con una descarga de condensador de 330 V y 960µF o a 350 V y 960 µF.

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

Dos días después de la electroporación, se eliminaron 0,5 mL de medio de cultivo de tejido a cada pocillo y se sometieron a ensayo para determinar la presencia de actividad hialuronidasa, utilizando el análisis de microturbidez descrito en el Ejemplo 9.

Tabla 1: Actividad hialuronidasa Inicial de las células CHO DG44 transfectadas con HZ24 a las 40 horas 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

Las células de la Transfección 2 (350V) se recogieron de los pocillos de cultivo de tejidos, se contaron y se diluyeron a 1×10^4 a 2×10^4 células viables por ml. Se transfirió una alícuota de 0,1 mL de la suspensión celular a cada pocillo de cinco placas de cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron cien microlitros de medios CD-CHO (GIBCO) que contenían suplemento GlutaMAX™-I 4 mM (GIBCO™, Invitrogen Corporation) y sin suplementos de hipoxantina y timidina a los pocillos que contenían las células (volumen final de 0,2 mL).

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

Tabla 2. Actividad hialuronidasa de clones identificados

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

Se expandieron en cultivo seis clones HZ24 y se transfieren a matraces oscilantes en forma de suspensiones de células individuales. Los clones 3D3; 3E5, 2G8, 2D9, 1E11, y 4D10 se sembraron en placas para cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo redondo utilizando una estrategia de dilución bidimensional infinita en la que las células se diluyeron 1:2 en la parte inferior de la placa, y 1:3 a través de la placa, partiendo de 5000 células en el pocillo de la

parte superior izquierda. 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 en cultivo. Se prepararon diez placas por subclón, conteniendo 5 placas metotrexato 50 nM y 5 placas sin metotrexato.

- 5 El clon 3D3 produjo 24 subclones visuales (13 a partir del tratamiento sin metotrexato, y 11 a partir del tratamiento con metotrexato 50 nM. Se midió una actividad hialuronidasa significativa en los sobrenadantes de 8 de los 24 subclones (> 50 Unidades/mL), y estos 8 subclones se expandieron en matraces de cultivo de tejido T-25. Los clones aislados a partir del protocolo de tratamiento con metotrexato se expandieron en presencia de metotrexato 50 nM. El clon 3D35M se amplió en metotrexato 500 nM dando lugar a clones que producían más de 1.000
- 10 Unidades/mL en matraces oscilantes (clon 3D35M, o Gen1 3D35M). A continuación, se preparó un banco de células maestro (MCB) de las células 3D35M.

Ejemplo 2

- 15 Determinación del número de copias de la región de ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble en células 3D35M

El número de copias de la región de ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble en las células 3D35M se determinó mediante PCR cuantitativa. Se extrajo en ADN genómico total de las células 3D35M del MCB. Se prepararon seis diluciones independientes del ADN para el análisis por duplicado, cada una de las cuales contenía

20 aproximadamente 6,6 ng de ADN (equivalente a aproximadamente 100 células). Los controles negativos que no contenían molde también se prepararon, como lo fueron los controles positivos que contenían el plásmido y el ADN equivalente de 1.000 células CHO (6,6 ng). Las reacciones se ensamblaron de acuerdo con el Protocolo de Mezcla Maestra de PCR Universal TaqMan (Applied Biosystems) y ejecutaron por duplicado. Se generó una curva patrón utilizando ocho diluciones del plásmido HZ24, lo que representa un intervalo de aproximadamente 5×10^6 a 49

25 copias de ADN plasmídico. El patrón se diluyó en ADN genómico de control CHO (equivalente de 100 células). Las reacciones se ensamblaron de acuerdo con el Protocolo de Mezcla Maestra de PCR Universal TaqMan™ (Applied Biosystems) utilizando el cebador directo HZM3.P1 y el cebador inverso HZM3.P2 (mostrado en los SEQ ID NO: 52 y 53, respectivamente) y la sonda HZM3 (SEQ ID NO: 54), que contenía los colorantes fluorescentes 6FAM (6-carboxifluoresceína) y TAMRA (6-carboxitetrametil-rodamina). Las reacciones se realizaron por duplicado utilizando

30 las siguientes condiciones de ciclo: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. También se realizó una reacción de PCR cuantitativa convencional para analizar copias de GAPDH para cada muestra de ADN. Los datos fueron recogidos por medio de soporte lógico ABI Prism 7700™ Sequence Detection System versión 1.9 (Applied Biosystems).

- 35 El número de copias del gen diana por célula se calcularon como la razón de copias diana (rHuPH20 soluble) con respecto a las copias normalizadas (GAPDH) para las seis diluciones de ADN genómico 3D35M. La prueba estadística Dixon Q de valores atípicos se aplicó al conjunto de datos. Se encontró que el número de copias de la región sHuPH20 en las células 3D35M era de $317,87 \pm 11,64$.

40 Ejemplo 3

Producción y purificación de rHuPH20 soluble del Gen1

A. Procedimiento en biorreactor de 5 L

- 45 Un vial de 3D35M se descongeló y se expandió desde matraces T-25 a través de matraces de agitación de 1 L en CD CHO (Invitrogen, Carlsbad Calif.) con un suplemento de metotrexato 100 nM y 40 mL/L de GlutaMAX™-I (Invitrogen; solución de partida 200 mM). Las células se transfirieron de matraces de agitación a un biorreactor de 5 L (Braun) a una densidad de inoculación de 4×10^5 células viables por mL en medios 5 L. Los parámetros fueron
- 50 Punto de ajuste de temperatura a 37°C, pH 7,2 (Punto de ajuste inicial), con el punto de ajuste del oxígeno disuelto de 25% y una capa de aire de 0 a 100 cc/min. A las 168 horas, se añadieron 250 mL de Medio de Alimentación Núm. 1 (CD CHO con 50 g/L de glucosa). A las 216 horas, se añadieron 250 mL de Medio de Alimentación Núm. 2 (CD CHO con 50 g/L de glucosa y butirato de sodio 10 mM), y a las 264 horas se añadieron 250 mL de Medio de Alimentación Núm. 2. Este procedimiento dio como resultado una productividad final del 1600 Unidades por mL con
- 55 una densidad celular máxima de 6×10^6 células/mL. La adición de butirato de sodio fue para mejorar la producción de rHuPH20 soluble en las etapas finales de la producción.

Los medios condicionados del clon 3D35M se clarificó mediante filtración en profundidad y diafiltración de flujo tangencial en Hepes 10 mM de pH 7,0. A continuación la rHuPH20 soluble se purificó mediante cromatografía

60 secuencial en Q Sepharose (Pharmacia) de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba con Phenyl Sepharose (Pharmacia), cromatografía con Aminofenilboronato (ProMedics) y con hidroxipatita (Biorad, Richmond, CA).

La rHuPH20 soluble se unió a Q Sepharose y se eluyó en NiCl₂ 400 mM en el mismo tampón. El producto eluido se

diluyó con sulfato de amonio 2 M a una concentración final de sulfato de amonio 500 mM y se hizo pasar pasó a través de una columna de Phenyl Sepharose (baja sustitución), seguido de unión en las mismas condiciones a una resina de fenil boronato. La rHuPH20 soluble se eluyó de la resina de Phenyl Sepharose en Hepes de pH 6,9 después de lavar a pH 9,0 en bicina 50 mM sin sulfato de amonio. El producto eluido se cargó en una resina de hidroxipatita cerámica a pH 6,9 en fosfato de potasio 5 mM y CaCl_2 1 mM y se eluyó con fosfato de potasio 80 mM, de pH 7,4 con CaCl_2 0,1 mM.

La rHuPH20 soluble resultante poseía una actividad específica en exceso de 65.000 Unidades/mg de proteína por medio del análisis de microturbidez (véase el Ejemplo 9). La rHuPH20 soluble purificada eluyó como un solo pico a partir de 24 a 26 minutos de una columna de estireno-divinilbenceno Pharmacia 5RPC con un gradiente entre TFA al 0,1%/H₂O y TFA al 0,1%/acetónitrilo al 90%/H₂O al 10% y resolvió como una sola banda ancha de 61 kDa mediante electroforesis en SDS que se redujo a una banda afilada de 51 kDa tras el tratamiento con PNGASA-F. La secuenciación de aminoácidos N-terminal reveló que el péptido líder se había eliminado eficazmente.

B. Procedimiento de expansión del Cultivo Celular aguas arriba en cultivo celular en biorreactor de 100 L

Se utilizó un procedimiento de aumento a escala para purificar por separado rHuPH20 soluble a partir de cuatro viales diferentes de células 3D35M para producir 4 lotes separados de sHuPH20; HUA0406C, HUA0410C, HUA0415C y HUA0420C. Cada vial se expandió por separado y se cultivó por medio de un biorreactor de 125 L, a continuación se purificó utilizando cromatografía en columna. Se tomaron muestras durante todo el procedimiento para evaluar parámetros tales como el rendimiento de la enzima. La descripción del procedimiento proporciona a continuación especificaciones representativas para objetos tales como el biorreactor de partida y los volúmenes medios de alimentación, las densidades celulares de transferencia, y los volúmenes de lavado y elución. Los números exactos varían ligeramente con cada lote, y se detallan en las Tablas 3 a 10.

Se descongelaron cuatro viales de células 3D35M en un baño de agua a 37°C, se añadieron células CD CHO que contenían metotrexato 100 nM y 40 mL/L de GlutaMAX™-I y las células se centrifugaron. Las células se resuspendieron en un matraz de agitación de 125 mL con 20 mL de medio de nueva aportación y se colocaron en una incubadora a 37°C, 7% de CO₂. Las células se expandieron hasta 40 mL en el matraz oscilante de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanzó de 1,5 a 2,5 x 10⁶ 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, con CO₂ al 7%. Cuando la densidad celular alcanzó de 1,5 a 2,5 x 10⁶ células/mL, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 250 mL en 200 mL de volumen de cultivo, y el matraz se incubó a 37°C, con CO₂ al 7%. Cuando la densidad celular alcanzó de 1,5 a 2,5 x 10⁶ células/mL, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 1 L en 800 mL de volumen de cultivo y se incubaron a 37°C, CO₂ al 7%. Cuando la densidad celular alcanzó de 1,5 a 2,5 x 10⁶ células/mL, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 6 L en un volumen de cultivo de 5 L y se incubaron a 37°C, CO₂ al 7%. Cuando la densidad celular alcanzó de 1,5 a 2,5 x 10⁶ células/mL, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 36 L en un volumen de cultivo de 20 L y se incubaron a 37°C, CO₂ al 7%.

Un reactor de 125 L se esterilizó con vapor de agua a 121°C, se añadieron 1,36 atm y 65 litros de medio CD CHO. Antes de su uso, se verificó la contaminación del reactor. Cuando la densidad celular en los matraces de agitación de 36 L alcanzó 1,8 - 2,5 x 10⁶ células/mL, se transfirieron 20 L de cultivo celular desde los matraces de agitación de 36L al biorreactor de 125 L (Braun), dando como resultado un volumen final de 85 L y una densidad de siembra de aproximadamente 4 x 10⁵ células/mL. Los parámetros fueron punto de ajuste de temperatura, 37°C; pH: 7,2; Oxígeno disuelto: 25% ± 10%; Velocidad del impulsor 50 rpm; Presión del recipiente 0,290 atm; burbujeo de aire 1 L/min.; Superposición de Aire: 1 L/min. Se tomaron muestras del reactor diariamente para los recuentos de células, la verificación de pH, el análisis de los medios, la producción y la retención de proteínas. Se añadieron las alimentaciones de nutrientes durante la ronda. En el día 6, se añadieron 3,4 L de Medio de Alimentación Núm. 1 (CD CHO + 50 g/L de glucosa + 40 mL/L de GlutaMAX™-I), y la temperatura de cultivo se cambió a 36,5°C. El día 9, se añadieron 3,5 L de la Alimentación Núm. 2 (CD CHO + 50 g/L de glucosa + 40 mL/L de GlutaMAX™-I + 1,1 g/L de butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambió a 36°C. El día 11, se añadieron 3,7 L de la Alimentación Núm. 3 (CD CHO + 50 g/L de glucosa + 40 mL/L de GlutaMAX™-I + 1,1 g/L de butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambió a 35,5°C. El reactor fue cosechado a los 14 días o cuando la viabilidad de las células se redujo por debajo de 50%. El procedimiento dio como resultado la producción de rHuPH20 soluble con una actividad enzimática de 1600 unidades/mL con una densidad celular máxima de 8 millones de células/mL. En la cosecha, se tomaron muestras del cultivo para determinar los micoplasmas, la carga biológica, las endotoxinas, y los virus *in vitro* e *in vivo*, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) para las partículas virales, y la actividad enzimática.

La cosecha del cultivo celular del biorreactor 100 L se filtró a través de una serie de filtros de cápsula desechables que tienen un medio de polietersulfona (Sartorius): primero a través de una cápsula de profundidad de 8,0 µm, una cápsula de profundidad 0,65 µm, una cápsula de 0,22 µm, y finalmente a través de un filtro Sartopore de 2.000 cm² de 0,22 µm y dentro de una bolsa de almacenamiento estéril de 100 L. El cultivo se concentró 10x utilizando dos TFF con filtros de Polietersulfona Espirales con un MWCO de 30 kDa (Millipore), seguido de 6 x tampón de intercambio con Hepes 10 mM, Na₂SO₄ 25 mM, pH 7,0 en un filtro final de 0,22 µm en una bolsa de almacenamiento

estéril de 20 L. La Tabla 3 proporciona datos de seguimiento relacionados con el cultivo celular, la cosecha, la concentración y las etapas de cambio de tampón.

Tabla 3. Los datos de seguimiento para el cultivo celular, la cosecha, la concentración y las etapas de cambio de tampón.

Parámetro	HUA0406C	HUA04010C	HUA0415C	HUA0420C
Tiempo de deshielo para inocular 100 L biorreactor (días)	21	19	17	18
densidad de inoculación en 100 L ($\times 10^6$ células/mL)	0,45	0,33	0,44	0,46
Tiempo de duplicación del crecimiento logarítmico (hr)	29,8	27,3	29,2	23,5
Densidad celular máx. ($\times 10^6$ células/mL)	5,65	8,70	6,07	9,70
Viabilidad de la cosecha (%)	41	48	41	41
Título de cosecha (U/mL)	1964	1670	991	1319
Tiempo en el biorreactor de 100 L (días)	13	13	12	13
Volumen aclarado de la cosecha (mL)	81800	93300	91800	89100
Análisis enzimático aclarado de la cosecha (U/mL)	2385	1768	1039	1425
Análisis enzimático concentrado (U/mL)	22954	17091	8561	17785
Análisis enzimático de producto concentrado con cambio de tampón (U/mL)	15829	11649	9915	8679
Análisis enzimático de producto concentrado con cambio de tampón filtrado (U/mL)	21550	10882	9471	8527
Volumen de producto concentrado con intercambio de tampón (mL)	10699	13578	12727	20500
Razón de concentración de unidades enzimáticas/cosecha	0,87	0,96	1,32	1,4

Se preparó una columna de intercambio iónico AQ Sepharose (Pharmacia) (3 L de resina, Altura = 20 cm, diámetro = 14 cm). Se recogieron muestras de lavado para una determinación del pH, la conductividad y análisis de endotoxinas (LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na_2SO_4 20 mM, pH 7,5. La cosecha concentrada, sometida a diafiltración se cargó en la columna Q a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na_2SO_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 μm a una bolsa estéril.

A continuación se realizó una cromatografía de interacción hidrófoba con Phenyl-Sepharose (Pharmacia). Se preparó una columna de Phenyl-Sepharose (PS) (9,1 L de resina, Altura = 29 cm, diámetro = 20 cm). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, CaCl_2 0,1 mM, pH 7,0. Al producto eluido de proteína anterior se le añadió un suplemento de sulfato de amonio 2 M, fosfato de potasio 1 M y disoluciones de partida de CaCl_2 1 M a concentraciones finales 5 mM, 0,5 M y 0,1 mM, respectivamente. La proteína se cargó en la columna de PS a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se añadieron fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl_2 0,1 mM a pH 7,0 a 100 cm/h. El flujo directo se hizo pasar a través de un filtro final de 0,22 μm a una bolsa estéril.

La proteína purificada con PS se cargó en una columna de aminofenilboronato (ProMedics) (6,3 L de resina, Altura = 20 cm, Diámetro = 20 cm) que había sido equilibrada con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. La proteína se hizo pasar a través de la columna a una velocidad de flujo de 100 cm/hr, y la columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. A continuación, la columna se lavó con bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9,0 y la proteína se eluyó con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM a pH 6,9 a través de un filtro estéril y a una bolsa estéril de 20 L. El producto eluido se sometió a ensayo para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Una columna de hidroxiapatita (HAP) (BioRad) (resina de 1,6 L, Altura = 10 cm, Diámetro = 14 cm) se equilibró con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 0,1 mM a pH 7,0. Se recogieron muestras de lavado y se sometieron a ensayo para determinar el pH, la conductividad y la endotoxina (análisis LAL). A la proteína purificada con aminofenilboronato se le añadió un suplemento de fosfato de potasio y CaCl_2 para producir concentraciones finales de fosfato de potasio 5 mM y CaCl_2 0,1 mM y se cargó en la columna HAP en una velocidad de flujo de 100 cm/h. La

columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM a pH 7,0, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM, a continuación, fosfato de potasio 10 mM a pH 7,0, NaCl 100 mM. CaCl₂ 0,1 mM pH. La proteína se eluyó con fosfato de potasio 70 mM a pH 7,0 y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 5 L. El producto eluido se sometió a ensayo para determinar la carga biológica, concentración de proteína y la actividad enzimática.

A continuación, la proteína purificada con HAP se bombeó a través de un filtro de eliminación viral 20 nM a través de un tanque de presión. La proteína se añadió al tanque de presión y filtro DV20 (Pall Corporation), pasando a través de un filtro DV20 Ultipor con poros de 20 nm (Pall Corporation) en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. El producto filtrado se sometió a ensayo para determinar los perfiles de concentración de proteínas, actividad enzimática, oligosacáridos, monosacáridos y ácido siálico, y las impurezas relacionadas con el procedimiento. A continuación, la proteína en el producto filtrado se concentró a 1 mg/mL utilizando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) Sartocore Slice (Sartorius) con corte de peso molecular (MWCO) de 10 kD. El filtro se preparó en primer lugar mediante lavado con una disolución de Hepes/suero salino (Hepes 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7,0) y se tomaron muestras del permeato para determinar el pH y la conductividad. Después de la concentración, se tomaron muestras de la proteína concentrada y se sometió a ensayo para determinar la concentración de proteína y la actividad enzimática. Se realizó un intercambio de 6 x tampón sobre la proteína concentrada en el tampón final: Hepes 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7,0. La proteína concentrada se hizo pasar a través de un filtro de 0,22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. Se tomaron muestras de la proteína y se sometió a ensayo para determinar la concentración de proteínas, la actividad enzimática, los grupos sulfhidrilo libres, los perfiles de oligosacáridos y la osmolaridad.

Tablas 4 a 10 proporcionan datos de seguimiento relacionados con cada una de las etapas de purificación descritas anteriormente, para cada lote de células 3D35M.

