

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 818**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
A01K 67/033 (2006.01)
A01N 37/18 (2006.01)
A01N 43/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2006 E 06736105 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 1858926**

54 Título: **Glicosaminoglicanasas solubles y métodos para la preparación y utilización de glicosaminoglicanasas solubles**

30 Prioridad:

23.02.2005 US 65716
27.09.2005 US 238171

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.01.2016

73 Titular/es:

HALOZYME, INC. (100.0%)
11388 SORRENTO VALLEY ROAD
SAN DIEGO, CA 92121, US

72 Inventor/es:

BOOKBINDER, LOUIS, H.;
KUNDU, ANIRBAN;
FROST, GREGORY, I.;
HALLER, MICHAEL, F.;
KELLER, GILBERT, A. y
DYLAN, TYLER, M.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 557 818 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

Glicosaminoglicanasas solubles y métodos para la preparación y utilización de glicosaminoglicanasas solubles

5

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere generalmente a enzimas Glicosaminoglicanasas, incluyendo Glicoproteínas Hialuronidasas Solubles Activas a pH neutro ("sHASEGP" en sus siglas inglesas), y porciones de las mismas, particularmente dominios Hialuronidasa. Más específicamente, la invención se refiere a modificaciones químicas, composiciones farmacéuticas, plásmidos de expresión, métodos para la fabricación y métodos terapéuticos que utilizan las Glicosaminoglicanasas (y dominios de las mismas y las moléculas de ácido nucleico codificantes) para la modificación terapéutica de glicosaminoglicanos en el tratamiento de la enfermedad y para su uso para aumentar la difusión de otras moléculas tales como moléculas inyectadas en un animal.

15

Información antecedente

20 Los glicosaminoglicanos (GAG) son polisacáridos lineales complejos de la matriz extracelular (MEC). Los GAG se caracterizan por la repetición de estructuras de disacárido de una hexosamina N-sustituida y un ácido urónico (en el caso del hialuronano (HA), el condroitín sulfato (SC), la condroitina (C), el dermatán sulfato (SD), el heparán sulfato (SH), y la heparina (H)), o una galactosa (en el caso del queratán sulfato (QS)). A excepción del HA, todos existen unidos covalentemente a las proteínas básicas. Los GAG con sus proteínas básicas se denominan estructuralmente proteoglicanos (PG).

25

El hialuronano (HA) se encuentra en mamíferos predominantemente en los tejidos conectivos, la piel, el cartílago y en el líquido sinovial. El hialuronano también es el constituyente principal del vítreo del ojo. En el tejido conectivo, el agua de hidratación asociada con el hialuronano crea matrices hidratadas entre los tejidos. El hialuronano desempeña un papel clave en los fenómenos biológicos asociados con la motilidad celular incluyendo el desarrollo rápido, la regeneración, la reparación, la embriogénesis, el desarrollo embriológico, la curación de heridas, la angiogénesis y la tumorigénesis (Toole 1991 Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (ed), Plenum Press, Nueva York, 1384-1386; Bertrand et al. 1992 Int. J. Cancer 52:1-6; Knudson et al., 1993 FASEB J. 7:1233-41). Además, los niveles de hialuronano se correlacionan con la agresividad tumoral (Ozello et al. 1960 Cancer Res 20: 600-604; Takeuchi et al. 1976, Cancer Res. 36:2133-2139; Kimata et al. 1983 Cancer Res. 43: 1347-1354).

35

El HA se encuentra en la matriz extracelular de muchas células, especialmente en tejidos conjuntivos blandos. El HA ha sido asignado a diversas funciones fisiológicas, tales como la homeostasis de las proteínas en agua y en plasma (Laurent TC et al. (1992) FASEB J 6:2397-2404). La producción de HA aumenta en células en proliferación y puede desempeñar un papel en la mitosis. También se ha implicado en la locomoción y la migración celular. Parece ser que el HA desempeña papeles importantes en la regulación, el desarrollo, y la diferenciación celular (Laurent et al., supra).

40

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

45

Las interacciones de proteínas con hialuronano también están involucradas en la estructura de la matriz extracelular o "sustancia fundamental".