Tabla 4. Datos de la columna Q Sepharose

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de carga (mL)	10647	13524	12852	20418
Razón de volumen de carga/volumen de resina	3,1	4,9	4,5	7,3
Volumen de la columna (mL)	2770	3840	2850	2880
Volumen del producto eluido (mL)	6108	5923	5759	6284
Conc de Proteína del producto eluido (mg/mL)	2,8	3,05	2,80	2,86
Análisis enzimático del producto eluido (U/mL)	24493	26683	18321	21052
Rendimiento de enzima (%)	65	107	87	76

Tabla 5. Datos de la columna con Phenyl Sepharose

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen antes de la adición de la disolución de partida (mL)	5670	5015	5694	6251
Volumen de carga (mL)	7599	6693	7631	8360
Volumen de la columna (mL)	9106	9420	9340	9420
Razón de volumen de carga/volumen de resina	0,8	0,71	0,82	0,89
Volumen del producto eluido (mL)	16144	18010	16960	7328
Cono de proteína o producto eluido (mg/mL)	0,4	0,33	0,33	0,38
Análisis enzimático del producto eluido (U/mL)	8806	6585	4472	7509
Rendimiento de Proteína (%)	41	40	36	37
Rendimientos de enzimas (%)	102	88	82	96

Tabla 6. Datos de la columna con aminofenilboronato

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de carga (mL)	16136	17958	16931	17884
Razón de volumen de carga/volumen de resina	2,99	3,15	3,08	2,98
Volumen de la columna (mL)	5400	5700	5500	5300

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de producto eluido (mL)	17595	22084	20686	19145
Conc. de proteína del producto eluido (mg/mL)	0,0	0,03	0,03	0,04
Conc. de proteína del producto eluido filtrado (mg/mL)	No sometido a ensayo	0,03	0,00	0,04
Análisis enzimático del producto eluido (U/mL)	4050	2410	1523	4721
Rendimiento de Proteína (%)	0	11	11	12
Rendimiento de enzima (%)	no determinado	41	40	69

Tabla 7. Datos de la columna de hidroxipatita

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen antes de la adición de la disolución de partida (mL)	16345	20799	20640	19103
Razón de volumen de carga/volumen de resina	10,95	13,58	14,19	12,81
Volumen de la columna (mL)	1500	1540	11462	1500
Volumen de carga (mL)	16429	20917	20746	19213
Volumen de producto eluido (mL)	4100	2415	1936	2419
Conc. de proteína del producto eluido (mg/mL)	No sometido a ensayo	0,24	0,17	0,23
Conc. de proteína del producto eluido filtrado (mg/mL)	N/A	N/A	0,17	N/A
Análisis enzimático del producto eluido (U/mL)	14051	29089	20424	29826
Rendimiento de Proteína (%)	No sometido a ensayo	93	53	73
Rendimiento de enzima (%)	87	118	140	104

Tabla 8. Datos de filtración DV20

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen inicial (mL)	4077	2233	1917	2419
Volumen de producto filtrado (mL)	4602	3334	2963	3504
Conc. de proteína del producto filtrado (mg/mL)	0,1	N/A	0,09	N/A
Conc. de proteína del producto eluido filtrado (mg/mL)	N/A	0,15	0,09	0,16
Rendimiento de Proteína (%)	No sometido a ensayo	93	82	101

5

Tabla 9. Datos de concentración final

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen Inicial (mL)	4575	3298	2963	3492
Volumen Concentrado (mL)	562	407	237	316
Conc. de proteína de producto concentrado (mg/mL)	0,9	1,24	1,16	1,73
Rendimiento de Proteína (%)	111	102	103	98

Tabla 10. Intercambio de tampón en datos de formulación final

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
-----------	----------	----------	----------	----------

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen inicial (mL)	562	407	237	316
Volumen final de producto concentrado con cambio de tampón (mL)	594	516	310	554
Conc. de proteína de producto concentrado (mg/mL)	1,00	0,97	0,98	1,00
Conc. de Proteína de producto concentrado filtrado (mg/mL)	0,95	0,92	0,95	1,02
Rendimiento de Proteína (%)	118	99	110	101

La proteína rHuPH20 soluble purificada y concentrada se cargó asepticamente en viales estériles con volúmenes de carga de 5 mL y 1 mL. La proteína se hizo pasar a través de un filtro de 0,22 μ m a una bomba controlada por el operador que se utilizó para cargar los viales utilizando una lectura gravimétrica. Los viales se cerraron con tapones y se aseguraron con tapas onduladas. Los viales cerrados fueron inspeccionados visualmente para detectar partículas extrañas y a continuación se etiquetaron. Después de etiquetado, los viales se congelaron instantáneamente por inmersión en nitrógeno líquido durante no más de 1 minuto y se almacenaron a $\leq 15^{\circ}\text{C}$ ($-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$). La producción y purificación de rHuPH20 soluble utilizando este método produjo aproximadamente 400-700 mg rHuPH20 soluble con una actividad específica de 96.000 unidades/mg a 144.000 unidades/mg.

Ejemplo 4

Producción de rHuPH20 soluble del Gen2

La línea celular 3D35M del Gen1 descrita anteriormente se adaptó a los niveles más altos de metotrexato para producir clones del Gen2. Las células 3D35M se sembraron a partir de cultivos que contenían metotrexato establecidos en medio CD CHO que contenía GlutaMAX™-I 8 mM y metotrexato 1,0 M. Las células se adaptaron a un nivel más alto de metotrexato cultivándolas y haciéndolas pasar 9 veces durante un período de 46 días en un incubador humidificado a 37°C, con CO₂ al 7%. La población amplificada de células se clonó por dilución limitante en placas de 96 pocillos de cultivo de tejidos que contenían medio con metotrexato 2,0 M. Después de aproximadamente 4 semanas, los clones se identificaron y se seleccionó el clon 3E10B para su expansión. Las células 3E10B se cultivaron en medio CD CHO que contenía GlutaMAX™-I 8 mM y metotrexato 2,0 M durante 20 pases, realizando ensayos para determinar la viabilidad celular mediante tinción con azul de tripano y contando con un hemocitómetro, y la actividad enzimática mediante el ensayo de microturbidez (descrito a continuación en el Ejemplo 9). Se creó un banco de células maestro (MCB) de la línea celular 3E10B y se congeló y se utilizó para estudios posteriores.

La amplificación de la línea celular continuó cultivando células 3E10B en medio CD CHO con GlutaMAX™-I 8 mM y metotrexato 4,0 M. Después del 12º pase, las células se congelaron en viales como banco de células de investigación (RCB). Un vial de la RCB se descongeló y se cultivó en medio que contenía metotrexato 8,0 M. Después de 5 días, la concentración de metotrexato en el medio se incrementó a 16,0 μ M después 20,0 M 18 días más tarde. Las células del 8º pase en medio que contenía metotrexato 20,0 mM se clonaron mediante dilución limitante en placas de 96 pocillos de cultivo de tejidos que contenían medio CD CHO que contenía GlutaMAX™-I 4 mM y metotrexato 20,0 M. Los clones 1B3, 2B2 y 5C1 se identificaron 5-6 semanas después. Las células del 9º pase de 3D35M también se clonaron mediante dilución limitante en placas de 96 pocillos de cultivo de tejidos con medio CD CHO que contenía GlutaMAX™-I 8 mM y metotrexato 20,0 M, y los clones se identificaron 1G11, 2E10 y 2G10.

Se sembraron cultivos celulares de cada uno de 1B3, 2B2, 5C1, 1G11, 2E10 y 2G10 a una densidad de 4×10^5 células/mL en un volumen de 50 mL en matraces de agitación de 250 mL. Los cultivos se dejaron crecer y declinar sin alimentaciones adicionales durante 10-14 días para determinar la tasa de crecimiento y la productividad de las células. Se tomaron muestras periódicamente y se analizaron para determinar la actividad hialuronidasa (Tablas 11 y 12).

Tabla 11. Actividad hialuronidasa de 1B3, 2B2 y 5C1 células

Horas después de la inoculación	Actividad Enzimática de rHuPH20 soluble en cultivo celular (unidades)		
	1B3	2B2	5C1
74			382
95		942	
101			582

Horas después de la inoculación	Actividad Enzimática de rHuPH20 soluble en cultivo celular (unidades)		
	1B3	2B2	5C1
142		2287	
144	955		
169	1200		
195			
238	1611		
242			2139
265		3070	
336	2252		

Tabla 12. Actividad hialuronidasa de células 1B3, 2B2 y 2E10

Horas después de la inoculación	Actividad Enzimática de rHuPH20 soluble en cultivo celular (unidades)		
	1B3	2B2	2E10
98	470		
123			1179
143		2228	
216			2814
290	2860		
291			2542
337		2992	

Se compararon cuatro líneas celulares (2B2, 2G10, 1G11 y 2E10) en un estudio en el que todas se sembraron a una densidad de 4×10^5 células/mL en un volumen de 50 mL en matraces oscilantes de 250 mL. Todas recibieron alimentaciones al 10% (v/v) el día 8 y alimentaciones al 5% con medios de alimentaciones que contenían medio CD CHO con un suplemento de 50 g/L de glucosa, 40 g/L de extracto de levadura y 1,1 g/L de butirato de sodio. Las células se recogieron el día 15. Se tomaron muestras periódicamente y se analizaron para determinar la actividad enzimática de rHuPH20 soluble (Tabla 13).

Tabla 13. Actividad hialuronidasa de células 2E10, 1G11, 2G10 y 2B2

Horas después de la inoculación	Actividad Enzimática de rHuPH20 soluble en cultivo celular (unidades)			
	2E10	1G11	2G10	2B2
122	991	87	1688	
124				878
194	2151	1387	2430	
196				2642
285	6231	3831	7952	
287				8822
364	5880	2955	11064	
366				15684

En condiciones tanto de lote como de alimentación por lotes, el cultivo de células 2B2 exhibió mayor actividad enzimática, aunque otras células (p. ej., Células 2G10) también mostraron una buena productividad enzimática de la línea celular 2B2, por lo tanto, se seleccionó para su expansión en medio que contenía metotrexato 20,0 μ M. Después de la 11^a pase, las 2B2 células se congelaron en viales como banco de células de investigación (RCB).

Ejemplo 5

Actividad enzimática de rHuPH20 soluble producida en células 3E10B y 2B2

Se sometió a ensayo rHuPH20 producida por las células 3E10B y 2B2 para determinar la actividad enzimática utilizando el ensayo de Microturbidez (Ejemplo 9). Los viales congelados de los bancos de células 3E10B y 2B2 se descongelaron y las células se cultivaron por separado para dos pases en medio de crecimiento (medio CD CHO con GlutaMAX™-I 8 mM y, o bien metotrexato 2,0 M para las células 3E10B, o bien metotrexato 20,0 μ M para las células 2B2) en un incubador humidificado a 37°C, con CO₂ al 6%. Las células se inocularon en 20 mL de medio de crecimiento en matraces Erlenmeyer de 125 mL (Corning) a 5×10^5 células/mL, y se cultivaron durante 8 días en un incubador humidificado a 37°C, con CO₂ al 6% en con una plataforma de agitación que giraba aproximadamente a 100 rpm. Los días 8 y 10, los cultivos recibieron 5% v/v de medio de alimentación que contenía medio CD CHO con un suplemento de 50 g/L de glucosa, 50 g/L de extracto de levadura, y 2,2 g/L (20 mM) de butirato de sodio para iniciar la fase de producción. Se tomaron muestras de los cultivos durante la fase de producción el día 8 día (190 horas), el día 10 (240 horas), el día 14 (332 horas), el día 15 (258 horas), el día 16 (382 horas) y el día 18 (427 horas), y se dejó que la viabilidad disminuyera a cero. Las muestras se analizaron a continuación para determinar la actividad hialuronidasa.

Tablas 14 y 15 exponen la viabilidad (densidad celular viable (VCD) y porcentaje de viabilidad) y la actividad (unidades/matraz) de las células 3E10B y 2B2 en cada punto temporal. La actividad enzimática de rHuPH20 soluble producida por las células 2B2 fue considerablemente mayor que la producida por las células 3E10B. Por ejemplo, el día 8, la actividad enzimática de rHuPH20 soluble producida por las células 2B2 fue 69% mayor que la producida por las células 3E10B (2484 unidades/mL en comparación con 1469 unidades/mL). Se observó una tendencia similar en toda la fase de producción. La viabilidad de los cultivos celulares se redujo a un ritmo similar. Cuando se calculó la tasa de producción de las células, se observó que las células 3E10B producían 0,23 picogramos de rHuPH20 soluble por célula por día (pcd) el día 8 y 0,38 pcd el día 15. En comparación, las 2B2 células produjeron 0,46 picogramos de rHuPH20 soluble el día 8 y 0,69 pcd el día 15, que era 100% y 82% mayor que la producción por 3E10B los días 8 y 15, respectivamente. A continuación, se preparó el banco de células maestro (MCB) de células 2B2 para estudios posteriores.

Tabla 14. Viabilidad y actividad del Clon 3E10B

Horas después de la inoculación	VCD	% de viabilidad	Actividad (unidades/mL)	Volumen (mL)
0	5	99	0	20
190	79,8	96	1469	20
240	61,6	76	2388	20
332	16,8	22	5396	20
358	16,4	17	5628	20
382	8,4	10	6772	20
427	0	0	6476	20
Actividad total (unidades) por matraz (U/mL veces volumen (mL)): 129520				

Tabla 15. Viabilidad y actividad del Clon 2B2

Horas después de la inoculación	VCD	% de Viabilidad	Actividad (Unidades/frasco)	Volumen (mL)
0	5	99	0	20
190	68	94	2484	20
240	77,6	89	3532	20
332	32	38	8196	20
358	5,8	17	9680	20
382	9,8	13	10788	20
427	0	0	10044	20
Actividad total (unidades) por matraz (U/mL veces volumen (mL)): 200880				

Ejemplo 6

Pruebas de estabilidad genética de las células 2B2

A. Determinación del número de copias de la región de ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble en células 2B2

El número de copias de la región de ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble en células 2B2 se determinó mediante PCR. ADN genómico total se extrajo de 2×10^7 células 2B2 del MCB utilizando un kit QIAamp DNeasy (Qiagen). El ADN genómico también se extrajo a partir de células CHO DG-44 como control negativo. La pureza del ADN extraído se verificó por electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría UV. Para generar fragmentos de ADN (en comparación con ADN de alto peso molecular), el ADN genómico se fragmentó mediante sonicación. Esto aseguró un pipeteo más preciso y accesibilidad al molde. Se prepararon seis diluciones independientes del ADN genómico (a diluciones de cantidades equivalentes a aproximadamente 1000 células/l) de células 2B2 y la DG-44 y se analizaron por duplicado en dos ensayos; un ensayo de la diana, que elegía como diana y amplificaba una secuencia específica para la región de ácido nucleico que codifica el ADN del plásmido rHuPH20 soluble, y un control endógeno, que elegía como diana y amplificaba una secuencia GAPDH. El control endógeno se usó como una normalización de los resultados. El ensayo diana incluyó una curva patrón generada a partir de una dilución en serie de cantidades conocidas del plásmido HZ24 mezclado en el ADN genómico de CHO DG-44. El control endógeno incluyó una curva patrón generada a partir de diluciones seriadas de ADN genómico de CHO DG-44 mezclado con ADN de plásmido HZ24. Se supone que el tamaño del genoma de mamíferos es de 3×10^9 pares de bases. Cada ensayo incluyó un control negativo (sin molde) y un control positivo (ADN del plásmido HZ24 para el ensayo diana y ADN de la célula anfitriona para el ensayo de normalización de control endógeno). Las reacciones se prepararon utilizando el cebador directo HZM3.P1 y el cebador inverso HZM3.P2 (mostrados en los SEQ ID NO: 52 y 53, respectivamente) y la sonda HZM3 (SEQ ID NO: 54), que contenía los colorantes fluorescentes 6FAM (6-carboxifluoresceína) y TAMRA (6-carboxitetrametil-rodamina). Las muestras se amplificaron utilizando Applied Biosystems Prism® 7900 Sequence Detection System con condiciones de ciclación convencionales (50°C durante 2 minutos, 95°C 10 min, 95°C 15 segundos y 60°C durante 1 min para 40 ciclos).

El número de copias del gen diana por célula se calculó como la razón de copias de la diana frente a las copias normalizadas (GAPDH) para las seis diluciones de ADN genómico 2B2. La prueba estadística Q de Dixon de valores atípicos se aplicó al conjunto de datos. Se encontró que el número de copias de la región de ácido nucleico que codificaba el plásmido rHuPH20 soluble en células 2B2 era de $206,61 \pm 8,35$.

B. Análisis de la secuencia de ARNm

Se determinó la secuencia del ARNm de PH20 generado a partir del plásmido HZ24 en células 2B2. El ARN se extrajo de 2×10^7 células 2B2 del MCB utilizando un kit RNeasy Mini (Qiagen). La muestra se trató con ADNasa I para eliminar la contaminación por ADN, y la pureza del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría UV. Se realizaron una reacción de transcripción inversa utilizando transcriptasa inversa Superscript™ (Invitrogen) y una reacción de control que carecía de la transcriptasa inversa utilizando el ARN extraído y oligo d(t) y cebadores al azar. Los productos de ADNc resultantes se utilizaron a continuación como molde en las amplificaciones mediante PCR. Se utilizaron dos conjuntos diferentes de pares de cebadores; AP01/AP03 y AP10/AP12. AP01/AP03 fue diseñado para amplificar la región de 1719 pares de bases, mientras que el par de cebadores AP10/AP12 fue diseñado para amplificar una región más grande (1811 pares de bases) para obtener la secuencia de la cadena inversa del extremo 3'. La Tabla 5 expone las secuencias de los cebadores. Cada reacción de PCR incluyó controles individuales de cebadores, un control negativo utilizando el control sin transcriptasa inversa (descrito anteriormente) como molde, y un control positivo con cebadores de control y molde de control. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se confirmó que eran del tamaño esperado, a continuación se purificaron para eliminar el exceso de cebadores y los dNTP mediante extracción en gel o EXOSAP (USB).

Los productos purificados se secuenciaron utilizando el BigDye® v1.1 Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) y los cebadores indicados en la Tabla 16. Se ensamblaron los datos de secuencia y la secuencia consenso obtenida (SEQ ID NO: 55) se comparó con la secuencia de referencia utilizando el soporte lógico Sequencher versión 4.1.2 (Gen Code Corporation). Se generaron un total de 1449 pares de bases de datos de secuencias. Se encontró que la secuencia era idéntica a la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 47), excepto para la diferencia de un par de bases en la posición 1131, que se observó que era una timidina (T) en lugar de la esperada citosina I. Esta es una mutación silenciosa, sin ningún efecto sobre la secuencia de aminoácidos.

Tabla 16. Cebadores para la amplificación y secuenciación mediante PCR

Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.
AP01	TTCTCTCCACAGGTGTC	56
AP02	AAGATTTCCTTACAAGAC	57
AP03	TGGCGAGAGGGGAAAGAC	58

Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.
AP04	CCATTATTTGAACACTC	59
AP06	CCGAACCTCGATTGCGCAC	60
AP07	AGCCATTCCCAAATTGTC	61
AP08	CTCCCAGTTCAATTACAG	62
AP09	CGTTAGCTATGGATCCTC	63
AP10	CGAGACAGAGAAGACTCTTGCG	64
AP12	CATTCAACAGACCTTGCATTCC	65

C. Análisis de transferencia Southern de células 2B2

Se realizó un análisis de Transferencia Southern en células 2B2 para obtener un mapa de estructura. El ADN total se extrajo de 1×10^7 células 2B2 y 1×10^7 células DG-44 de control utilizando un sistema Maxwell 16® (Promega). El ADN extraído y un constructo de control del plásmido HZ24 se evaluaron para determinar la pureza mediante electroforesis en gel de agarosa. El ADN de las células 2B2, las células DG-44 y el control de plásmido HZ24 se digirieron con Spe I, Xba I, y una doble digestión utilizando BamH I/Hind III. Se llevó a cabo otra digestión con BamH I/Hind sobre el control de plásmido HZ24 y las aproximadamente 1,4 kb se purificaron por extracción en gel y se marcaron radiactivamente con $\alpha^{32}\text{P}$ para generar una sonda marcada. Aproximadamente 10 µg de cada ADN digerido de 2B2 y ADN de DG-44, y 10 µg de ADN de DG-44 con 250 pg de ADN del plásmido HZ24, se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa. Se tomó una imagen en el gel después de la electroforesis, a continuación, se realizó una transferencia mediante transferencia Southern. La membrana de nailon se hibridó con la sonda marcada, después se lavó a temperatura ambiente durante 30 minutos y a continuación dos veces a 55°C durante 30 minutos. Una autorradiografía inicial se expuso durante 24 horas y se inspeccionó visualmente. Se determinó que se necesitaba una exposición más larga, por lo que una segunda autorradiografía se expuso durante 3 días para una exposición más oscura de las bandas hibridadas. Después de desarrollar la película, las bandas se dimensionaron mediante un Alphamager® (Alpha Innotech).

No se observaron bandas de hibridación para el producto digerido del control negativo DG-44 y se observaron bandas de hibridación individuales de los tamaños esperados en las digestiones de HZ24 (producto digerido con BamH I/Hind III: ~1,4 kb; producto digerido con Spe I: ~6,6 kb; producto digerido con XbaI: ~6,5 kb). Había una banda principal de hibridación de ~7,7 kb y se observaron cuatro bandas de hibridación menores (~13,9, ~6,6, ~5,7 y ~4,6 kb) utilizando ADN de 2B2 digerido con Spe I, se observaron una banda hibridación de principal de ~5,0 kb y dos bandas de hibridación menores (~13,9 y ~6,5 kb) utilizando ADN de 2B2 digerido con Xba I, y se observó una banda de hibridación única de ~1,4 kb utilizando ADN de 2B2 digerido con BamH I/Hind III. La presencia de la banda única de ~1,4 kb que hibridaba en BamH I/Hind III indicó que no había grandes inserciones o deleciones de secuencia dentro de la región sondeada. Los resultados de las digestiones individuales con Xba I y Spe I indican que hay múltiples sitios de integración del plásmido HZ24 en el genoma de las células 2B2.

Ejemplo 7

Producción de rHuPH20 soluble del Gen2 en un biorreactor de cultivo celular de 30 L

La rHuPH20 soluble se produjo y se purificó a partir de células 2B2 utilizando un biorreactor de 36 L (volumen de cultivo de 30 L) para determinar los procesos óptimos de aumento a escala hasta un biorreactor de 400 L (volumen de cultivo de 300 L). A continuación se detallan cuatro rondas del biorreactor 36 L por separado en las secciones A a D.

A. Producción y caracterización de los lotes 056-099 y 056-100 de rHuPH20 soluble

Un vial de 2B2 (1×10^7 células) se descongeló y se cultivaron a 37°C, CO₂ al 7% durante 8 pases en CD CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA), con un suplemento de metotrexato 20 µM y 40 mL/L de GlutaMAX™-I (Invitrogen), después de lo cual se amplió a 600 mL. Una semana más tarde, el cultivo se expandió hasta 5L en medio CD CHO con un suplemento de 40 mL/L de GlutaMAX™-I y sin metotrexato. A un biorreactor de 36 L que contenía 25 L medio CD CHO con un suplemento de 1 L de GlutaMAX™-I y 30 mL de sulfato gentamicina se le inoculó el cultivo de 5 L a una densidad de siembra inicial de $3,6 \times 10^5$ células/mL. El punto de fijación de la agitación del biorreactor se ajustó a 75 RPM; temperatura: 37°C; pH: 7,15; oxígeno disuelto: 30%. El biorreactor recibió una capa superior de aire filtrado y un burbujeo de aire/oxígeno/CO₂, controlado por un controlador Applikon.

El cultivo se alimentó 7 veces durante la ronda del biorreactor, en el plazo de 161, 184, 237, 256, 280, 304 y 328

horas después de la inoculación. Los medios de alimentación se filtraron en el biorreactor mediante una bomba peristáltica. El contenido de cada uno de los medios de alimentación y de los parámetros de alimentación del biorreactor en toda la ronda se proporcionan en las Tablas 17 y 18, respectivamente.

5 Tabla 17. Formulaciones de medios de alimentación

Componente	Alimentación Núm. 1	Alimentación Núm. 2	Alimentación Núm. 3	Alimentación Núm. 4	Alimentación Núm. 5	Alimentación Núm. 6	Alimentación Núm. 7
Medio líquido CD CHO	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L
GlutaMAX™-I	120 ml	80 ml	40 ml	40 ml	40 ml	30 ml	30 ml
Polvo CD CHO AGT	48,6 g	24,3 g	0	0	0	0	0
Yeastolate ultrafiltrado (200 g/L)	150 ml	300 ml	300 ml	150 ml	150 ml	0	0
Butirato de sodio	1,65 g	2,35 g	1,65 g	1,65 g	1,65 g	1,65 g	1,65 g

Tabla 18. Parámetros del Biorreactor

Horas	VCD	% de Viabilidad	pH	Unidades hialuronidasa	Vol (L)	Glucosa	Alimentación
0	3,6	97	7,28	0	31	6000	-
15	6,2	94	7,45	117	31	5780	-
44	11,3	97	7,15	290	31	5320	-
88	25,6	97	6,85	517	31	3430	-
115	42,6	95	6,75	1132	31	2920	-
139	56,4	96	6,74	1320	31	2220	-
161	71,9	97	6,82	2296	31	520	Alimentación Núm. 1
184	83,9	96	6,81	2748	32	610	Alimentación Núm. 2
213	82,7	96	6,87	3396	33	1190	-
237	80,5	89	7,21	4450	33	200	Alimentación Núm. 3
256	62,3	71	7,03	4750	34	240	Alimentación Núm. 4
280	52,7	66	7,01	5030	35	600	Alimentación Núm. 5
304	44,6	59	7,00	5970	36	560	Alimentación Núm. 6
328	33,3	47	7,00	7240	37	570	Alimentación Núm. 7
351	26,1	34	7,00	7360	37	250	-

10 El biorreactor se cosechó y se filtró a través de un sistema que contenía una serie de filtros de cápsula (Sartorius) con tamaños de poro de 8 µm, 0,65 µm, 0,45 µm y 0,22 µm, respectivamente. La cosecha se realizó utilizando una bomba peristáltica y se completó en aproximadamente 5 horas, obteniéndose aproximadamente 32 L de líquido de cultivo celular cosechado (HCCF). Al HCCF se le añadió un suplemento de EDTA y Tris a concentraciones finales de 10 mM de cada uno, pH 7,6. A continuación, el HCCF se almacenó a 2-8°C antes de ser concentrado y sometido a un cambio de tampón.

15 Para concentrar la proteína, un cartucho enrollado en espiral Millipore de 0,232 m² con un MWCO de 30 kDa se

equilibró primero en NaCl 150 mM, Hepes 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5. Quince L de HCCF se concentraron a 15 x 1 L. El producto concentrado se sometió a 10 x cambio de tampón con el tampón NaCl 150 mM, Hepes 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5 y el producto retenido se filtró a través de una cápsula de 0,2 µm en una bolsa de almacenamiento de 2 L, para un volumen final de 1,1 L. El producto retenido se almacenó a continuación a 2-8°C.

A continuación, la disolución de proteína concentrada y sometida a cambio de tampón se purificó mediante cromatografía de columna a través de una columna con Q Sepharose, una columna con Phenyl Sepharose, una columna con Aminofenilo y una columna con Hidroxiapatita. Las unidades de hialuronidasa en la disolución de proteína antes y después de cada etapa de cromatografía se evaluaron y se utilizaron para determinar el rendimiento para cada etapa.

En resumen, una columna de Q Sepharose con un lecho de columna 1,1 L se desinfectó con 2,8 L de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. A continuación, se limpió con 2,5 L de Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0, se enjuagó en 4,1 L de agua estéril para inyectables (SWFI) y se equilibró con 2,5 L de Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0. La proteína sometida a cambio de tampón (1L a 170.160 unidades/mL) se cargó en la columna. El flujo directo fue de 1,0 L a 479 unidades/mL, lo que indica que casi todo el producto se unía a la resina. La columna se lavó con 4 L de Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0, y 4,2 L de Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. El producto se eluyó en 3,0 L de Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0, obteniéndose 3 L a 49.940 unidades/mL, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Una columna de Phenyl Sepharose con un lecho de columna de 2,1 L se desinfectó con 4,8 L de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. A continuación, se enjuagó con 5,0 L de SWFI y se limpió con 4,6 L de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y se enjuagó de nuevo con 6,8 L de SWFI. La columna se equilibró en 5,5 L de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. Al producto eluido de la columna de Q Sepharose, se le añadieron 10,3 mL de fosfato de potasio monobásico 1 M, 10,3 mL de fosfato de potasio dibásico 1 M y 0,42 mL de CaCl₂ 1 mM. A continuación, esto se cargó en la columna y se recogieron el flujo directo y el agente de captura (1 L de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 mM), obteniéndose 7,4 L a 20.030 unidades/mL. El producto se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Una columna de Amino Fenil boronato con un lecho de columna de 1,8 L se desinfectó con 4,5 L de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. A continuación, se enjuagó con 3,9 L de SWFI, se limpió con 4,2 L de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y se enjuagó de nuevo con 4,0 L de SWFI. La columna se equilibró con 7,5 L de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. La sustancia del flujo directo de la columna de Phenyl Sepharose se cargó en la columna de Amino Fenil Boronato después de haber añadido un suplemento de sulfato de amonio a una concentración final de 0,5 M. La columna se lavó con 6,5 L de fosfato de potasio 5 mM a pH 7,0, y a continuación con 7,8 L de bicina 20 mM, pH 9,0 después con 9,0 L de bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9,0. El producto se eluyó con 4,8 L de Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0, dando como resultado 4,8 L a 22.940 unidades/mL, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Una columna de hidroxiapatita con un lecho de columna de 1,8 L se desinfectó con 2,7 L de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. La columna se neutralizó con 2,1 L de fosfato de potasio 200 mM, pH 7,0 y a continuación se equilibró en 2,2 L de fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM. Al producto eluido de la columna de Amino Fenil Boronato, se le añadieron 9,1 mL de fosfato de potasio monobásico 1 M, 9,1 mL de fosfato de potasio dibásico 1 M y 0,452 mL de CaCl₂ 1 mM. A continuación, esto se cargó en la columna y el flujo directo fue de 4,5 L a 10 unidades/mL, indicando una buena unión de la HuPH20 soluble. La columna se lavó con 3,3 L de fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0, y a continuación con 2,9 L de fosfato de potasio 10 mM, NaCl 100 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. El producto se eluyó con 1,0 L de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0, dando como resultado 1 L a 130.000 unidades/mL, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

El producto purificado se concentró utilizando un cartucho Millipore de 0,232 m² con MWCO de 30 kDa que había sido equilibrado en NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0. El producto se concentró hasta 74 mL, y se sometió a cambio de tampón 10 x con el tampón NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0 a continuación se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. Se realizaron las mediciones de A₂₈₀ e indicaron que la concentración de proteína era de 11,3 mg/mL. Se añadieron 9,6 mL adicionales de tampón NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0 para llevar la concentración de proteína a 10 mg/mL (Lot 056-99). Diez mL de la disolución de proteína de 10 mg/mL se diluyeron en el tampón para proporcionar una disolución de 1 mg/mL (Lot 056-100. Ambas disoluciones se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.

El producto formulado se cargó en viales de vidrio de 10 mL y de 1 mL, cuyo total combinado produjo 761 mg de rHuPH20 soluble. Los viales se congelaron a -80°C, a continuación se transfirieron a -20°C para el almacenamiento. Los lotes 056-99 y 056-100 fueron caracterizados a continuación con respecto a la actividad y la pureza. Los lotes 056-99 y 056-100 exhibieron una actividad enzimática de 1.350.786 unidades/mL y 129.982 unidades/mL y una actividad específica de 130.00 unidades/mg y 124.00 unidades/mg (calculada a partir de la actividad enzimática y la concentración de proteínas). La pureza de las muestras de rHuPH20 soluble se determinó mediante SDS-PAGE,

isoelectroenfoco (IEF), cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (RP-HPLC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y cromatografía de intercambio aniónico. Según se determinó mediante RP-HPLC, se observó que la pureza de los dos Lotes era de aproximadamente 95%. Según se determinó mediante SEC, se observó que la pureza de los dos Lotes era de aproximadamente 99%. Se mostró que los niveles de endotoxina eran $\leq 0,5$ UE/mL y 0,1 UE/mL para los lotes 056-99 y 056-100, respectivamente. Se midió que la osmolaridad era de 271 mOsm/kg y 291 mOsm/kg para los lotes 056-99 y 056-100, respectivamente.

B. Modificaciones para aumentar la producción de rHuPH20 soluble: lote de biorreactor 2B2-20K.5

Se realizaron modificaciones al método descrito anteriormente en la sección A. Estas modificaciones estaban destinadas a aumentar el rendimiento de producto y mejorar la eficacia y la escalabilidad de fabricación. Las etapas de fabricación descritas a continuación incluyen la descongelación de células congeladas del banco de células de investigación, la expansión de las células en cultivo continuo, el funcionamiento del sistema del biorreactor de alimentación por lotes, la cosecha y el aclarado del líquido de cultivo celular, y la concentración y el cambio de tampón del producto a granel. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, la adición de insulina humana recombinante al medio del biorreactor para aumentar la tasa de crecimiento y los niveles de expresión de producto de las células. Asimismo, el número de alimentaciones se redujo de 7 a 5. Se realizaron también otras modificaciones de los métodos descritos anteriormente.

Un vial de 2B2 (1×10^7 células) se descongeló y se cultivó en CD CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) con un suplemento de metotrexato 20 μ M y 40 mL/L de GlutaMAX™-I (Invitrogen), después de lo cual se expandió hasta 100 mL, 450 mL y a continuación a 4,5 L en medio CD CHO con un suplemento de 40 mL/L de GlutaMAX™-I y sin metotrexato. A un biorreactor de 36 L que contenía 20 L de medio CD CHO con un suplemento de 800 L de GlutaMAX™-I, 30 mL de sulfato de gentamicina y 100 mg de insulina humana recombinante se le inocularon 3,6 L de cultivo 2B2 a una densidad de siembra inicial de $4,3 \times 10^5$ células/mL. El punto de fijación de la agitación del biorreactor se ajustó a 80 rpm; Temperatura: 37°C; pH: 7,15; oxígeno disuelto: 25%. El biorreactor recibió superposición de aire filtrado y un burbujeo de aire/oxígeno/CO₂, controlado por un controlador Applikon.

El cultivo se alimentó 5 veces durante la ronda del biorreactor de 13 días, en el plazo de 117, 143, 196, 235 y 283 horas después de la inoculación. Los medios de alimentación se filtraron en el biorreactor mediante una bomba peristáltica. El contenido de cada uno de los medios de alimentación y de los parámetros de alimentación de biorreactor en toda la ronda se proporcionan en las Tablas 19 y 20, respectivamente.

Tabla 19. Formulaciones de Medios de Alimentación

Componente	Medio inicial del biorreactor	Alimentación Núm. 1	Alimentación Núm. 2	Alimentación Núm. 3	Alimentación Núm. 4	Alimentación Núm. 5
Medio líquido CD CHO	12 L	0	0	0	0	0
GlutaMAX™-I	800 ml	120 ml	80 ml	40 ml	40 ml	40 ml
Polvo CD CHO AGT	194,4 g	97,2 g	48,6 g	24,3 g	24,3 g	24,3 g
SWFI	8 L	800 ml	900 ml	700 ml	700 ml	700 ml
Yeastolate ultrafiltrado (200 g/L)	0	0	0	200 ml	200 ml	200 ml
Dextrosa	0	30 g	60 g	40 g	40 g	40 g
Gentamicina	30 ml	0	0	0	0	0
rHuInsulina	25 ml	0	0	0	0	0
Butirato de sodio	0	0	0	2,2 g	1,1 g	1,1 g

Tabla 20. Parámetros del biorreactor

Horas	VCD	% de Viabilidad	pH	Unidades de hialuronidasa	Vol (L)	Glucosa	Alimentación
0	4,3	98	7,28	0	25	8820	-
55	17,1	99	7,07	580	25	4950	-
94	40,6	99	6,77	1059	25	3800	-
117	57,5	99	6,76	1720	25	2310	Alimentación Núm. 1

Horas	VCD	% de Viabilidad	pH	Unidades de hialuronidasa	Vol (L)	Glucosa	Alimentación
143	88,8	99	6,75	3168	26	2770	Alimentación Núm. 2
167	93,7	99	6,80	6982	27	3830	-
196	96,2	97	6,89	4560	27	2060	Alimentación Núm. 3
222	78,9	85	6,83	4920	128	2720	-
235	80	76	6,81	5670	28	1870	Alimentación Núm. 4
260	54,3	65	6,76	5865	29	2930	-
283	38,7	44	6,73	6540	29	1880	Alimentación Núm. 5
308	37,3	39	6,78	8460	29	2400	-
313	33,7	34	6,78	8190	29	2300	-

El biorreactor se cosechó y se filtró a través de un sistema que contenía una serie de filtros Millipore Pod D0HC (0,5 m²) y apilamientos A1HC, que contenían capas de tierra de diatomeas de tamaño de poro graduado, seguido de filtración final a través de filtro de cápsula (Sartorius Sartobran 300) en una bolsa de almacenamiento de 50 L. La cosecha se realizó utilizando una bomba peristáltica y se completó en aproximadamente 2 horas, obteniéndose aproximadamente 30 L de líquido de cultivo celular cosechado (HCCF). A 28 L de HCCF se les añadió un suplemento de EDTA y Tris a concentraciones finales de 10 mM cada uno, y un pH 7,5. Los 2 L de HCCF restantes se dejaron sin Tris/EDTA, para evaluar el efecto de la adición de Tris/EDTA en la etapa de concentración/cambio de tampón. A continuación, el HCCF se almacenó a 2-8°C antes de ser concentrado y se sometió a un cambio de tampón.

Para concentrar la proteína, se equilibró primero un casete de filtración Millipore Pellicon 2 Biomax A de 0,1 m² con un MWCO de 30 kDa en Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. Se concentraron 2L de HCCF con y sin Tris/EDTA, 10x y se sometieron a 10x cambio de tampón con el tampón Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. Los niveles de proteína se midieron mediante absorbancia a A₂₆₀. El HCCF restante (aproximadamente 26,5 L) se concentró y se sometió a cambio de tampón. Dos casetes de filtración Millipore Pellicon 2 Biomax A de 0,1 m² con un MWCO de 30 kDa se ensamblaron en el sistema TFF y se equilibraron en Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. El HCCF se concentró aproximadamente 10x hasta 2,5 L, y se sometió a cambio de tampón con 10x Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. El producto retenido se filtró a través de un filtro de vacío de 0,2 µm en bolsas de almacenamiento de 1 L y 500 mL, para un volumen final de 2,6 L. A continuación, el producto retenido se almacenó a 2-8°C. Las muestras tomadas durante el proceso de concentración y el cambio de tampón se analizaron mediante RP-HPLC para determinar el efecto de la adición de Tris/EDTA a la muestra. Se observó que la adición de Tris/EDTA facilitó una etapa de procesamiento más eficiente.

C. Producción y caracterización de los Lotes 056-122 y 056-123 de rHuPH20 soluble (lote 2B2-20K.6 del biorreactor).

Las modificaciones descritas anteriormente en la sección C se incorporaron a las etapas de fabricación para producir y purificar dos lotes de rHuPH20 soluble; Lotes 056-122 y 056-123. El procedimiento descrito a continuación incluye la descongelación de las células congeladas del banco de células de investigación HZ24-2B2; la expansión de las células en cultivo continuo; la operación del Sistema del biorreactor de alimentación por lotes de 36 L a escala de 30L; la eliminación de células, el aclarado, y el cambio de tampón del producto a granel; cromatografía en columna de 4 etapas; y las operaciones de formulación, carga, y terminación.

Un vial de 2B2 (1 x 10⁷ células) se descongeló y se cultivó a 37°C, CO₂ al 7% en CD CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA), con un suplemento de metotrexato 20 µM y 40 mL/L de GlutaMAX™-I (Invitrogen), después de lo cual se expandió hasta 400 mL, a continuación 4,4 L en medio CD CHO con un suplemento de 40 mL/L de GlutaMAX™-I y sin metotrexato. A un biorreactor de 36 L (Bellco serie 1964) que contenía 20 L de medio CD CHO con un suplemento de 800 L de GlutaMAX™-I, 100 mg de insulina humana recombinante y 30 mL de sulfato de gentamicina se le inoculó el cultivo de 4 L a una densidad de siembra inicial de 4,9 x 10⁵ células/mL. El punto de fijación de la agitación del biorreactor se ajustó a 80 rpm; Temperatura: 37°C; pH: 7,15; oxígeno disuelto: 25%. El biorreactor recibió superposición de aire filtrado y un burbujeo de aire/oxígeno/CO₂, controlado por un controlador Applikon ADI 1030.

El cultivo se alimentó 4 veces durante la ronda del biorreactor de 13 días, en el plazo de 127, 163, 208 y horas

después de la inoculación. Los medios de alimentación se filtraron en el biorreactor mediante una bomba peristáltica. El punto de ajuste de la temperatura del biorreactor se redujo de 37°C a 36,5°C el día 7, a 36,0°C el día 9 y finalmente a 35,5°C el día 11. El contenido de cada uno de los medios de alimentación y de los parámetros de alimentación del biorreactor en toda la ronda se proporcionan en las Tablas 21 y 22, respectivamente.