50

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

55

Existen tres clases generales de hialuronidasas:

1. hialuronidasas de tipo mamífero, (EC 3.2.1.35) que son endo-beta-N-acetilhexosaminidasas con tetrasacáridos y hexasacáridos como los productos finales principales. Tienen actividades tanto hidrolítica como transglicosidasa y pueden degradar ácido hialurónico y sulfatos de condroitina (SC), en general, C4-S y C6-S.

60

2. Hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.99.1) degradan ácido hialurónico y, en diversos grados, SC y SD. Son endo-beta-N-acetilhexosaminidasas que operan por medio de una reacción de eliminación beta que produce principalmente productos finales disacáridos.

3. Hialuronidasas (EC 3.2.1.36) de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos son endo-beta-glucuronidasas que

generan productos finales tetrasacáridos y hexasacárido a través de la hidrólisis de la conexión beta 1-3.

Las hialuronidasas de mamíferos se pueden dividir adicionalmente en dos grupos: enzimas activas a pH neutro y activas a pH ácido. Existen seis genes de tipo hialuronidasa en el genoma humano, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 y PH20/SPAM1. HYALP1 es un pseudogen, y no se ha demostrado que HYAL3 posea actividad enzimática hacia ningún sustrato conocido. HYAL4 es una condroitinasa y exhibe poca actividad hacia hialuronano. HYAL1 es la enzima activa a pH ácido prototípica y PH20 es la enzima activa a pH neutro prototípica. Las hialuronidasas activas a pH ácido, tales como HYAL1 y HYAL2 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. Anal Bioquímica, 1997). 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 las que están generalmente bloqueadas en la membrana plasmática a través de un ancla de glicosilfosfatidil inositol tal como HYAL2 humana y PH20 humana (Danilkovitch-Miagkova, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2003 15 de Abril; 100(8):4580-5, Phelps et al., Science 1988.), y las que son generalmente solubles tales como HYAL1 humana (Frost et al., Biochem Biophys Res Commun. 1997 9 de Julio; 236 (1): 10-5). Sin embargo, existen variaciones de una especie a otra: bovina, PH20 por ejemplo está fijada muy ligeramente a la membrana plasmática y no está anclada a través de un ancla sensible a fosfolipasa (Lalancette et al., Biol Reprod. Agosto de 2001;65(2): 628-36.). Esta característica única de la hialuronidasa bovina ha permitido el uso de la enzima hialuronidasa de testículos bovinos soluble como un extracto para uso clínico (Wydase™, Hyalase™). Otras especies de PH20 son enzimas ancladas a lípidos que generalmente no son solubles sin el uso de detergentes o lipasas. Por ejemplo, PH20 humana se ancla a la membrana plasmática a través de un ancla de GPI. Los intentos para elaborar constructos de ADN de PH20 humana que no introdujeran un anclaje lipídico en el polipéptido dieron como resultado una enzima catalíticamente inactiva, o una enzima insoluble (Arming et al. Eur J Biochem. 1 de Agosto de 1997;247(3):810-4). La hialuronidasa de espermatozoides de macaco de origen natural se encuentra tanto en forma soluble como unida a membrana. Mientras que la forma unida a membrana de 64 kDa posee actividad enzimática a pH 7,0, la forma de 54 kDa solo es activa a pH 4,0 (Cherr et al., Dev Biol. 10 de Abril de 1996;175(1):142-53). Por lo tanto, las formas solubles de PH20 menudo se carecen de actividad enzimática en condiciones neutras.