5

Tabla 21. Formulaciones de los medios de alimentación

Componente	Medio inicial del biorreactor	Alimentación Núm. 1	Alimentación Núm. 2	Alimentación Núm. 3	Alimentación Núm. 4
Polvo CD CHO AGT (Invitrogen; Núm. de parte: 10743-029; Núm. de lote 1366333)	0	97,2 g	48,6 g	24,3 g	24,3 g
Polvo de CD CHO AGT (Invitrogen; Núm. de parte: 10743-029; Núm. de lote 1320613)	267,3 g	0	0	0	0
Polvo de CD CHO AGT (Invitrogen; Núm. de parte: 12490-017; Núm. de lote 1300803)	218,7 g	0	0	0	0
SWFI	20 L	700 ml	700 ml	600 ml	600 ml
GlutaMAX™-I (Invitrogen)	800 ml	160 ml	80 ml	60 ml	40 ml
Yeastolate ultrafiltrado (Invitrogen; 200 g/L)	0	100 ml	200 ml	300 ml	300 ml
Dextrosa (D-glucosa)	0	40 g	40 g	60 g	40 g
Gentamicina	30 ml	0	0	0	0
rHuInsulina	100 mg	40 mg	0	0	0
Butirato de sodio	0	0	1,1 g	2,2 g	1,1 g

Tabla 22. Parámetros del Biorreactor

Horas	Densidad de células viables (x 10 ⁵ células/mL)	% de Viabilidad	pH	Unidades de hialuronidasa	Vol (L)	Glucosa	Alimentación
0	4,9	92	7,26	79	25	7780	-
24	9,2	95	7,21	141	25	6060	-
48	17,3	97	7,13	243	25	5280	-
72	33	99	6,82	407	25	3910	-
98	49,3	99	6,77	658	25	3200	-
127	67	98	6,83	1296	25	1610	Alimentación Núm. 1
144	88,1	98	6,78	1886	26	2860	-
163	92,4	99	6,89	2439	26	1680	Alimentación Núm. 2
192	91	97	6,85	3140	27	1480	-
208	92,7	96	6,91	3188	27	230	Alimentación Núm. 3
235	70	76	6,86	5118	28	1940	-
261	63	61	6,84	5862	28	280	Alimentación Núm. 4
291	36,4	45	6,76	7072	29	1570	-
307	29,3	32	6,81	8160	29	1250	Cosecha

10 El biorreactor se cosechó y se filtró a través de un sistema que contenía una serie de filtros Millipore Pod D0HC (0,5 m²) y apilamientos A1HC (0,1 m²), que contenían capas de tierra de diatomeas de tamaño de poro graduado, seguido de filtración final a través de filtro de cápsula (Sartorius Sartobran 300) en bolsas de almacenamiento de 20 L. La cosecha se realizó utilizando una bomba peristáltica y se completó en aproximadamente 1 hora, obteniéndose

aproximadamente 34 L de líquido de cultivo celular cosechado (HCCF). Esto incluye el volumen del biorreactor de 29 L más aproximadamente 5 L del agente de captura PBS. Al HCCF se le añadieron suplementos de EDTA y Tris a concentraciones finales de 10 mM cada uno, y un pH final de 7,5. A continuación, el HCCF se almacenó a 2-8°C antes de ser concentrado y se sometió a un cambio de tampón.

Para concentrar la proteína, se equilibró en primer lugar un casete de flujo transversal Sartorius Sartocon 2 de 0,65 m² con un MWCO de 30 kDa en Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. Se concentraron 34 L de HCCF 10x hasta 3 L y se sometieron a cambio de tampón 10x con el tampón Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. El producto retenido se filtró a través de un filtro de cápsula de 0,2 micras en bolsas de almacenamiento de 5 L para un volumen final de 3,0 L. A continuación, el producto retenido se almacenó a 2-8°C.

La disolución de proteína concentrada y sometida a cambio de tampón se purificó a continuación utilizando cromatografía en columna a través de una columna de Q Sepharose, una columna de Phenyl Sepharose, una columna de Amino Fenilo y una columna de Hidroxiapatita. Las unidades de hialuronidasa en la disolución de proteína antes y después de cada etapa cromatográfica se evaluaron y se utilizaron para determinar el rendimiento de cada etapa.

En resumen, una columna de Q Sepharose con un lecho de columna 1,1 L, un diámetro de 7 cm, una altura de 28 cm se desinfectó con 2,1 L de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. A continuación, se limpió con 2,5 L de Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0, se enjuagó en 4,5 L de agua estéril para inyectables (SWFI) y se equilibró con 4,2 L de Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0. La proteína sometida a cambio de tampón (3L a 94.960 unidades/mL) se cargó en la columna. El flujo directo fue de 5830 mL a 75 unidades/mL, lo que indica que casi todo el producto (99,8%) se unió a la resina. La columna se lavó con 4,2 L de Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0, y 4,6 L de Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. El producto se eluyó a continuación en 2,9 L de Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0, obteniéndose 2880 mL a 96.080 unidades/mL, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Una columna de Phenyl Sepharose con un lecho de columna de 2,2 L (altura 28 cm, diámetro 10 cm) se desinfectó con 5,0 L de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. A continuación, se enjuagó con 4,5 L de SWFI y se limpió con 4,6 L de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y se enjuagó de nuevo con 6,8 L de SWFI. La columna se equilibró en 4,6 L de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. Al producto eluido de la columna de Q Sepharose, se le añadieron 9,6 mL de fosfato de potasio monobásico 1 M, 9,6 mL de fosfato de potasio dibásico 1 M y 0,4 mL de CaCl₂ 1 mM. A continuación, esto se cargó en la columna y se recogieron el flujo directo y el agente de captura (fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 mM), obteniéndose 6905 mL a 36.280 unidades/mL. El producto se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Una columna de Amino Fenil boronato con un lecho de columna de 2,2 L (altura 29 cm, diámetro 10 cm) se desinfectó con 3,8 L de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. A continuación, se enjuagó con 5,0 L de SWFI, se limpió con 5,0 L de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y se enjuagó de nuevo con 5,0 L de SWFI. La columna se equilibró a continuación con 5,0 L de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. La sustancia del flujo directo de la columna de Phenyl Sepharose se cargó en la columna de Amino Fenil Boronato. La columna se lavó con 9,9 L de fosfato de potasio 5 mM a pH 7,0, y a continuación con 9,7 L de bicina 20 mM, pH 9,0 después con 9,9 L de bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9,0. El producto se eluyó con 5,0 L de Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0, dando como resultado 4460 mL a 48.400 unidades/mL, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Una columna de Hidroxiapatita con un lecho de columna de 1,1 L (diámetro 7 cm, altura 28 cm) se desinfectó con 2,7 L de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. La columna se neutralizó con 2,1 L de fosfato de potasio 200 mM, pH 7,0 a continuación se equilibró en 2,2 L de fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM. Al producto eluido de la columna de Amino Fenil Boronato, se le añadieron 11,2 mL de fosfato de potasio monobásico 1 M, 11,2 mL de fosfato de potasio dibásico 1 M y 0,45 mL de CaCl₂ 1 mM. A continuación, esto se cargó en la columna y después se lavó con 3,3 L de fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0, a continuación con 3,5 L de fosfato de potasio 10 mM, NaCl 100 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. El producto se eluyó con 1,4 L de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0, dando como resultado 1260 mL a 152.560 unidades/mL, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

El producto purificado se concentró utilizando un cartucho Millipore de 46,46 cm² con MWCO de 30 kDa que había sido equilibrado en NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0. El producto se concentró de 1250 mL hasta 1,04 mg/mL a 120 mL y se sometió a cambio de tampón 10 x con el tampón NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0, a continuación se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. Se realizaron las mediciones de A₂₈₀ e indicaron que la concentración de rHuPH20 soluble de los 118 ml restantes era de 11,45 mg/mL. Se añadieron 17 mL adicionales de tampón NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0 para llevar la concentración de proteína a 10 mg/mL (Lot 056-99). Diez mL de la disolución de proteína de 10 mg/mL se diluyeron en el tampón para proporcionar una disolución de 1 mg/mL (Lote 056-100). Ambas disoluciones se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.

El producto formulado se cargó en viales de vidrio de 10 mL y de 1 mL, cuyo total combinado produjo 1308 mg de rHuPH20 soluble. Los viales se congelaron a -80°C, a continuación se transfirieron a -20°C para el almacenamiento. Los lotes 056-122 y 056-123 fueron caracterizados a continuación con respecto a la actividad y la pureza. Los lotes 056-122 y 056-123 exhibieron una actividad enzimática de 1.376.992 unidades/mL y 129.412 unidades/mL y una actividad específica de 136.900 unidades/mg y 124.400 unidades/mg (calculada a partir de la actividad enzimática y la concentración de proteínas). La pureza de las muestras de rHuPH20 soluble se determinó mediante SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (RP-HPLC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y cromatografía de intercambio aniónico. Según se determinó mediante RP-HPLC, se observó que la pureza de los dos Lotes era de aproximadamente 96,2%. Según se determinó mediante SEC, se observó que la pureza de los dos Lotes era de aproximadamente 99%. Se mostró que los niveles de endotoxina eran ≤0,8 UE/mL y 0,09 UE/mL para los lotes 056-122 y 056-123, respectivamente. Se midió que la osmolaridad era de 265 mOsm/kg y 256 mOsm/kg para los lotes 056-122 y 056-123, respectivamente.

D. Reproducibilidad del procedimiento de producción de rHuPH20 soluble del Gen2 en cultivo celular en un Biorreactor de 30 L

El procedimiento descrito anteriormente para el Lote 2B2-20K.6 se utilizó para un lote posterior para demostrar la reproducibilidad del procedimiento. El procedimiento se modificó ligeramente por medio de la incorporación de una etapa de inactivación viral inmediatamente antes de las etapas de cromatografía en columna.

Un vial de células 2B2 (1 x10⁷ células) se descongeló y se cultivó a 37°C, CO₂ al 7% durante 7 pases en CD CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA), con un suplemento de metotrexato 20 µM y 40 mL/L de GlutaMAX™-I (Invitrogen), después de lo cual se expandió hasta 400 mL, a continuación 4,4 L en medio CD CHO con un suplemento de 40 mL/L de GlutaMAX™-I y sin metotrexato. A un biorreactor de 36 L (Bellco serie 1964) que contenía 20 L de medio CD CHO con un suplemento de 800 L de GlutaMAX™-I, 100 mg de insulina humana recombinante y 300 mg de sulfato de gentamicina se le inoculó el cultivo de 3 L a una densidad de siembra inicial de 4,7 x 10⁵ células/mL. El punto de fijación de la agitación del biorreactor se ajustó a 80 RPM; temperatura: 37°C; pH: 7,15; oxígeno disuelto: 25%. El biorreactor recibió superposición de aire filtrado y un burbujeo de aire/oxígeno/CO₂, controlado por un controlador Applikon ADI 1030.

El cultivo se alimentó 4 veces durante la ronda del biorreactor de 13 días, en el plazo de 127, 163, 208 y horas después de la inoculación. Los medios de alimentación se filtraron en el biorreactor mediante una bomba peristáltica. El punto de ajuste de la temperatura del biorreactor se redujo de 37°C a 36,5°C el día 7, a 36,0°C el día 9 y finalmente a 35,5°C el día 11. El contenido de cada uno de los medios de alimentación y de los parámetros de alimentación del biorreactor en toda la ronda se proporcionan en las Tablas 23 y 24, respectivamente.

Tabla 23. Formulaciones de los medios de alimentación

Componente	Medio inicial del biorreactor	Alimentación Núm. 1	Alimentación Núm. 2	Alimentación Núm. 3	Alimentación Núm. 4
Medio líquido CD CHO (Invitrogen)	20 L	0	0	0	0
polvo CD CHO AGT	0 g	97,2 g	48,6 g	24,3 g	24,3 g
SWFI	0	700 mL	700 mL	600 mL	600 mL
GlutaMAX™-I (Invitrogen)	800 mL	160 mL	80 mL	60 mL	40 mL
Yeastolate ultrafiltrado (Invitrogen; 200 g/L)	0	100 mL	200 mL	300 mL	300 mL
Dextrosa (D-glucosa)	0	40 g	40 g	60 g	50 g
Gentamicina	300 mg	0	0	0	0
rhInsulina	100 mg	40 mg	0	0	0
Butirato de sodio	0	0	1,1 g	2,2 g	1,1 g

Tabla 24. Parámetros del biorreactor

Horas	Densidad celular viable (x10 ⁵ células/mL)	% de Viabilidad	pH	Unidades de hialuronidasa	Vol (L)	Glucosa	Alimentación
0	4,7	98	7,28	113	24	8200	-
24	8,9	98	7,23	202	24	6160	-

Horas	Densidad celular viable (x10 ⁵ células/mL)	% de Viabilidad	pH	Unidades de hialuronidasa	Vol (L)	Glucosa	Alimentación
50	19,3	97	7,15	332	24	5480	-
76	36,7	99	6,85	680	24	3620	-
120	73,6	99	6,76	1619	24	2100	Alimentación Núm. 1
145	84,3	99	6,75	2842	25	2660	-
165	98,8	99	6,87	3756	25	840	Alimentación Núm. 2
190	95,3	99	6,85	4773	26	1330	-
201	105	97	6,90	5484	26	270	Alimentación Núm. 3
214	95,9	93	6,82	6344	27	2590	-
242	81,2	81	6,75	7890	27	1350	Alimentación Núm. 4
268	51,9	48	6,65	10398	28	2500	-
287	38,4	41	6,70	11864	28	12170	-
308	31,6	31	6,66	12864	28	1850	Harvest

El biorreactor se cosechó y se filtró a través de un sistema que contenía una serie de filtros Millipore Pod D0HC (0,5 m²) y apilamientos A1HC (0,1 m²), que contenían capas de tierra de diatomeas de tamaño de poro graduado, seguido de filtración final a través de filtro de cápsula (Sartorius Sartobran 300) en bolsas de almacenamiento de 20 L. La cosecha se realizó utilizando una bomba peristáltica y se completó en aproximadamente 75 minutos, obteniéndose aproximadamente 30 L de líquido de cultivo celular cosechado (HCCF). Esto incluye el volumen del biorreactor de 29 L más aproximadamente 2 L del agente de captura PBS. Al HCCF se le añadieron suplementos de EDTA y Tris a concentraciones finales de 10 mM cada uno, y un pH final de 7,5. A continuación, el HCCF se almacenó a 2-8°C antes de ser concentrado y se sometió a un cambio de tampón.

Para concentrar la proteína, se equilibró en primer lugar un sistema Sartorius Slice con 3x casetes de flujo transversal Sartocon Slice de 929,36 cm² (MWCO de 30 kDa) en Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. Se concentraron 30 L de HCCF 10x hasta 3 L y se sometieron a cambio de tampón 10x con el tampón Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. La velocidad de flujo media durante la diafiltración fue de 150 mL/min y la presión transmembrana media fue de 1,05 kg/cm². El producto retenido se filtró a través de sistemas de filtro de cápsula de 0,2 µm en bolsas de almacenamiento de 5 L para un volumen final de 3,0 L. A continuación, el producto retenido se almacenó a 2-8°C.

La inactivación viral se realizó mezclando 235 mL de una disolución filtrada de Tritón X-100 al 10% p/p, fosfato de tributilo al 35% p/p en SWFI con 2,15 L de proteína concentrada y sometida a cambio de tampón a temperatura ambiente en un matraz de agitación de vidrio agitando a 30-40 rpm. Al cabo de 45 minutos, la disolución de proteína se cargó en la columna de Q Sepharose (como se describe más abajo). La carga llevó 24 minutos, lo que dio como resultado un tiempo de exposición total a la disolución de detergente de 69 minutos.

La columna de Q Sepharose con un lecho de columna de 1,1 L, diámetro 7 cm, altura 28 cm se desinfectó con 2,1 L de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. A continuación, se limpió con 2,5 L de Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0, se enjuagó en 4,5 L de agua estéril para inyectables (SWFI) y se equilibró con 4,5 L de Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0. El cambio de tampón, la proteína viral inactivada (2385 mL a 133.040 unidades de hialuronidasa/mL) se cargó en la columna. La columna se lavó con 4,5 L de Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0, y 4,5 L de Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. El producto se eluyó en 2,5 L de Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0, obteniéndose 2500 mL a 133.680 unidades/mL, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Una columna de Phenyl Sepharose con un lecho de columna de 2,2 L (altura 28 cm, diámetro 10 cm) se desinfectó con 5,0 L de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. A continuación, se enjuagó con 6,0 L de SWFI y se equilibró en 4,6 L de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 mM. Para eluir la columna, se añadieron 9,6 mL de fosfato de potasio monobásico 1 M, 9,6 mL de fosfato de potasio dibásico 1 M y 0,4 mL de CaCl₂ 1 mM. A continuación, esto se cargó en la columna y se recogieron el flujo directo y del agente de captura (fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 mM), proporcionando 6450 mL a 43.840 unidades/mL. El producto se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Una columna de Fenil Amino Boronato con un lecho de columna de 2,2 L (altura 29 cm, diámetro 10 cm) se desinfectó con 3,5 L de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. A continuación, se enjuagó con 5,0 L de SWFI y se equilibró con 9,0 L de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. La sustancia del flujo

5 directo de la columna de Phenyl Sepharose se cargó en la columna de Amino Fenil Boronato. La columna se lavó con 9,9 L de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0, y a continuación con 9,9 L de bicina 20 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 9,0. El producto se eluyó con 4,4 L de Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0, obteniéndose 4389 mL a 33.840 unidades/mL, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

10 Una columna de hidroxiapatita con un lecho de columna de 1,1 L (diámetro 7 cm, altura 28 cm) se desinfectó con 2,1 L de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. La columna se neutralizó con 3,6 L de fosfato de potasio 200 mM, pH 7,0, a continuación, se equilibró en 3,2 L de fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM. Al producto eluido de la columna de Fenil Amino Boronato, se le añadieron 11 mL de fosfato de potasio monobásico 1 M, 11 mL de fosfato de potasio dibásico 1 M y 0,44 mL de CaCl_2 1 mM. A continuación, esto se cargó en la columna y

15 posteriormente se lavó con 4,8 L de fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0, y a continuación con 3,8 L de fosfato de potasio 10 mM, NaCl 100 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. El producto se eluyó con 1,5 L de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0, dando como resultado 1500 mL a 114.320 unidades/mL, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

20 El producto purificado se concentró utilizando un cartucho Millipore de 46,47 cm² con MWCO de 30 kDa que había sido equilibrado en NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0. El producto se concentró de 1.500 mL a 0,961 mg/mL a 125 mL y se sometió a cambio de tampón 10x con el tampón NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0, después se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. Se realizaron las mediciones de A_{280} e indicaron que la concentración de proteína de los restantes 122 mL era de 11.431 mg/mL. Se añadieron 17,5 mL adicionales de tampón NaCl 130 mM, Hepes 10

25 mM, pH 7,0 para llevar la concentración de proteína a 10 mg/mL (Lote 056-135). Diez mL de la disolución de proteína de 10 mg/mL se diluyeron en el tampón para proporcionar una disolución de 1 mg/mL (Lote 056-136). Ambas disoluciones se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.

El producto formulado se introdujo en viales de vidrio de 5 mL y 1 mL, el total combinado de los cuales produjo 1324

30 mg de rHuPH20 soluble. Los viales se congelaron a -80°C, después se transfirió a -20°C para el almacenamiento. Los Lotes 056-135 y 056-136 fueron caracterizados con respecto a la actividad y la pureza. Los Lotes 056-135 y 056-136 exhibieron una actividad enzimática de 1.301.010 unidades/mL y 127.661 unidades/mL, y una actividad específica de 121.600 unidades/mg y 127.700 unidades/mg (calculada a partir de la actividad enzimática y la concentración de proteínas). La pureza de las muestras de rHuPH20 soluble se determinó mediante SDS-PAGE,

35 isoelectroenfoque (IEF), cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (RP-HPLC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y cromatografía de intercambio aniónico. Según se determinó mediante RP-HPLC, se observó que la pureza de los dos Lotes estaba entre 93,5% y 93,7%. Según se determinó mediante SEC, se observó que la pureza de los dos Lotes era mayor de 99%. Se demostró que los niveles de endotoxina eran ≤0,84 UE/mL y 0,09 UE/mL para los lotes 056-135 y 056-136, respectivamente. Se midió que la osmolaridad era de 255

40 mOsm/kg y 260 mOsm/kg para los lotes 056-135 y 056-136, respectivamente. El pH de cada uno fue de 7,2.

Ejemplo 8.

A. Producción de rHuPH20 soluble del Gen2 en cultivo celular en biorreactor de 300 L

45 Los métodos de producción y purificación detallados en el Ejemplo 7, anteriormente, fueron aumentados a escala para la producción utilizando un biorreactor de 400 L. Un vial de 2B2 células (1×10^7 células) se descongeló y se expandió desde matraces oscilantes a través de matraces de agitación de 36L en CD CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA), con un suplemento de metotrexato 20 µM y GlutaMAX™-I 8 mM (Invitrogen). En resumen, un vial de células se descongeló en un baño de agua 37°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 de nueva aportación y se colocaron en un incubador a

50 37°C, CO₂ al 7%. 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, 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, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/mL, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 250 mL en 200 mL de volumen de cultivo, y el matraz se incubó a 37°C, CO₂ al 7%. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/mL, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 1 L en 800 mL de volumen de cultivo y se incubaron a 37°C, CO₂ al 7%. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/mL el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 6 L en un volumen de cultivo de 5000 mL y se incubó a 37°C, CO₂ al 7%. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/mL el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 36 L en volumen de cultivo de 32 L y se

60 incubó a 37°C, CO₂ al 7%.