Las condroitinasas son enzimas que se encuentran en todo el reino animal. Estas enzimas degradan los glicosaminoglicanos a través de una reacción endoglicosidasa. Los ejemplos específicos de condroitinasas conocidas incluyen: condroitinasa ABC (derivada de *Proteus vulgaris*; Solicitud de Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 6-153947, T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, y S. Suzuki, J. Biol. Chem., 243,1523 (1968), S. Suzuki, H. Saito, T. Yamagata, K. Anno, N. Seno, Y. Kawai, y T. Furuhashi, J. Biol. Chem., 243,1543 (1968)); Condroitinasa AC (derivada de *Flavobacterium heparinum*; T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, S. Suzuki y, J. Biol. Chem., 243, 1523 (1.968)); Condroitinasa AC II (derivada de *Arthrobacter aurescens*; K. Hiyama, y S. Okada, J. Biol. Chem., 250, 1824 (1975), K. Hiyama y S. Okada, J. Biochem (Tokio), 80, 1201 (1976)); Hialuronidasa ACIII (derivada de *Flavobacterium sp. Hp102*; Hirofumi Miyazono, Hiroshi Kikuchi, Keiichi Yoshida, Kiyoshi Morikawa y Kiyochika Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023 (1989)); Condroitinasa B (derivada de *Flavobacterium heparinum*; Y. M. Michelacci y C. P. Dietrich, Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 973 (1974), Y. M. Michelacci y C. P. Dietrich, Biochem J., 151, 121 (1975), Kenichi Maeyama, Akira Tawada, Akiko Ueno, y Keiichi Yoshida, Seikagaku, 57, 1189 (1985)); Condroitinasa C (derivada de *Flavobacterium sp. Hp102*; Hirofumi Miyazono, Hiroshi Kikuchi, Keiichi Yoshida, Kiyoshi Morikawa y Kiyochika Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023 (1989)); y similares.

Las glicoproteínas están compuestas por una cadena polipeptídica unida covalentemente a uno o más radicales carbohidrato. Existen dos grandes categorías de glicoproteínas que poseen carbohidratos acoplados a través de conexiones N-glicosídicas u O-glicosídicas a la proteína constitutiva. Los glicanos conectados mediante N y O se unen a los polipéptidos a través de conexiones asparagina-N-acetil-D-glucosamina y serina (treonina)-N-acetil-D-galactosamina, respectivamente. Los oligosacáridos ligados a N complejos no contienen residuos de manosa terminales. Contienen solamente residuos de N-acetilglucosamina, galactosa, y/o ácido siálico terminales. Los oligosacáridos híbridos contienen residuos de manosa terminales, así como residuos de N-acetilglucosamina, galactosa y/o ácido siálico terminales.

Con las glicoproteínas ligadas a N, un precursor oligosacárido se une al grupo amino de la asparagina durante la síntesis peptídica en el retículo endoplásmico. El radical oligosacárido es procesado secuencialmente a continuación por una serie de enzimas específicas que eliminan y añaden radicales azúcar. El procesamiento se produce en el retículo endoplásmico y continúa con el paso a través del aparato cis-, medial- y trans-Golgi.

El documento WO2004/078140 describe proteínas hialuronidasa y, en particular, describe una glicoproteína PH20 truncada C-terminalmente del SEQ ID NO: 1 (como se identifica en la presente memoria), que se secreta tras la expresión en las células y es soluble y catalíticamente activa. Este documento también describe, a nivel general, la PEGilación de las glicoproteínas allí descritas.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende una glicoproteína hialuronidasa humana soluble PEGilada en un portador farmacéutico, en donde:

la composición farmacéutica se formula para su uso en la administración intravenosa;

la hialuronidasa contiene de tres a seis radicales PEG por polipéptido;

5 la hialuronidasa es activa a pH neutro;

la hialuronidasa es soluble; y

la hialuronidasa es una glicoproteína que contiene al menos un radical azúcar ligado a N, en donde el radical azúcar ligado a N está unido covalentemente a un residuo de asparragina del polipéptido.

10 En la presente memoria se describen enzimas glicosaminoglicanasas solubles, particularmente miembros de la familia de Glicoproteína Hialuronidasa activa a pH neutro soluble (también denominada aquí como sHASEGP), siendo los miembros preferidos las Glicoproteínas Hialuronidasas activas a pH neutro solubles humanas, particularmente las glicoproteínas hialuronidasas PH-20 solubles humana (también denominada en la presente memoria rHuPH20s). Las Hialuronidasas activas a pH neutro solubles descritas en la presente memoria son cada una un miembro de la familia de sHASEGP, denominada en la presente memoria como una sHASEGP. El dominio hialuronidasa soluble, y usos del mismo también se describen. Si bien se ilustran en la presente memoria varios usos y aplicaciones de glicosaminoglicanasas solubles (a veces referidas en la presente como enzimas GAG) utilizando rHuPH20 como una glicosaminoglicanasa ilustrativa (p. ej., en la promoción de la liberación de medicamentos et al. agentes dentro de los tejidos del organismo de los mamíferos), los expertos en la técnica apreciarán que se pueden aplicar otras glicosaminoglicanasas tales como las descritas en la presente memoria u otros conocidas en la técnica a una serie de tales aplicaciones. Las glicosaminoglicanasas solubles actualmente preferidas, tales como las sHASEGP, presentan alguna actividad hialuronidasa y pueden exhibir también otras actividades glicosaminoglicanasas. Las glicosaminoglicanasas solubles humanas se prefieren actualmente para aplicaciones en las que la enzima se va a emplear en el organismo humano, incluyendo muchas aplicaciones médicas como se describe e ilustra en la presente memoria.