Un reactor de 400 L se esterilizó por medio de vapor de agua a 121°C durante 30 minutos y se añadieron 230 mL de medio CD CHO con un suplemento de GlutaMAX™-I 8 mM y 5 mg/L de rHuInsulina. Antes de su uso, se verificó la contaminación del reactor. Se transfirieron aproximadamente células de 30 L de los matraces de agitación de 36L al

bioreactor de 400 L (Braun) a una densidad de inoculación de $4,0 \times 10^5$ células viables por mL y un volumen total de 260L. Los parámetros fueron ajuste de temperatura, 37°C; Velocidad del impulsor 40-55 RPM; Presión del Recipiente: 0,21 kg/cm²; Burbujeo de Aire 0,5-1,5 l/min.; Superposición de Aire: 3 L/min. Se tomaron muestras del reactor diariamente para los recuentos de células, verificación de pH, análisis del medio, producción y retención de proteínas. Asimismo, durante la ronda se añadieron alimentaciones de nutrientes. A las 120 horas (día 5), se añadieron 10,4 L de Medio de Alimentación Núm. 1 (4 x CD CHO + 33 g/L de glucosa + 160 mL/L de GlutaMAX™-I + 16,6 g/L de Yeastolate + 33 mg/L rHuInsulina). A las 168 horas (día 7) se añadieron, 10,8 litros de Alimentación Núm. 2 (2 x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + 80 mL/L de GlutaMAX™-I + 33,4 g/L de Yeastolate + 0,92 g/L de butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambió a 36,5°C. A las 216 horas (día 9), se añadieron 10,8 L de Alimentación Núm. 3 (1x CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 50 mL/L de GlutaMAX™-I + 50 g/L de Yeastolate + 1,80 g/L de butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambió a 36°C. A las 264 horas (día 11), se añadieron 10,8 L de Alimentación Núm. 4 (1 x CD CHO + 33 g/L de glucosa + 33 mL/L de GlutaMAX™-I + 50 g/L de Yeastolate + 0,92 g/L de butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambió a 35,5°C. Se observó que la adición de los medios mejoraba drásticamente la producción de rHuPH20 soluble en las etapas finales de producción. El reactor fue cosechado a los 14 días o cuando la viabilidad de las células se redujo por debajo de 40%. El procedimiento 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 cosecha, se tomaron muestras de cultivo para micoplasma, carga biológica, endotoxinas y partículas virales *in vitro* e *en vivo*, TEM para las partículas virales y la actividad enzimática.

El cultivo se bombeó mediante una bomba peristáltica a través de cuatro módulos del sistema de filtración Millistak (Millipore) en paralelo, conteniendo cada uno una capa de tierra de diatomeas graduada a 4-8 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a 1,4-1,1 µm, seguido de una membrana de celulosa, a continuación, a través de un segundo sistema único de filtración Millistak (Millipore) que contenía una capa de tierra de diatomeas graduada a 0,4-0,11 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a <0,1 µm, seguido de una membrana de celulosa, y a continuación a través de un filtro final de 0,22 µm en una bolsa flexible de un solo uso estéril con una capacidad de 350 L. Al líquido de cultivo celular cosechado se le añadió un suplemento de EDTA 10 mM y Tris 10 mM a un pH de 7,5. El cultivo se concentró 10 veces con un aparato de filtración de flujo tangencial (TFF) modelo que utiliza cuatro filtros de polietersulfona (PES) de 30 kDa de peso molecular de corte (MWCO) Sartoslice TFF (Sartorius), seguido de 10x cambio de tampón con Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 en un filtro final de 0,22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 50 L.

La cosecha concentrada, sometida a diafiltración fue inactivada por virus. Antes de la inactivación viral, se preparó una disolución de Triton X-100 al 10%, fosfato de tri(n-butilo) (TNBP) al 3%. La cosecha concentrada, sometida a diafiltración se expuso a Triton X-100 al 1%, TNBP al 0,3% durante 1 hora en un recipiente de reacción de vidrio de 36 L inmediatamente antes de la purificación en la columna de la Q.

B. Purificación de sHuPH20 del Gen2

Se preparó una columna de intercambio iónico (resina 9 L, H = 29 cm, D = 20 cm) Q Sepharose (Pharmacia). Se recogieron muestras de lavado para una determinación del pH, la conductividad y el análisis de endotoxina (LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5. Después de la inactivación viral, la cosecha concentrada, sometida a diafiltración, se cargó en la columna Q a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 y Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. La proteína se evaluó con Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0 a una bolsa estéril en un filtro final de 0,22 µm. La muestra de producto eluido se sometió a ensayo para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática. Las lecturas de absorbancia A₂₈₀ se tomaron al principio y al final del intercambio.

A continuación se llevó a cabo una cromatografía de interacción hidrófoba con Phenyl-Sepharose (Pharmacia). Se preparó una columna de Phenyl-Sepharose (PS) (19-21 L de resina, H=29 cm, D= 30 cm). El lavado se recogió y se tomaron muestras para el pH, la conductividad y las endotoxinas (análisis LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 M, sulfato de amonio 0,5 M, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. Al producto eluido de proteína anterior se le añadió un suplemento de sulfato de amonio 2M, fosfato de potasio 1 M y disoluciones de partida de CaCl₂ 1 M para proporcionar concentraciones finales 5 mM, 0,5 M y 0,1 mM, respectivamente. La proteína se cargó en la columna PS a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. Se añadieron fosfato de potasio 5 M, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl₂ 0,1 mM a pH 7,0 a 100 cm/hr. El flujo directo se hizo pasar a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril. Se tomaron muestras del flujo directo para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Se preparó una columna de aminofenilboronato (ProMedics; 21 L de resina, H=29 cm, D= 30 cm). El lavado se recogió y se tomaron muestras para el pH, la conductividad y las endotoxinas (análisis LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 M, sulfato de amonio 0,5 M. La proteína purificada en PS se cargó en la columna de aminofenilboronato a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 M, 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 de sodio 100 mM, pH 9,0. La proteína se eluyó con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 6,9 y se hizo pasar a través de un filtro estéril a una bolsa estéril. La muestra eluida se sometió a ensayo para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

5 Se preparó la columna de hidroxiapatita (HAP) (BioRad; 13 L de resina, H=20 cm, D= 30 cm). El lavado se recogió y se sometió a ensayo para determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (análisis LAL). La columna se equilibró con fosfato de potasio 5 M, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. A la proteína purificada con aminofenilboronato se le añadió un suplemento a concentraciones finales de fosfato de potasio 5 M y CaCl₂ 0,1 mM y se cargó en la columna HAP a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 M, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM. La columna se lavó a continuación con fosfato de potasio 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM. La proteína se evaluó con fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 y se hizo pasar a través de un filtro estéril de 0,22 µm a una bolsa estéril. La muestra eluida se sometió a ensayo para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

15 La proteína purificada mediante HAP se hizo pasar después a través de un filtro para eliminación de virus. El filtro Virosart (Sartorius) esterilizado se preparó en primer lugar lavando con 2 L de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0. Antes de su uso, se tomaron muestras del tampón filtrado para determinar el pH y la conductividad. La proteína purificada mediante HAP se bombeó a través de una bomba peristáltica a través del filtro para eliminación de virus 20 nM. La proteína filtrada en fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 se hizo pasar a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril. La muestra filtrada de virus se sometió a ensayo para determinar el perfil de concentración de proteína, actividad enzimática, oligosacáridos, monosacáridos y ácido siálico (como se describe en los Ejemplos 9 a 10, más abajo).

25 La proteína en el producto filtrado se concentró a continuación hasta 10 mg/mL utilizando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) Sartocore Slice con un peso molecular de corte (MWCO) de 10 kD (Sartorius). El filtro se preparó en primer lugar lavando con histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0 y se tomaron muestras del permeato para determinar el pH y la conductividad. Después de la concentración, se tomaron muestras de la proteína concentrada y se sometieron a ensayo para determinar la concentración de proteína y la actividad enzimática. Se realizó un cambio de tampón 6x en la proteína concentrada al tampón final: histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0. Después del cambio de tampón, la proteína concentrada se hizo pasar 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 sometió a ensayo para determinar la concentración de proteína, la actividad enzimática, los grupos sulfhidrilo libres, el perfil de oligosacáridos y la osmolaridad (como se describe en los Ejemplos 9 a 10, más abajo).

35 La proteína a granel filtrada en condiciones estériles se dispensó asepticamente a 20 mL a viales de Teflón estériles de 30 mL (Nalgene). Los viales se sometieron a continuación a congelación instantánea y se almacenaron a -20 ± 5°C. La producción y purificación de rHuPH20 soluble utilizando este método produjo aproximadamente 11 y 15 gramos, con actividad específica de 95.000 unidades/mg a 120.000 unidades/mg.

40 C. Comparación de la producción y purificación de sHuPH20 del Gen1 y Gen2

La producción y purificación de rHuPH20 soluble del Gen2 en un cultivo celular en biorreactor de 300L contenía algunos cambios en los protocolos en comparación con la producción y purificación de rHuPH20 soluble del Gen1 en un cultivo celular en biorreactor de 100 L (descrito en el Ejemplo 4). La Tabla 25 muestra diferencias ilustrativas, además de simples cambios de aumento a escala, entre los métodos.

Tabla 25. Diferencias ilustrativas entre la producción y purificación de rHuPH20 soluble del Gen1 y Gen2 utilizando los métodos de cultivo celular en biorreactor de 100 L y 300 L

Diferencia de procedimiento	rHuPH20 soluble del Gen1	rHuPH20 soluble del Gen2
Línea celular	3D35M	2B2
Medios utilizados para expandir las células	Contiene 0,10 µM	Contiene 20 µM
inóculo	metotrexato (0,045 mg/L)	metotrexato (9 mg/L)
Medios en cultivos de 6L en curso	Contiene metotrexato 0,10 µM	No contiene metotrexato
matraz de agitación de 36 L	Sin instrumentación	Equipado con instrumentación que verifica y controla el pH, el oxígeno disuelto, el burbujeo y la velocidad de flujo del gas de superposición.
	Volumen de funcionamiento 20 L.	volumen de funcionamiento 32 L

Diferencia de procedimiento	rHuPH20 soluble del Gen1	rHuPH20 soluble del Gen2
Volumen final de funcionamiento en el biorreactor	Aprox. 100 L en un biorreactor de 125 L (volumen de cultivo inicial + 65 L)	Aprox. 300L en un biorreactor de 400L (volumen de cultivo inicial + 260 L)
Medios de cultivo en el biorreactor final	Sin rHuInsulina	5,0 mg/L de rHuInsulina
Volumen de los medios de alimentación	Aumentado a 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.	Aumentado a 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.
Alimentación de medios	Medio de Alimentación Núm. 1: CD CHO + 50 g/L de Glucosa + GlutaMAX™-I 8 mM	Medio de Alimentación Núm. 1: 4x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + GlutaMAX™-I 32 mM + 16,6 g/L de Yeastolate + 33 mg/L de rHuInsulina
	Alimentación Núm. 2 (CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 8 mM GlutaMAX™-I + 1,1 g/L de Butirato de Sodio	Alimentación Núm. 2: 2x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + GlutaMAX™-I 16 mM + 33,4 g/L de Yeastolate + 0,92 g/L de Butirato de Sodio
	Alimentación Núm. 3: CD CHO + 50 g/L de Glucosa + GlutaMAX™-I 8 mM + 1,1 g/L de Butirato de Sodio	
		Alimentación Núm. 3: 1 x CD CHO + 50 g/L de Glucosa + GlutaMAX™-I 10 mM + 50 g/L de Yeastolate + 1,80 g/L de Butirato de Sodio
		Alimentación Núm. 4: 1 x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + GlutaMAX™-I 6,6 mM + 50 g/L de Yeastolate + 0,92 g/L de Butirato de Sodio
Filtración del cultivo celular del biorreactor	Cuatro filtros de polietersulfona (8,0 µm, 0,65 µm,	1ª fase - Cuatro módulos en paralelo, cada uno con una capa
	0,22 µm y 0,22 µm) en serie	de tierra de diatomeas graduada a 4-8 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a 1,4-1,1 µm, seguida de una membrana de celulosa.
		2ª fase - módulo individual que contiene una capa de tierra de diatomeas graduada a 0,4-0,11 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a <0,1 µm, seguida de una membrana de celulosa.
		3ª fase - filtro de polietersulfona de 0,22 µm
	bolsa de almacenamiento de 100 L	bolsa de almacenamiento de 300L
		Al cultivo celular cosechado se le añade un suplemento de EDTA 10 mM, Tris 10 mM a un pH de 7,5.
Concentración y cambio de tampón antes de la cromatografía	Producto concentrado con 2 TFF con Filtro Millipore espiral de Polietersulfona con MWCO de 30K	Producto concentrado utilizando cuatro Filtros Sartorius Sartoslice TFF con MWCO de 30K
	Cambio de Tampón del Producto concentrado 6x con Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0	Cambio de Tampón del Producto concentrado 10x con Tris 10 mM, Na ₂ SO ₄ 20 mM, pH 7,5
	bolsa de almacenamiento estéril de 20L	bolsa de almacenamiento estéril de 50L
Inactivación viral antes de la cromatografía	Ninguna	Inactivación viral realizada con la adición de Triton X-100 al 1%, Fosfato de Tributilo al 0,3%, pH 7,5.
1ª etapa de purificación	Sin lectura de absorbancia	mediciones de A280 al principio y al final

Diferencia de procedimiento	rHuPH20 soluble del Gen1	rHuPH20 soluble del Gen2
Sepharose)		
Filtración Viral después de la cromatografía	Filtro Pall DV-20 (20 nm)	Filtro Sartorius Virosart (20 nm)
Concentración y cambio de tampón después de la cromatografía	Tampón Hepes/solución salina pH 7,0	Tampón Histidina/solución salina, pH 6,0
	Proteína concentrada a 1 mg/mL	Proteína concentrada a 10 mg/mL
Carga del vial	Volúmenes de carga de 5 mL y 1 mL	Volúmenes de carga de 20 mL
	Almacenado a - ≤0°C	Almacenado a ≤0°C
	Cierre de vidrio/caucho	Tapa de Teflón/rosca
Rendimiento de rHuPH20 soluble	Aprox. 400-700 mg	Aprox. 11-25 g

Ejemplo 9

Determinación de la actividad enzimática de rHuPH20 soluble

5 Se determinó la actividad enzimática de rHuPH20 soluble en muestras tales como cultivos celulares, fracciones de purificación y disoluciones purificadas utilizando un análisis turbidimétrico, que se basa en la formación de un producto precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une a albúmina del suero. La actividad se mide incubando la rHuPH20 soluble con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un período de tiempo ajustado (10 minutos) y a continuación precipitando el hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina de suero acidulada. El turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un período de desarrollo de 30 minutos. La disminución de la turbidez resultante de la actividad enzimática sobre el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad enzimática de la rHuPH20 soluble. El método se ejecuta utilizando una curva de calibración generada con diluciones de un patrón de referencia que funciona en un análisis de rHuPH20 soluble, y las mediciones de la actividad de la muestra se vuelven relativas para esta curva de calibración.

Las diluciones de la muestra se prepararon en Disoluciones de Diluyente de Enzima. La Disolución de Diluyente de Enzima se preparó disolviendo $33,0 \pm 0,05$ mg de gelatina hidrolizada en 25,0 mL de 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 disolución de Buminato al 25% en la mezcla y sometiendo a vórtice durante 30 segundos. Esto se realizó a las 2 horas de uso y se almacenó en hielo hasta que se necesitó. Las muestras se diluyeron a 1-2 U/mL estimadas. Generalmente, la dilución máxima por etapa no excedió de 1:100 y el tamaño de la muestra inicial para la primera dilución no fue inferior a 20 µL. Los volúmenes de muestra mínimos necesarios para realizar el análisis fueron: Muestras En Proceso, Fracciones de FPLC: 80 µL; Sobrenadantes de Cultivo de Tejidos: 1 mL; Material Concentrado 80 µL; Material Purificado o de la Etapa Final: 80 µL. Las diluciones se realizaron por triplicado en una placa de 96 pocillos con Baja Unión a Proteína, y se transfirieron 30 µL de cada dilución de color negro/de fondo transparente OPTILUX (BD Biosciences).

Las diluciones de rHuPH20 soluble conocida con una concentración de 2,5 U/mL se prepararon en Disolución de Diluyente de Enzima para generar una curva patrón y se añadieron 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 "Blanco reactivo" que contenían 60 µL de Disolución de Diluyente de Enzima en la placa como control negativo. La placa se cubrió después y se calentó en un bloque térmico de calor durante 5 minutos a 37°C. La cubierta se retiró y la placa se sacudió durante 10 segundos. Después de agitar, la placa se devolvió a la placa para calentar el bloque y se cebó el MULTIDROP 384 Liquid Handling Device con 0,25 mg/mL de disolución de hialuronato sódico caliente preparada disolviendo 100 mg de hialuronato de sodio (Lifecore Biomedical) en 20,0 mL de SWFI. Esta se mezcló por rotación y/o balanceo suave a 2-8°C durante 2-4 horas, o hasta que se disolvió por completo). La placa de reacción se transfirió al MULTIDROP 384 y la reacción se inició pulsando la tecla de inicio para dispensar 30 µL de hialuronato de sodio en cada pocillo. La placa se retiró a continuación del MULTIDROP 384 y se sacudió durante 10 segundos antes de ser transferida a un bloque térmico con la cubierta de la placa recolocada. La placa se incubó a 37°C durante 10 minutos

Se preparó el MULTIDROP 384 para detener la reacción cebando la máquina con Disolución Trabajo de Suero y cambiando el ajuste de volumen a 240 µL. (25 mL de Disolución de Partida de S [1 volumen de Suero de Caballo (Sigma) se diluyó con 9 volúmenes de Disolución de Tampón Acetato 500 mM y el pH se ajustó a 3,1 con ácido

clorhídrico] en 75 mL de Disolución de Tampón Acetato 500 mM). La placa se retiró del bloque térmico y se colocó sobre el MULTIDROP 384 y se dispensaron 240 µL de Disoluciones de Trabajo de suero en los pocillos. La placa se retiró y se sacudió 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 de la enzima (en U/mL) de cada muestra mediante el ajuste a la curva patrón.

La actividad específica (Unidades/mg) se calculó dividiendo la actividad de la enzima (U/mL) por la concentración de proteína (mg/mL).

Ejemplo 10

Determinación del contenido de ácido siálico y monosacárido

Se puede evaluar el contenido de ácido siálico y monosacárido de la rHuPH20 soluble mediante cromatografía líquida de fase inversa (RPLC) después de la hidrólisis con ácido trifluoroacético. En un ejemplo, se determinó el contenido de ácido siálico y monosacárido de la hialuronidasa purificada lote núm. HUB0701E (1,2 mg/mL; producida y purificada esencialmente como se describe en el Ejemplo 8). 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 parte alícuota de 45 µL de cada muestra re-suspendida a un nuevo tubo y se secó, y se añadieron a cada uno 10 µL de una disolución de 10 mg/mL de acetato de sodio. Los monosacáridos liberados se marcaron fluorescentemente por medio de la adición de 50 µL de una disolución que contenía 30 mg/mL de ácido 2-aminobenzoico, 20 mg/mL de cianoborohidruro de sodio, aproximadamente 40 mg/mL de acetato de sodio y 20 mg/mL de ácido bórico en metanol. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 80°C en la oscuridad. La reacción de derivatización se sofocó mediante la adición de 440 µL de fase móvil A (n-butilamina al 0,2% (v/v), ácido fosfórico al 0,5% (v/v), tetrahidrofurano al 1% (v/v)). También se hidrolizó un blanco de matriz de agua y se derivatizó como se describe para la muestra de hialuronidasa como un control negativo. Los monosacáridos liberados se separaron por medio de RPLC utilizando una columna de fase inversa de Octadecilo (C₁₈) (4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula; J.T. Baker) y se supervisó mediante la detección de fluorescencia (excitación a 360 nm, emisión a 425 nm). La cuantificación del contenido de monosacárido se hizo por comparación de los cromatogramas de la muestra de hialuronidasa con los cromatogramas de los patrones de monosacáridos incluyendo N-D-glucosamina (GlcN), N-D-galactosamina (GalN), galactosa, fucosa y manosa. La Tabla 26 presenta la razón molar de cada monosacárido por molécula de hialuronidasa.

Tabla 26. Contenido de monosacárido de rHuPH20 soluble

Lote	Réplicas	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
	Promedio	13,97	0,08 *	6,10	24,81	2,65
* Los resultados de GalN estaban por debajo del límite de detección						

Ejemplo 11

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

La secuenciación C-terminal se realizó en dos lotes de sHuPH20 producida y purificada a partir de células 3D35M en un volumen de biorreactor 100 L (Lote HUA0505MA) y células 2B2 en un volumen de biorreactor de 300L (Lote HUB0701EB). Los lotes se digirieron por separado con endoproteinasa Asp-N, que escinde específicamente los enlaces peptídicos N-terminalmente en el ácido aspártico y cisteico. Esto libera la porción C-terminal de la rHuPH20 soluble en el ácido aspártico en la posición 431 del SEQ ID NO: 4. Los fragmentos C-terminales se separaron y se caracterizaron para determinar la secuencia y la abundancia de cada población en el Lote HUA0505MA y el Lote HUB0701EB.

Se observó que las preparaciones de rHuPH20 soluble de las células 3D35M y las células 2B2 mostraban heterogeneidad, y contenían polipéptidos que diferían entre sí en su secuencia C-terminal (Tablas 27 y 28). Esta heterogeneidad es probablemente el resultado de la escisión C-terminal del polipéptido de 447 aminoácidos expresado (SEQ ID NO: 4) por las peptidasas presentes en el medio de cultivo celular u otras disoluciones durante el proceso de producción y purificación. Los polipéptidos de las preparaciones de rHuPH20 soluble tienen secuencias de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 1-447, 1-446, 1-445, 1-444 y 1-443 de la secuencia de rHuPH20 soluble mostrada en el SEQ ID NO: 4. La secuencia de aminoácidos completa de cada uno de estos polipéptidos se muestra en los SEQ ID NO: 4 a 8, respectivamente. Como se ha indicado en las tablas 27 y 28, la abundancia de cada polipéptido en las preparaciones de rHuPH20 soluble de células 3D35M y células 2B2 difiere.

Tabla 27. Análisis de fragmentos C-terminales del Lote HUA0505MA

Fragmento	Posición del aminoácido (con respecto al SEQ ID NO: 4)	Secuencia	Masa Teórica	Masa Exp.	Error	Tiempo Elución	Abundancia
D28a	431-447	DAFKLPPMETEEPQIFY (SEQ ID NO: 66)	2053,97	2054,42	0,45	99,87	0,2%
D28b	431-446	DAFKLPPMETEEPQIF (SEQ ID NO: 67)	1890,91	1891,28	0,37	97,02	18,4%
D28c	431-445	DAFKLPPMETEEPQI (SEQ ID NO: 68)	1743,84	1744,17	0,33	86,4	11,8%
D28D	431-444	DAFKLPPMETEEPQ (SEQ ID NO: 69)	1630,70	1631,07	0,32	74,15	56,1%
D28e	431-443	DAFKLPPMETEEP (SEQ ID NO: 70)	1502,70	1502,98	0,28	77,36	13,6%
D28f	431-442	DAFKLPPMETEE (SEQ ID NO: 71)	1405,64	ND	N/A	N/A	0,0%

Tabla 28. Análisis de fragmentos C-terminales del Lote HUB0701EB

Fragmento	Posición del aminoácido (con respecto al SEQ ID NO: 4)	Secuencia	Masa Teórica	Masa Exp.	Error	Tiempo de elución	Abundancia
D28a	431-477	DAFKLPPMETEEPQIFY (SEQ ID NO: 66)	2053,97	2054,42	0,45	99,89	1,9%
D28b	431-446	DAFKLPPMETEEPQIF (SEQ ID NO: 67)	1890,91	1891,36	0,45	96,92	46,7%
D28c	431-445	DAFKLPPMETEEPQI (SEQ ID NO: 68)	1743,84	1744,24	0,40	85,98	16,7%
D28D	431-444	DAFKLPPMETEEPQ (SEQ ID NO: 69)	1630,70	1631,14	0,39	73,9	27,8%
D28e	431-443	DAFKLPPMETEEP (SEQ ID NO: 70)	1502,70	1503,03	0,33	77,02	6,9%
D28f	431-442	DAFKLPPMETEE (SEQ ID NO: 71)	1405,64	ND	N/A	N/A	0,0%

5

Ejemplo 12

Producción y purificación de rHuPH20 soluble en un biorreactor de cultivo celular de 2500 L

- 10 La producción y purificación de rHuPH20 soluble pueden ser aumentadas a escala a partir de un procedimiento en biorreactor alimentado por lotes de 300 L (descrito en el Ejemplo 8) a un procedimiento en biorreactor alimentado por lotes de 2500 L. Al igual que la producción de rHuPH20 en un biorreactor de cultivo celular de 300 L, la producción de rHuPH20 en un biorreactor de cultivo celular de 2500 L se realiza primero descongelando y expandiendo un vial de células 2B2, cultivando en un biorreactor, cosechando y aclarando el cultivo, concentrando y cambiando el tampón de la cosecha, seguido de inactivación viral. La rHuPH20 se purifica a continuación a partir del producto concentrado utilizando una serie de etapas de purificación que utilizan Q Sepharose, Phenyl Sepharose,
- 15 aminofenil boronato y boronato hidroxipatita, seguido de filtración viral.

1. Expansión del cultivo celular

20

Para generar el mayor número de células requerido para sembrar el cultivo celular del biorreactor de 2500 L en comparación con el cultivo de 300 L, el cultivo celular se expandió seriadamente a través de un matraz oscilante de 125 mL, un matraz oscilante de 250 mL, un matraz oscilante de 1 L, dos matraces oscilantes de 2 L, seis matraces oscilantes de 2 L, una biorreactor WAVE™ (GE Healthcare Life Sciences) de 25 L, un biorreactor WAVE™ de 100 L y un biorreactor de siembra de tanque agitado de 600 L (ABEC, Inc. Bethlehem, PA; Stainless Technology Division).

25 En cada expansión, la densidad de siembra diana es de 4×10^5 células/mL. La temperatura a lo largo de la expansión es de 37°C (o entre 36°C y 38°C) con CO₂ al 7% (o entre 6-8% de CO₂). Los matraces se agitaron a

aproximadamente 110 RPM (o 90-130 RPM), los WAVE Bioreactor™ de 25 L y 100 L se sacudieron a 20 RPM (o 15-25 o 18-22 RPM, respectivamente) y el biorreactor de siembra de 600 L se agita a 90 RPM (o 85-95 RPM).

En primer lugar, un vial de 2B2 células (1×10^7 células) del banco de células de trabajo se descongela en un baño de agua a 37°C durante aproximadamente 2 minutos (preferiblemente no más de 5 minutos) antes de añadir los medios y las células se centrifugan. Las células se vuelven a suspender hasta aproximadamente 25 mL (o entre 20-30 mL) con medios de nueva aportación (CD CHO AGT™ con 40 mL/L de GlutaMAX™-I (8mM) y metotrexato 20 µM en un matraz oscilante de 125 mL y se coloca en un incubador a 37°C, CO₂ al 7%. Cuando la densidad celular alcanza aproximadamente 8×10^5 células/mL, el cultivo se transfiere a un matraz oscilante de 250 mL en un volumen de cultivo de 50 mL (o 45-55 mL). Después de la incubación, cuando la densidad celular alcanza aproximadamente $1,6 \times 10^6$ células/mL, el cultivo se expande en un matraz de 1 L en 200 mL volumen de cultivo (o 190-210 mL) y se incuba. Cuando la densidad celular en el matraz de 1 L alcanza aproximadamente $1,6 \times 10^6$ células/mL, el cultivo se expande en 2 x matraces de 2 L, cada uno con un volumen de cultivo total de aproximadamente 400 mL (o entre 350-450 mL por matraz), y se incuba. Cuando la densidad celular en los matraces de 2 L alcanza aproximadamente $1,2 \times 10^6$ células/mL, el cultivo se expande en 6 x matraces de 2 L, cada uno con a volumen de cultivo total de aproximadamente 400 mL (o entre 350-450 mL por matraz), y se incuba. Cuando la densidad celular en los matraces de 2 L alcanza aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/mL, el cultivo se expande en un WAVE Bioreactor™ de 25L, con un volumen de cultivo total de aproximadamente 15 L (o entre 14-16 L) y se incuba con un flujo de aire de 1,5 minuto.

Cuando la densidad celular en el WAVE Bioreactor™ de 25 L alcanza aproximadamente $2,2 \times 10^6$ células/mL, el cultivo se expande en un WAVE Bioreactor™ 100 L, con un volumen de cultivo total de aproximadamente 80 L (o entre 75-85 L), utilizando medio CD-CHO AGT™ al que se añade un suplemento de 3,6 g/L de metotrexato, 40 mL/L de GlutaMAX™-I y 1 mL/L de NaOH 1N, y se incuba con un flujo de aire de 1,5 L/minuto. Cuando la densidad celular en el WAVE Bioreactor™ de 100 L alcanza aproximadamente $2,6 \times 10^6$ células/mL, el cultivo se expande en un biorreactor de siembra de 600 L ABEC, Inc. Bethlehem, PA; Stainless Technology Division) con un volumen de cultivo total de aproximadamente 480 L (o entre 440-520 L) utilizando medio CD-CHO AGT™ al que se añade un suplemento de 40 mL/L de GlutaMAX™-I y se incuba hasta que la densidad celular en el biorreactor de 600 L alcanza aproximadamente $1,6 \times 10^6$ células/mL.

2. Producción de rHuPH20

Se utiliza un biorreactor de 3500 L con un volumen total de 3523 L y un volumen de trabajo de 500-2500 L (ABEC, Inc, Bethlehem, PA) para la producción de alto rendimiento de rHuPH20. Después de la esterilización, se añaden aproximadamente 1800-2000 L de medios CD-CHO AGT™ que contienen 24,3 g/L de CD-CHO AGT™ en polvo, con un suplemento de 40 mL/L de GlutaMAX™-I y 5 mg/L de rHuInsulina al biorreactor. Los parámetros se ajustan a: punto de ajuste de temperatura, 37°C; Velocidad del Impulsor 75 RPM; Presión del Recipiente: 0,35 kg/cm²; Burbujeo de aire 18 L/min; oxígeno disuelto: 25%; pH ≤7,2. Antes de su uso, se verifica la contaminación del reactor. Se inoculan aproximadamente entre 300-500 L de células (dependiendo del recuento celular) del cultivo en el biorreactor de siembra de 600 L al medio de cultivo celular en el biorreactor de 3500 L a una densidad de inoculación de $4,0 \times 10^5$ células viables por mL, para alcalinizar un volumen total de 2100 L. Durante la incubación celular del día 14, se toman muestras del biorreactor diariamente para determinar la viabilidad celular, la densidad celular, la verificación del pH, y la actividad enzimática. También se verifican detenidamente la temperatura y el oxígeno disuelto.

Las alimentaciones de nutrientes se añaden durante la ronda del biorreactor del día 14, cada una a aproximadamente 4% v/v. El día 5, se añaden aproximadamente 84 L (o 4 % v/v) de Medio de Alimentación Núm. 1 (81 g/L de CD-CHO AGT™ en polvo + 33 g/L de Glucosa + 13,3 mL/L de GlutaMAX™-I + 83,3 g/L de Yeastolate + 33 mg/L de rHuInsulina). El día 7, se añaden aproximadamente 87 L (o 4 % v/v) de Alimentación Núm. 2 (40,5 g/L de CD-CHO AGT™ en polvo + 33 g/L de Glucosa + 66,7 mL/L de GlutaMAX™-I + 166,7 g/L de Yeastolate + 0,92 g/L de Butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambia a 36,5°C. El día 9, se añaden aproximadamente 91 L (o 4 % v/v) de Alimentación Núm. 3 (20,3 g/L de CD-CHO AGT™ en polvo + 50 g/L de Glucosa + 50 mL/L de GlutaMAX™-I + 250 g/L de Yeastolate + 1,8 g/L de Butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambia a 36°C. El día 11, se añaden aproximadamente 94 L (o 4 % v/v) de Alimentación Núm. 4 (20,3 g/L de CD-CHO AGT™ en polvo + 33,3 g/L de Glucosa + 33,3 mL/L de GlutaMAX™-I + 250 g/L de Yeastolate + 0,92 g/L de Butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambia a 35,5°C. El reactor se cosecha a los 14 días, produciendo 2400-2600 L de cultivo (típicamente aproximadamente 2500 L).

El cultivo se transfiere a presión a través de 20 módulos del sistema de filtración Millistak (Millipore) en paralelo, conteniendo cada uno una capa de tierra de diatomeas graduada a 4-8 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a 1,4-1,1 µm, seguida de una membrana de celulosa, a continuación a través de un segundo sistema de filtración Millistak (Millipore) que contenía 10 módulos, cada uno con una capa de tierra de diatomeas graduada a 0,4-0,11 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a <0,1 µm, seguida de una membrana de celulosa, y a continuación a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa flexible de un solo uso con una capacidad de 350 L. Al

líquido de cultivo celular cosechado se le añade un suplemento de EDTA 10 mM y Tris 10 mM, pH 8,4, a un objetivo de pH de 7,5. El cultivo se concentra 10x con un aparato de filtración de flujo tangencial (TFF) (Pall) utilizando filtros de polietersulfona con peso molecular de corte (MWCO) de 30 kDa de 18-21 m² de Sartoslice TFF, seguido de 10x cambio de tampón con Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 en un filtro final de 0,22 µm a una bolsa de almacenamiento estéril de 350 L.

Se inactivaron los virus de la cosecha sometida a diafiltración, concentrada. Antes de la inactivación viral, se preparó una disolución de Triton X-100 al 10%, fosfato de tri(n-butilo) (TNBP) al 3%. La cosecha sometida a diafiltración, concentrada se expuso a Triton X-100 al 1%, TNBP al 0,3% hasta 2 horas en recipientes de reacción de acero inoxidable de 500 L inmediatamente antes de la purificación en la columna Q.

B. Purificación de rHuPH20 del Gen2

Se prepara una columna de intercambio iónico Q Sepharose (Pharmacia) (resina 81 L, H = 26 cm, D = 63 cm). La columna se equilibra con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5. Después de la inactivación viral, la cosecha concentrada, sometida a diafiltración de aproximadamente 250 L, se carga en la columna Q a una velocidad de flujo de 150 cm/hr. La columna se lava con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 y Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. La proteína se evalúa con Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0 a una bolsa estéril en un filtro final de 0,22 µm. La muestra de producto eluido se somete a ensayo para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática. Las lecturas de absorbancia A₂₈₀ se toman al principio y al final del intercambio.

A continuación se lleva a cabo una cromatografía de interacción hidrófoba con Phenyl-Sepharose (Pharmacia). Se prepara una columna de Phenyl-Sepharose (PS) (176 L de resina, H= 35 cm, D= 80 cm). La columna se equilibra con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 M, sulfato de amonio 0,5 M, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. Al producto eluido de proteína anterior se le añade un suplemento de sulfato de amonio 2M, fosfato de potasio 1 M y disoluciones de partida de CaCl₂ 1 M para proporcionar concentraciones finales 5 mM, 0,5 M y 0,1 mM, respectivamente. La proteína se carga en la columna PS a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. Se añadieron fosfato de potasio 5 M, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl₂ 0,1 mM a pH 7,0 a 100 cm/hr. El flujo directo se hizo pasar a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril. Se toman muestras del flujo directo para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Se prepara una columna de aminofenilboronato (ProMedics; 176 L de resina, H= 35 cm, D= 80 cm). La columna se equilibra con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 M, sulfato de amonio 0,5 M. La proteína purificada en PS se carga en la columna de aminofenilboronato a una velocidad de flujo de 50 cm/hr. La velocidad de flujo se incrementa a 100 cm/hr durante el resto del procedimiento. La columna se lava primero con fosfato de potasio 5 M, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0, a continuación bicina 20 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 9,0, y a continuación bicina 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 9,0. La proteína se eluye con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 6,9 y se hace pasar a través de un filtro estéril a una bolsa estéril. La muestra eluida se somete a ensayo para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Se prepara la columna de hidroxiapatita (HAP) (BioRad; 116 L de resina, H=23 cm, D= 80 cm). La columna se equilibra con fosfato de potasio 5 M, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. A la proteína purificada con aminofenilboronato se le añade un suplemento a concentraciones finales de fosfato de potasio 5 M y CaCl₂ 0,1 mM y se carga en la columna HAP a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lava primero con fosfato de potasio 5 M, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM, a continuación fosfato de potasio 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM. La proteína se evalúa con fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 y se hace pasar a través de un filtro estéril de 0,22 µm a una bolsa estéril. La muestra eluida se somete a ensayo para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

La proteína purificada mediante HAP se hace pasar después a través de un filtro para eliminación de virus. El filtro Virosart (Sartorius) esterilizado se prepara en primer lugar lavando con 2 L de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0. La proteína purificada mediante HAP se bombea a través de una bomba peristáltica a través del filtro para eliminación de virus de 20 nM. La proteína filtrada en fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 se hace pasar a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril. La muestra filtrada de virus se somete a ensayo para determinar el perfil de concentración de proteína, actividad enzimática, oligosacáridos, monosacáridos y ácido siálico (como se describe en los Ejemplos 9 a 10, más abajo).

La proteína en el producto filtrado se concentró a continuación 8-12x utilizando tres casetes Sartocon PES con un peso molecular de corte (MWCO) de 10 kD, cada uno con un área de superficie del filtro de 0,7 m² para un área de superficie total de 2,1 m². Después de la concentración, se tomaron muestras de la proteína concentrada y se sometieron a ensayo para determinar la concentración de proteína y la actividad enzimática. A continuación se realiza una diafiltración 10x sobre la proteína concentrada. Esto se puede realizar de dos maneras: 1) utilizando un tampón de histidina 20 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5 y polisorbato 80; o 2) utilizando un tampón de histidina 10 mM,

NaCl 130 mM, pH 6,5. La proteína a granel sometida a diafiltración, concentrada se encuentra a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml. Después del cambio de tampón, la proteína concentrada se hace pasar a través de un filtro de 0,22 µm a una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L.

- 5 La proteína a granel filtrada en condiciones estériles se dispensa asépticamente a 400 mL a botellas PFA Nalgene estériles de 1 L. Las botellas se someten a continuación a congelación instantánea y se almacenaron a -20°C para determinar la proteína a granel que no contiene el polisorbato 80, y a menos de -70°C para la proteína a granel que contiene el polisorbato 80.
- 10 La Tabla 29 muestra algunas diferencias ilustrativas entre la producción de rHuPH20 en un biorreactor de cultivo de 300 L y 2500 L

Tabla 29. Diferencias ilustrativas entre la producción de rHuPH20 en un biorreactor de cultivo de 300 L y 2500 L

Diferencia en el Procedimiento	Cultivo celular de 300 L	Cultivo celular de 2500 L
Línea celular	2B2	2B2
Medios utilizados para expandir el inóculo celular	Contiene metotrexato 20 M (9 mg/L)	Contiene metotrexato 20 M (9 mg/L)
Expansión celular	Expandido a través de un matraz de 125 mL, un matraz de 250 mL, un matraz de 1 L, un matraz de 6 L y un matraz de 36 L.	Expandido a través de un matraz de 125 mL, un matraz de 250 mL, un matraz de 1 L, 2 matraces de agitación de 2 L, 6 matraces de agitación de 2 L, un WAVE Bioreactor™ de 25 L, un WAVE Bioreactor™ de 100 L y un biorreactor de siembra de tanque agitado de 600 L
Volumen de operación final en el biorreactor	Aprox. 300L en un biorreactor de 400L	Aprox. 2500 L en un biorreactor de 3500 L
Medios de cultivo en el momento de la inoculación en el biorreactor	CD CHO con 5,0 mg/L de rHuInsulina	CD CHO AGT™ con 5,0 mg/L de rHuInsulina
	40 ml/L (8 mM)	40 ml/L (8 mM)
	GlutaMAX™-I	GlutaMAX™-I
Volumen de medios de alimentación	Aumento a 4% del volumen de cultivo celular del biorreactor es decir, aproximadamente 10,4, 10,8, 11,2 y 11,7 L, lo que resulta en un volumen de biorreactor objetivo de ~ 300 L.	Aumento a 4% del volumen de cultivo celular del biorreactor es decir, aproximadamente 84, 87, 91, y 94 L, lo que resulta en un volumen de biorreactor objetivo de ~ 2500 L.
Medios de Alimentación	Medio de Alimentación Núm. 1: 4 x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + 32 mM GlutaMAX™-I + 16. 6 g/L de Yeastolate + 33 mg/L de rHuInsulina	Medio de Alimentación Núm. 1: 81 g/L de CD-CHO AGT™ en polvo + 33 g/L de Glucosa + 26,6 mM GlutaMAX™-I + 83. 3 g/L de Yeastolate + 33 mg/L de rHuInsulina
	Alimentación Núm. 2: 2x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + GlutaMAX™-I 16 mM + 33,4 g/L de Yeastolate + 0,92 g/L de Butirato de Sodio	Alimentación Núm. 2: 40,5 g/L CD-CHO AGT™ en polvo + 33 g/L de Glucosa + GlutaMAX™-I 13,4 mM + 166,7 g/L de Yeastolate + 0,92 g/L de Butirato de Sodio
	Alimentación Núm. 3: 1 x CD CHO + 50 g/L de Glucosa + GlutaMAX™-I 10 mM + 50 g/L de Yeastolate + 1,80 g/L de Butirato de Sodio	Alimentación Núm. 3: 20,3 g/L CD-CHO AGT™ en polvo + 50 g/L de Glucosa + GlutaMAX™-I 10 mM + 250 g/L de Yeastolate + 1,8 g/L de Butirato de Sodio
	Alimentación Núm. 4: 1 x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + 6,7 mM GlutaMAX™-I + 50 g/L de Yeastolate + 0,92 g/L de Butirato de Sodio	Alimentación Núm. 4: 20,3 g/L CD-CHO AGT™ en polvo + 33,3 g/L de Glucosa + GlutaMAX™-I 6,7 mM + 250 g/L de Yeastolate + 0,92 g/L de

ES 2 537 340 T3

Diferencia en el Procedimiento	Cultivo celular de 300 L	Cultivo celular de 2500 L
		Butirato de Sodio
Filtración del cultivo celular del biorreactor	1ª fase - 4 módulos en paralelo, cada uno con una capa de tierra de diatomeas graduada a 4-8 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a 1,4-1,1 µm, seguido de una membrana de celulosa.	1ª fase - 20 módulos en paralelo, cada uno con una capa de tierra de diatomeas graduada a 4-8 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a 1,4-1,1 µm, seguido de una membrana de celulosa.
	2ª fase un solo módulo que contiene una capa de tierra de diatomeas graduada a 0,4-0,11 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a <0,1 µm, seguido de una membrana de celulosa.	2ª fase -10 módulos que contienen una capa de tierra de diatomeas graduada a 0,4-0,11 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a <0,1 micras, seguido de una membrana de celulosa.
	3ª fase - filtro de polietersulfona de 0,22 µm	3ª fase - filtro de polietersulfona de 0,22 µm
	Bolsa de almacenamiento de 300 L	Bolsa de almacenamiento de 350 L
Concentración y cambio de tampón antes de la cromatografía	Producto concentrado utilizando cuatro Filtro Sartorius Sartoslice TFF con MWCO de 30 K	Producto concentrado con 2 TFF con Filtros de Polietersulfona espiral Millipore con MWCO de 30K
	Cambio de tampón del producto concentrado 10 veces con Tris 10 mM, Na2SO4 20 mM, pH 7,5	Cambio de tampón del producto concentrado 6 veces con Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
	bolsa de almacenamiento estéril de 50L	bolsa de almacenamiento estéril de 20L
Columna Sepharose Q	9 L de resina, H = 29 cm, D = 20 cm	81 L de resina, H = 26 cm, D = 63 cm
Una columna Phenyl Sepharose (PS)	19-21 L de resina, H = 29 cm, D = 30 cm	176 de resina L, H = 35 cm, D = 80 cm
columna de aminofenilboronato	21 L de resina, H = 29 cm, D = 30 cm	176 de resina L, H = 35 cm, D = 80 cm
columna de hidroxapatita (HAP)	13 L de resina, H = 20 cm, D = 30 cm	116 L de resina, H = 23 cm, D = 80 cm
Concentración de proteínas	una sola filtración de flujo tangencial (TFF) Sartocon Slice con MWCO de 10 kDa	Tres casetes Sartocon PES con corte de peso molecular (MWCO) de 10 kD
	6 x cambio de tampón con histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0	10x diafiltración con: 1) tampón histidina 20 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5 y polisorbato 80 al 1%; o 2) tampón histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5.
Carga del Vial	volúmenes de carga de 20 mL	volúmenes de carga de 400 mL
	Almacenado a ≤20°C	Almacenado a ≤20°C si la proteína no contiene polisorbato 80 o ≤70°C si la proteína contiene polisorbato 80

Dado que las modificaciones serán evidentes para los expertos en esta técnica, se pretende que esta invención esté limitada solamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Halozyme, Inc. Baker, David Bookbinder, Louis
 <120> PRODUCCION DE GRAN ESCALA DE HIALURONIDASA SOLUBLE
 <130> 0119374-00094/3057PC
 5 <140> No cedido todavía
 <141> Adjunto
 <150> 61/068.622
 <151> 2008-03-06
 <160> 71
 10 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 <210> 1
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <220>
 <223> precursor de PH20 humana
 <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

ES 2 537 340 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 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> 2

<211> 474

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 madura

<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

10

ES 2 537 340 T3

```

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

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> precursor rHuPH20 soluble

<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

```


ES 2 537 340 T3

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

<210> 4

<211> 447

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-447

<400> 4

ES 2 537 340 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	
435					440						445				

<210> 5

<211> 446

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-446

<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
 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

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-445

<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

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-444

<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
          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
          435          440

```

<210> 8

<211> 443

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-443

<400> 8

```

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

<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

```

<210> 10

<211> 450

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<223> hialuronidasa

<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
Trp Leu Ala Pro Arg Val Glu Ala Ala Ala Gln Asp Gln Phe Glu Gly
          180          185          190
Ala Ala 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 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> 331

<212> PRT

<213> *Vespula vulgaris*

<220>

ES 2 537 340 T3

<223> hialuronidasa A

<400> 11

```

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      25      30
Asn Ile Lys Arg Asn Ser Lys Asp Asp Phe Gln Gly Asp Lys Ile Ala
      35      40      45
Ile Phe Tyr Asp Pro Gly Glu Phe Pro Ala Leu Leu Ser Leu Lys Asp
      50      55      60
Gly Lys Tyr Lys Lys Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln Glu Gly Asn Ile
65      70      75      80
Thr Ile His Leu Gln Lys Phe Ile Glu Asn Leu Asp Lys Ile Tyr Pro
      85      90      95
Asn Arg Asn Phe Ser Gly Ile Gly Val Ile Asp Phe Glu Arg Trp Arg
      100      105      110
Pro Ile Phe Arg Gln Asn Trp Gly Asn Met Lys Ile His Lys Asn Phe
      115      120      125
Ser Ile Asp Leu Val Arg Asn Glu His Pro Thr Trp Asn Lys Lys Met
130      135      140
Ile Glu Leu Glu Ala Ser Lys Arg Phe Glu Lys Tyr Ala Arg Phe 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 Glu Cys Asp Val Thr Ala Met His Glu Asn Asp Lys Met
195      200      205
Ser Trp Leu Phe Asn Asn Gln Asn Val Leu Leu Pro Ser Val Tyr Val
210      215      220
Arg Gln Glu Leu Thr Pro Asp Gln Arg Ile 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 Glu Thr Asn Thr Phe
260      265      270
Leu Thr Glu Thr Asp Val Lys Lys Thr Phe Gln Glu Ile Val 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 Gln Asp Tyr Leu Leu Thr Val Leu Gly
305      310      315      320
Pro Ile Ala Ile Asn Val Thr Glu Ala Val Asn
      325      330

```

5

<210> 12

<211> 340

<212> PRT

<213> *Vespula vulgaris*

<220>

10

<223> hialuronidasa B

<400> 12

ES 2 537 340 T3

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					25					30		
Gln	Phe	Asn	Ile	Lys	Tyr	Asn	Ser	Met	Asn	Asn	Phe	Arg	Gly	Glu	Thr
		35					40					45			
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> 13

<211> 382

<212> PRT

<213> Apis mellifera

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 13

ES 2 537 340 T3

```

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> 14

<211> 331

<212> PRT

<213> Dolichovespula maculata

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 14

ES 2 537 340 T3

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 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> 15

<211> 367

<212> PRT

<213> Polistes annularis

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 15

ES 2 537 340 T3

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					160
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					240
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					320
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> 16

<211> 462

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 16

ES 2 537 340 T3

```

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      170      175
Gln Arg Ser Met Glu Leu Val Gln Ala Glu His Pro Asp Trp Pro Glu
 180      185      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      345      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      425      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> 17

<211> 473

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Hialuronidasa 2

<400> 17

Met Arg Ala Gly Leu Gly Pro Ile Ile Thr Leu Ala Leu Val Leu Glu
 1 5 10 15
 Val Ala Trp Ala Gly 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 Lys 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 Thr 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 Ser Val Glu Arg Tyr Ile Gln Thr Gln Glu Pro Gly 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 Val Met 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 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 Val His Ser Arg Asn Phe Val Ser Phe Arg Val
 260 265 270
 Arg 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 Gly Leu Thr Gly
 290 295 300
 Leu Ser Gln Val 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 Glu Asp Ala Ser Ser
 325 330 335
 Met Glu Thr Cys Gln Tyr Leu Lys Asn Tyr Leu Thr Gln Leu 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 Asn
 370 375 380
 Thr Phe Leu His Leu Asn Ala Ser Ser Phe Arg Leu Val Pro Gly His
 385 390 395 400
 Thr Pro Ser Glu Pro Gln Leu Arg Pro Glu Gly Gln Leu Ser Glu Ala
 405 410 415
 Asp Leu Asn Tyr Leu Gln Lys His Phe Arg Cys Gln Cys Tyr Leu Gly
 420 425 430
 Trp Gly Gly Glu Gln Cys Gln Arg Asn Tyr Lys Gly Ala Ala Gly Asn
 435 440 445
 Ala Ser Arg Ala Trp Ala Gly Ser His Leu Thr Ser Leu Leu Gly Leu
 450 455 460
 Val Ala Val Ala Leu Thr Trp Thr Leu
 465 470

<210> 18

<211> 412

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> hialuronidasa 3

<400> 18

```

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 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

```

<210> 19

<211> 435

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 19

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

<210> 20

<211> 419

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<220>

<223> hialuronidasa 3

ES 2 537 340 T3

<400> 20

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

100 105 110
 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

5

<210> 21

<211> 449

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

10

<223> hialuronidasa 1

<400> 21

ES 2 537 340 T3

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> 22

<211> 473

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<223> hialuronidasa 2

<400> 22

```

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> 23

<211> 412

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<223> hialuronidasa 3

<400> 23

```

Met Ile Thr Gln Leu Gly Leu Thr Leu Val Val Gly Leu Thr Leu Cys
 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
 50           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
      100          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
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

```

5

<210> 24

<211> 545

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<220>

10

<223> PH20

<400> 24

ES 2 537 340 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

ES 2 537 340 T3

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
 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> 25

<211> 476

<212> PRT

<213> Ovis aries

<220>

<223> hialuronidasa 2

<400> 25

Met Trp Thr Gly Leu Gly Pro Ala Val Thr Leu Ala Leu Val Leu Val
 1 5 10 15
 Val Ala Trp Ala Thr 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 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

5

10

ES 2 537 340 T3

```

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 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

```

<210> 26

<211> 414

<212> PRT

<213> Pongo pygmaeus

<220>

<223> hialuronidasa 3

<400> 26

```

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      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 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

```


ES 2 537 340 T3

```

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
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
Leu Ser Ser Ser 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

```

<210> 27

<211> 510

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<220>

<223> PH20

<400> 27

```

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

```

ES 2 537 340 T3

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> 28

<211> 529

<212> PRT

<213> Cavia porcellus

<220>

<223> PH20

<400> 28

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

ES 2 537 340 T3

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 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 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
 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> 29

<211> 512

<212> PRT

ES 2 537 340 T3

<213> Rattus norvegicus

<220>

<223> PH20

<400> 29

```

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
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 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

```

ES 2 537 340 T3

```

      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> 30

<211> 512

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> PH20

<400> 30

```

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 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

```

5

10

ES 2 537 340 T3

```

                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> 31

<211> 807

<212> PRT

5

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 31

```

Met Thr Tyr Arg Ile Lys Lys Trp Gln Lys Leu Ser Thr Ile Thr Leu
1      5      10
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

```

10

ES 2 537 340 T3

145					150					155				160
Asp	Lys	Lys	Val	Lys	Glu	Leu	Ser	Glu	Asn	Phe	Thr	Lys	Thr	Thr
				165					170					175
Lys	Asn	Thr	Asn	Leu	Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly	Thr	Pro
			180						185				190	
Ser	Leu	Thr	Asn	Thr	Leu	Ile	Leu	Leu	Asn	Asp	Gln	Phe	Ser	Asn
		195					200				205			
Glu	Lys	Lys	Lys	Phe	Thr	Ala	Pro	Ile	Lys	Thr	Phe	Ala	Pro	Asp
	210				215						220			
Asp	Lys	Ile	Leu	Ser	Ser	Val	Gly	Lys	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Gly
225					230					235				240
Asn	Leu	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Cys	Ile	Ile
			245						250					255
Glu	Asp	Lys	Asp	Met	Met	Lys	Lys	Ser	Ile	Asp	Ser	Phe	Asn	Lys
			260					265					270	
Phe	Thr	Tyr	Val	Gln	Asp	Ser	Ala	Thr	Gly	Lys	Glu	Arg	Asn	Gly
	275						280					285		
Tyr	Lys	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ile	Asp	His	Gln	Asp	Val	Pro	Tyr	Thr
	290				295						300			
Ala	Tyr	Gly	Val	Val	Leu	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser	Gln	Met	Met	Pro
305					310					315				320
Ile	Lys	Glu	Thr	Pro	Phe	Asn	Asp	Lys	Thr	Gln	Asn	Asp	Thr	Thr
			325						330					335
Lys	Ser	Trp	Ile	Asp	Asp	Gly	Phe	Met	Pro	Leu	Ile	Tyr	Lys	Gly
			340				345						350	
Met	Met	Asp	Leu	Ser	Arg	Gly	Arg	Ala	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Glu
		355					360					365		
Ser	His	Ser	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Met	Lys	Ser	Leu	Leu	Arg	Leu
	370					375				380				
Asp	Ala	Met	Asp	Asp	Ser	Thr	Lys	Ala	Lys	Tyr	Lys	Lys	Ile	Val
385					390					395				400
Ser	Ser	Val	Glu	Ser	Asp	Ser	Ser	Tyr	Lys	Gln	Asn	Asp	Tyr	Leu
			405						410					415
Ser	Tyr	Ser	Asp	Ile	Asp	Lys	Met	Lys	Ser	Leu	Met	Thr	Asp	Asn
			420					425					430	
Ile	Ser	Lys	Asn	Gly	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Lys	Ile	Tyr	Asn	Asp
		435					440					445		
Asp	Arg	Val	Thr	Tyr	His	Asn	Lys	Asp	Leu	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly
	450					455					460			
Ser	Met	Thr	Ser	Lys	Asn	Val	Ala	Arg	Tyr	Glu	Ser	Ile	Asn	Gly
465					470					475				480
Asn	Leu	Lys	Gly	Trp	His	Thr	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	Tyr
			485						490					495
Ser	Asp	Val	Lys	His	Tyr	His	Asp	Asn	Phe	Trp	Val	Thr	Ala	Asp
			500					505					510	
Lys	Arg	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Leu	Asp	Asn	Glu	Ile	Leu	Lys
		515					520					525		
Thr	Asp	Asp	Lys	Lys	Ser	Ser	Lys	Thr	Phe	Val	Gly	Gly	Thr	Lys
	530					535					540			
Asp	Asp	Gln	His	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Asp	Phe	Glu	Asn	Gln	Asp
545					550					555				560
Thr	Leu	Thr	Ala	Lys	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ile	Leu	Asn	Asp	Lys	Ile
				565					570					575
Phe	Leu	Gly	Thr	Gly	Ile	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Pro
			580					585					590	
Thr	Thr	Ile	Glu	Asn	Arg	Lys	Ala	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Thr
		595					600					605		
Asp	Lys	Gln	Thr	Thr	Asn	Ser	Asp	Asn	Gln	Glu	Asn	Asn	Ser	Val
	610					615					620			
Leu	Glu	Ser	Thr	Asp	Thr	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	His	Phe	Leu
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> 32

<211> 371

<212> PRT'

5 <213> bacteriófago H4489A de Streptococcus pyogenes

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 32

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

10

ES 2 537 340 T3

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> 33

<211> 1628

<212> PRT

<213> Clostridium perfringens

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 33

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

ES 2 537 340 T3

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	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		

ES 2 537 340 T3

[illegible]

ES 2 537 340 T3

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> 34

<211> 435

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hialuronidasa-1 [Precursor]

<400> 34

ES 2 537 340 T3

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> 35

<211> 473

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hialuronidasa-2 [Precursor]

<400> 35

ES 2 537 340 T3

```

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> 36

<211> 417

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hialuronidasa-3 [Precursor]

<400> 36

```

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
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> 37

<211> 481

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hialuronidasa-4

<400> 37

```

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
      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
      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 Ala Ser Tyr Arg Ser Ile Gln
 465      470      475      480
Leu

```

<210> 38

<211> 467

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> precursor de sHuPH20 1-467

<400> 38

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 2 537 340 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              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
465

```

<210> 39

<211> 477

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> precursor de sHuPH20 1-477

<400> 39

```

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

```

ES 2 537 340 T3

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
 465 470 475

<210> 40

<211> 478

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> precursor de sHuPH20 1-478

<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

ES 2 537 340 T3

	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						

<210> 41

<211> 479

<212> PRT

<213> Homo sapiens

$\langle 220 \rangle$

<223> precursor de sHuPH20 1-479

<400> 41

ES 2 537 340 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
465      470      475

```

<210> 42

<211> 480

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> precursor de sHuPH20 1-480

<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
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

5

<210> 43

<211> 481

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> precursor de sHuPH20 1-481

<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 Ile
465 470 475 480
Phe

5
 <210> 44
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223> precursor de sHuPH20 1-483

<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	
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

ES 2 537 340 T3

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

<210> 45

<211> 432

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<220>

<223> sHuPH20 madura 36-467

<400> 45

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

10

ES 2 537 340 T3

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

<210> 46

<211> 448

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<220>

<223> sHuPH20 madura 36-483

<400> 46

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15

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			

<210> 47

<211> 1446

<212> DNA

5

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ADN que codifica "precursor" de rHuPH20 soluble

<400> 47

```

atgggagtg c taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaa gtaattttgt 180
cttggaatat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttgggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg cacttgagaa agcaaaaacaa gaatttgaaa aggcaggga ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttggtggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttggtga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttggtgtata catttgcgga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctacagacca aaatgtgtag ccaagtgtt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctac 1446

```

<210> 48

<211> 509

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> variante P48A de PH20

<400> 48

```

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 Ala
 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

```

ES 2 537 340 T3

Val	Gln	Leu	Ser	165	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	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								

<210> 49

<211> 509

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> precursor de variante L499W de PH20

<400> 49

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			

ES 2 537 340 T3

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> 50

<211> 6630

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> vector HZ24

<400> 50

tcaatattgg	ccattagcca	tattattcat	tggttatata	gcataaatca	atattggcta	60
ttggccattg	catacgttgt	atctatatca	taatatgtac	atattatattg	gctcatgtcc	120
aatatgaccg	ccatgttggc	attgattatt	gactagtatt	taatagtaat	caattacggg	180
gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	240
gcctggctga	ccgccaacg	acccccgcc	attgacgtca	ataatgacgt	atgttcccat	300
agtaacgcca	atagggactt	tccattgacg	tcaatgggtg	gagtatttac	ggtaaactgc	360
ccacttggca	gtacatcaag	tgtatcatat	gccaaagtccg	ccccctattg	acgtcaatga	420
cggtaaatgg	ccgcctggc	attatgcccc	gtacatgacc	ttacgggact	ttcctacttg	480
gcagtacatc	tacgtattag	tcacgcgtat	taccatggtg	atgcggtttt	ggcagtacac	540
caatgggcgt	ggatagcggg	ttgactcacg	gggatttcca	agtctccacc	ccattgacgt	600
caatgggagt	ttgttttggc	acaaaaatca	acgggacttt	ccaaaaatgc	gtaataacc	660
cgccccgttg	acgcaaatgg	gcggtaggcg	tgtacggtgg	gaggtctata	taagcagagc	720
tcgttttagtg	aaccgtcaga	tcactagaag	ctttattgctg	gtagtattac	acagttaaat	780
tgctaacgca	gtcagtgtct	ctgacacaac	agtctcgaac	ttaagctgca	gaagtgtggtc	840
gtgaggcact	gggcaggtaa	gtatcaaggt	tacaagacag	gtttaaggag	accaatagaa	900
actgggcttg	tcgagacaga	gaagactctt	gcgtttctga	taggcaccta	ttggtcttac	960
tgacatccac	tttgcccttc	tctccacagg	tgtccactcc	cagttcaatt	acagctctta	1020
aggctagagt	acttaatacg	actcactata	ggctagcatg	ggagtgtctaa	aattcaagca	1080
catctttttc	agaagctttg	ttaaatacaag	tggagtatcc	cagatagttt	tcaccttctt	1140
tctgattcca	tggtgcttga	ctctgaattt	cagagcacct	cctgttattc	caaatgtgcc	1200
tttctctctg	gcctggaatg	cccccaagtga	attttgtctt	ggaaaatttg	atgagccact	1260
agatattgagc	ctcttctctt	tcaataggaag	ccccgaata	aacgccaccg	ggcaagggtg	1320
tacaatattt	tatgttgata	gacttggcta	ctatccttac	atagattcaa	tcacaggagt	1380
aactgtgaat	ggaggaatcc	cccagaagat	ttccttacia	gaccatctgg	acaaagctaa	1440
gaaagacatt	acattttata	tgccagtaga	caatttggga	atggctgtta	ttgactggga	1500
agaatggaga	cccacttggg	caagaaactg	gaaacctaaa	gatgtttaca	agaatagggtc	1560
tattgaattg	gttcagcaac	aaaatgtaca	acttagtctc	acagaggcca	ctgagaaagc	1620
aaaacaagaa	tttgaagg	cagggaagga	tttctctgta	gagactataa	aattgggaaa	1680
attacttcgg	ccaaatcact	tgtgggggta	ttatcttttt	ccggattgtt	acaaccatca	1740
ctataagaaa	cccgtttaca	atggaagtgt	cttcaatgta	gaaataaaaa	gaaatgatga	1800
tctcagctgg	ttgtggaatg	aaagcactgc	tctttaccca	tccatttatt	tgaacactca	1860
gcagtctcct	gtagctgcta	cactctatgt	gcgcaatcga	gttcgggaag	ccatcagagt	1920
ttccaaaata	ccctgatgca	aaagtccact	tccgggtttt	gcataataccc	gcatagtttt	1980
tactgatcaa	gttttgaaat	tcctttctca	agatgaactt	gtgtatacat	ttggcgaaac	2040
tggtgctctg	ggtgcttctg	gaattgtaat	atggggaaac	ctcagtataa	tgcgaggtat	2100
gaaatcttgc	ttgtctctag	acaattacat	ggagactata	ctgaatcctt	acataatcaa	2160
cgtcacacta	gcagccaaaa	tgtgtagcca	agtgccttgc	caggagcaag	gagtgtgtat	2220
aaggaaaaac	tgggaattcaa	gtgactatct	tcacctcaac	ccagataatt	ttgctattca	2280
acttgagaaa	ggtggaaagt	tcacagtacg	tggaaaaccg	acacttgaag	acctggagca	2340
atcttctgaa	aaattttatt	gcagctgtta	tagcaccttg	agttgttaagg	agaaagctga	2400
tgtaaaagac	actgatgctg	ttgatgtgtg	tattgtctgat	ggtgtctgta	tagatgcttt	2460
tctaaaacct	cccattggaga	cagaagaacc	tcaaattttc	tactgaggat	ccatagctaa	2520
cgcccccttc	ccctcccccc	ccctaactgt	actggccgaa	gcccgttgga	ataaggccgg	2580
tgtgcgtttg	tctatatgtt	attttccacc	atattgccgt	cttttgccaa	tgtgagggcc	2640
cggaaacctg	gccctgtctt	cttgacgagc	attcctaggg	gtctttcccc	tctcgccaaa	2700
ggaatgcaag	gtctgttgaa	tgtcgtgaag	gaagcagttc	ctctggaagc	ttcttgaaga	2760
caaacaacgt	ctgtagcgac	cctttgcagg	cagcgggaac	ccccacctgg	cgacaggtgc	2820
ctctgcggcc	aaaagccacg	tgtataagat	acacctgcaa	aggcggcaca	accccgatgc	2880
cacgttgtga	gttgataggt	tgtggaaaga	gtcaaatggc	tctcctcaag	cgtattcaac	2940
aaggggctga	aggatgccc	gaaggtaccc	cattgtatgg	gatctgatct	ggggcctcgg	3000
tgcacatgct	ttacatgtgt	ttagtgcagg	ttaaaaaaac	gtctaggccc	cccgaaacc	3060
ggggacgtgg	ttttcctttg	aaaaacacga	tgataagctt	gccacaaccc	acagcgccg	3120
ctgccatcat	ggttcgacca	ttgaactgca	tgcgcgcgt	gtcccaaat	atggggattg	3180

gcaagaacgg	agacctaccc	tggcctccgc	tcaggaacga	gttcaagtac	ttccaaagaa	3240
tgaccacaac	ctcttcagtg	gaaggtaaac	agaatctggt	gattatgggt	aggaaaacct	3300
ggttctccat	tcctgagaag	aatcgacctt	taaaggacag	aattaatata	gttctcagta	3360
gagaactcaa	agaaccacca	cgaggagctc	atcttcttgc	caaaagtttg	gatgatgcct	3420
taagacttat	tgaacaaccg	gaattggcaa	gtaaagtaga	catggtttgg	atagtcggag	3480
gcagttctgt	ttaccaggaa	gccatgaatc	aaccaggcca	cctcagactc	tttgtgacaa	3540
ggatcatgca	ggaatttgaa	agtgcacagt	ttttcccgag	aattgatttg	gggaaatata	3600
aacttctccc	agaataccca	ggcgtcctct	ctgaggtcca	ggaggaaaaa	ggcatcaagt	3660
ataagtttga	agtctacgag	aagaaagact	aaacgcgtgg	tacctctaga	gtcgaccccg	3720
gcgggccgct	cgagcagaca	tgataagata	cattgatgag	tttggacaaa	ccacaactag	3780
aatgcagtg	aaaaaatgct	ttatttgtga	aatttgtgat	gctattgctt	tatttgtaac	3840
cattataagc	tgcaataaac	aagttaacaa	caacaattgc	attcatttta	tgtttcaggt	3900
tcagggggag	atgtgggagg	ttttttaaag	caagtaaaac	ctctacaaat	gtggtaaaaat	3960
cgataaggat	ccgggctggc	gtaatagcga	agaggcccg	accgatcgcc	cttcccaaca	4020
gttgccgagc	ctgaatggcg	aatggacgcg	ccctgtagcg	gcgcattaag	cgcgccgggt	4080
gtgggtggtt	cgcgagcggt	gaccgctaca	cttgccagcg	ccctagcgcc	cgctcctttc	4140
gctttcttcc	cttcccttct	cgccacgttc	gcgggcttcc	cccgtaagc	tctaatactg	4200
gggctccctt	taggggttccg	atttagtgct	ttacggcacc	tcgaccccaa	aaaacttgat	4260
taggggtgat	gttcacgtag	tgggccatcg	ccctgataga	cggtttttcg	ccctttgacg	4320
ttggagtcca	cgttctttta	tagtggactc	ttgttccaaa	ctggaacaa	actcaaccct	4380
atctcggctc	attcttttga	tttataaggg	atcttgccga	tttcggccta	ttggttaaaa	4440
aatgagctga	tttaacaaaa	atttaacgcg	aattttaaca	aaatattaac	gcttacaatt	4500
tcctgatgcg	gtattttctc	cttacgcctc	tggtgcggtat	ttcacaccgc	atatggtgca	4560
ctctcagtag	aatctgctct	gatgcgcgat	agtttaagca	gccccgacac	ccgccaacac	4620
ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcgccgcatc	cgcttacaga	caagctgtga	4680
ccgtctccgg	gagctgcatg	tgctcagaggt	tttcaccgtc	atcaccgaaa	cgcgcgagac	4740
gaaaggccct	cgtgatacgc	ctatttttat	aggttaagt	catgataata	atggtttctt	4800
agacgtcagg	tggtcactttt	cggggaaatg	tgcgcggaac	ccctatttgt	ttatttttct	4860
aaatacattc	aaatatgtat	ccgctcatga	gacaataaac	ctgataaatg	cttcaataat	4920
attgaaaaag	gaagagtatg	agtattcaac	atctccgtgt	cgcccttatt	cccttttttg	4980
cggtcattttg	ccttcctggt	tttgcctcac	cagaaacgct	ggtgaaagta	aaagatgctg	5040
aagatcagtt	gggtgcacga	gtgggttaca	tcgaactgga	tctcaacagc	ggtaaagatcc	5100
ttgagagttt	tcgccccgaa	gaacgttttc	caatgatgag	cactttttaa	gttctgctat	5160
gtggcgcggt	attatcccg	attgacgcgc	ggcaagagca	actcggtcgc	cgcatacact	5220
attctcagaa	tgacttggtt	gagtactcac	cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	5280
tgacagtaag	agaattatgc	agtgtgcga	taacctagag	tgataaacat	gcggccaact	5340
tacttctgac	aacgatcgga	ggaccgaagg	agctaaccgc	ttttttgcac	aacatggggg	5400
atcatgtaac	tcgccttgat	cggtgggaac	cggtgctgaa	tgaagccata	ccaaacgacg	5460
agcgtgacac	cacgatgcct	gtagcaatgg	caacaacgtt	gcgcaacta	ttacttgccg	5520
aactacttac	tctagcttcc	cggaacaact	taatagactg	gatggaggcg	gataaagttg	5580
caggaccact	tctgcgctcg	gcccttccgg	ctggctggtt	tattgctgat	aaatctggag	5640
ccgggtgagcg	tggttctcgc	ggtatcattg	cagcactggg	gccagatggg	aagccctccc	5700
gtatcgtagt	tatctacacg	acggggagtc	aggcaactat	ggatgaacga	aatagacaga	5760
tcgctgagat	aggtgcctca	ctgattaagc	attggttaact	gtcagaccaa	gtttactcat	5820
atatacttta	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	agcaccgcct	acatacctcg	6180
ctctgctaag	cctgtttacca	gtggctgctg	ccagtggcga	taagtcgtgt	cttaccgggt	6240
tggtacaaag	aggatagtta	cggtgataag	cgagcggtc	gggctgaacg	gggggttcgt	6300
gcacacagcc	cagcttggag	cgaacgacct	acaccgaact	gagataccta	cagcgtgagc	6360
tatgagaaa	cgccacgctt	cccgaaggga	gaaaggcgga	caggtatccg	gtaagcgcca	6420
gggtcggaac	aggagagcgc	acgagggagc	ttccaggggg	aaacgcctgg	tatctttata	6480
gtcctgtcgg	gtttcgccac	ctctgacttg	agcgtcgatt	tttgtgatgc	tcgtcagggg	6540
ggcgagacct	atggaataac	gccagcaacg	cgcccttttt	acggttccctg	gccttttgct	6600
ggccttttgc	tcacatggct	cgacagatct				6630

<210> 51

<211> 186

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> dihidrofolato reductasa

ES 2 537 340 T3

<400> 51

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

<210> 52

<211> 23

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador directo HZM3.P1

<400> 52

10

tttgaacct cagcagtctc ctg

23

<210> 53

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> cebador inverso HZM3.P2

<400> 53

aactctgatg gcttcccgaa

20

<210> 54

20

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sonda HZM3

25

<400> 54

agctgctaca ctctatgtgc gcaatcga

28

<210> 55

<211> 1449

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> secuencia de ARNm de PH20 de células 3D35M

<400> 55

```

atgggagtgcc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaata aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgcccagaag tgaattttgt 180
cttggaataa ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttggt ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc acaaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatcct 660
tttcgggatt gttacaacca tcaactataag aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tgggttggtg atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agttttccaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggt 900
tttgcataata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag tcaagtgtct 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatgtgtctt gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctactga                                     1449

```

5

<210> 56

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AP01

<400> 56

ttctctccac aggtgtc 17

<210> 57

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AP02

<400> 57

aagatttcct tacaagac 18

<210> 58

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AP03

<400> 58

10

15

20

25

	tggcgagagg ggaaagac	18
	<210> 59	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> AP04	
	<400> 59	
	ccatttattt gaacactc	18
10	<210> 60	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> AP06	
	<400> 60	
	ccgaactcga ttgcgcac	18
	<210> 61	
	<211> 18	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> AP07	
	<400> 61	
25	agccattccc aaattgtc	18
	<210> 62	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> AP08	
	<400> 62	
	ctcccagttc aattacag	18
	<210> 63	
35	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> AP09	
40	<400> 63	
	cgtagctat ggcctc	18
	<210> 64	
	<211> 22	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> AP10
 5 <400> 64
 cgagacagag aagactcttg cg 22
 <210> 65
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> AP12
 <400> 65
 cattcaacag acctgcatt cc 22
 15 <210> 66
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 20 <223> péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-447
 <400> 66
 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
 1 5 10 15
 Tyr
 <210> 67
 <211> 16
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-446
 <400> 67
 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
 30 1 5 10 15
 <210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <220>
 <223> péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-445
 <400> 68
 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 1 5 10 15
 <210> 69
 40 <211> 14

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-444
 5 <400> 69
 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln
 1 5 10
 <210> 70
 <211> 13
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-443
 <400> 70
 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
 1 5 10
 15 <210> 71
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 20 <223> péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-442
 <400> 71
 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu
 1 5 10

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir rHuPH20 soluble, en donde rHuPH20 soluble hace referencia a una forma soluble de PH20 humana (también conocida como proteína de superficie de espermatozoides PH20) que es expresada recombinalemente, por ejemplo, en células de Ovario de Hámster Chino (CHO), comprendiendo el método:
 - a) inocular medio celular en un biorreactor con un inóculo de células que codifican rHuPH20 soluble para producir un cultivo celular, en donde:
 - las células comprenden entre 150 y 300 copias de ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble;
 - el biorreactor contiene al menos 100 litros de cultivo celular;
 - se inoculan 10^{10} - 10^{11} células por 100 litros de cultivo celular; y
 - las células se cultivan a una temperatura de ajuste;
 - b) alimentar las células con un primer medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, insulina humana y extracto de levadura en cantidades suficientes para incrementar el crecimiento celular y la densidad celular máxima, y para incrementar la síntesis de rHuPH20 soluble, en donde el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 0,5% a 20% del volumen de cultivo celular;
 - c) alimentar las células con un segundo medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para incrementar la síntesis de rHuPH20 soluble e inducir la detención del ciclo celular; y
 - disminuir la temperatura en comparación con la temperatura de la etapa a) a una temperatura suficiente para incrementar la detección del ciclo celular, aumentar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble; en donde:
 - la cantidad de L-alanil-L-glutamina se reduce en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina de la etapa b);
 - la cantidad de extracto de levadura se incrementa en comparación con la cantidad de extracto de levadura de la etapa b); y
 - el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 0,5% a 20% del volumen de cultivo celular;
 - d) alimentar las células con un tercer medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para incrementar la síntesis de rHuPH20 soluble e incrementar la detención del ciclo celular, y
 - reducir la temperatura en comparación con la temperatura de la etapa c) a una temperatura suficiente para incrementar la detención del ciclo celular, aumentar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble; en donde:
 - la cantidad de L-alanil-L-glutamina se reduce en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina en la etapa c);
 - las cantidades de extracto de levadura, glucosa y butirato de sodio se incrementan en comparación con las cantidades de extracto de levadura, glucosa y butirato de sodio en la etapa c); y
 - el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 0,5% a 20% del volumen del cultivo celular;
 - e) alimentar las células con un cuarto medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para incrementar la síntesis de rHuPH20 soluble e incrementar la detención del ciclo celular, y
 - disminuir la temperatura en comparación con la temperatura en la etapa d) a una temperatura suficiente para incrementar la detención del ciclo celular, incrementar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble; en donde:
 - la cantidad de L-alanil-L-glutamina y glucosa se reducen en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina y glucosa de la etapa d);
 - la cantidad de butirato de sodio se reduce en comparación con la cantidad de butirato de sodio en la etapa d); y
 - el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 0,5% a 20% del volumen de cultivo celular;
 - f) continuar cultivando las células hasta que la viabilidad cae por debajo de al menos 50%;
 - g) obtener el líquido de cultivo de la cosecha; y
 - h) purificar la rHuPH20 del líquido de cultivo celular de la cosecha.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la temperatura en la etapa a) es de 37°C.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la temperatura en la etapa c) es de 36,5°C.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la temperatura en la etapa d) es de 36°C.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la temperatura en la etapa e) es de 35,5°C.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el líquido de cultivo celular de la cosecha se filtra antes de la purificación.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la purificación de rHuPH20 soluble se lleva a cabo mediante cromatografía en columna.

8. El método de la reivindicación 7, en donde la cromatografía en columna comprende cromatografía en columna de cuentas de agarosa entrecruzada, cromatografía en columna de cuentas de agarosa sustituida con fenilo entrecruzada, cromatografía en columna de amino fenil boronato o cromatografía en columna de hidroxipatita.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular.

10. El método de la reivindicación 1, en donde:

en la etapa a) las células se cultivan a 37°C;

en la etapa b) el primer medio de alimentación contiene 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 32 mM, 16,6 g/L de extracto de levadura y 33 mg/L de insulina, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular;

en la etapa c) el segundo medio de alimentación contiene 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 16 mM, 33,4 g/L de extracto de levadura y 0,92 g/L de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular; y

la temperatura se reduce a 36,5°C;

en la etapa d) el tercer medio de alimentación contiene 50 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 10 mM, 50 g/L de extracto de levadura y 1,8 g/L de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular; y

la temperatura se reduce a 36°C;

en la etapa e) el cuarto medio de alimentación contiene 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 6,6 mM, 50 g/L de extracto de levadura y 0,92 g/L de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular; y

la temperatura se reduce a 35,5°C; comprendiendo adicionalmente filtrar el líquido de cultivo celular de la cosecha obtenido en la etapa g) y

en la etapa h) purificar la rHuPH20 del líquido de cultivo de la cosecha utilizando cromatografía en columna de cuentas de agarosa entrecruzada, cromatografía en columna de cuentas de agarosa sustituida con fenilo entrecruzada, cromatografía en columna de amino fenil boronato o cromatografía en columna de hidroxipatita.

11. El método de la reivindicación 1, en donde:

en la etapa a) las células se inoculan a una densidad celular de 4×10^5 células/mL; y

las células se cultivan a 37°C;

en la etapa b) el primer medio de cultivo contiene 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 32 mM, 83,3 g/L de extracto de levadura y 33 mg/L de insulina, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular;

en la etapa c) el segundo medio de alimentación contiene 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 13 mM, 166,7 g/L de extracto de levadura y 0,92 g/L de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular; y

la temperatura se reduce a 36,5°C;

en la etapa d) el tercer medio de alimentación contiene 50 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 10 mM, 250 g/L de extracto de levadura y 1,8 g/L de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular; y

la temperatura se reduce a 36°C;

en la etapa e) el cuarto medio de alimentación contiene 33 g/L de glucosa, L-alanil-L-glutamina 6,7 mM, 250 g/L de extracto de levadura y 0,92 g/L de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de 4% del volumen de cultivo celular; y

la temperatura se reduce a 35,5 °C; que comprende adicionalmente

filtrar el líquido de cultivo celular de la cosecha obtenido en la etapa g) y

en la etapa h) purificar la rHuPH20 del líquido de cultivo de la cosecha utilizando cromatografía en columna de cuentas de agarosa entrecruzada, cromatografía en columna de cuentas de agarosa sustituida con fenilo entrecruzada, cromatografía en columna de amino fenil boronato o cromatografía en columna de hidroxipatita.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde se producen al menos 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 gramos de rHuPH20 soluble por 100 L de cultivo celular.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la actividad específica de la rHuPH20 soluble es de al menos 80.000, 100.000, 120.000, 140.000, 160.000 o 180.000 unidades/mg.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el volumen de cultivo celular en el biorreactor es de 200, 300, 400, 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000 o 3.500 litros.
- 5 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde las células que codifican la rHuPH20 soluble son células CHO DG44.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde la rHuPH20 está codificada por el ácido nucleico mostrado en el SEQ ID NO: 47.
- 10 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde la secuencia de la rHuPH20 codificada por las células comprende un polipéptido cuya secuencia se muestra en cualquiera de los SEQ ID NO 4-9 o variantes del mismo que tienen una identidad de secuencia de 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con cualquiera de los SEQ NO. 4-9 y que conservan una actividad hialuronidasa y son solubles.