Un aspecto de la invención se basa en el descubrimiento de que se puede producir una actividad hialuronidasa activa a pH neutro soluble con alto rendimiento en un sistema de expresión de mamífero mediante la introducción de ácidos nucleicos que carecen de una región estrecha que codifica aminoácidos en el extremo carboxi del ADNc de PH20 humana. También se describen modificaciones adicionales de las sHASEGP para mejorar la secreción por medio del uso de péptidos líder no nativos. Adicionalmente se describen métodos para modificar las sHASEGP para prolongar su vida media por medio de enmascaramiento de la proteína con polietilenglicol (PEG) y/o modificaciones post-traduccionales a la glicosilación nativa. Los intentos anteriores para generar glicoproteínas hialuronidasas humanas activas a pH neutro solubles no tuvieron éxito. Se concluyó que los truncamientos del polipéptido de hialuronidasa humano daban como resultado tanto una pérdida de actividad enzimática a pH neutro, como una incapacidad de las células para secretar la proteína recombinante en sistemas de expresión de mamíferos (Arming, et al. Eur J Biochem 1 de Agosto de 1997; 247 (3):810-4). Es crítico generar sHASEGP secretadas que actúan a pH neutro para su producción comercial y con utilidad terapéutica como hialuronidasa. La invención, descrita en la presente memoria, supera estos et al. retos.

La invención comprende adicionalmente una glicoproteína sHASEGP humana catalíticamente activa en donde la sHASEGP posee al menos un radical azúcar ligado a N. Los estudios que se muestran en la presente memoria demuestran que PH20 humana requiere glicanos ligados a N para su actividad catalítica, mientras las hialuronidasas bovina y de veneno de abeja permanecen activas sin tales glicanos ligados a N. Un dominio hialuronidasa PH20 humana que carece de radicales ligados a N es catalíticamente inactivo. De este modo, la tecnología de ADN recombinante clásica no permite la producción de una sHASEGP humana catalíticamente activa, a diferencia de la hialuronidasa de veneno de abeja, que puede ser producida en E. coli.

En la presente memoria se describen métodos y células para la generación de un polipéptido de glicoproteína sHASEGP ligado a N, mediante el uso de una célula capaz de introducir dichos radicales azúcar ligados a N o mediante la introducción de dichos radicales ligados a N en un polipéptido sHASEGP. Los métodos de identificación de sHASEGP adecuadamente glicosiladas se describen adicionalmente.

También se describen glicoproteínas sHASEGP PEGiladas y/o super-Sialadas catalíticamente activas. Las sHASEGP PEGiladas y/o super-sialadas poseen mayor vida media en suero en comparación con las sHASEGP de testículos bovinas y ovinos no sialadas de origen natural, por lo que son preferibles para la estabilidad de la enzima y para su uso como fármacos o coadyuvantes en circunstancias en las que es deseable una vida media prolongada (como suele ser el caso de la administración intravenosa). En la presente memoria se describen procedimientos para la preparación de sHASEGP PEGiladas y/o super-Sialadas, composiciones y usos de las mismas. Sin estar limitado a una aplicación o mecanismo de acción particular, se considera generalmente que la unión de radicales PEG a sHASEGP y otras glicosaminoglicanasas se puede utilizar para proteger eficazmente las moléculas, disminuyendo su sensibilidad relativa a las proteasas y, potencialmente, también disminuyendo el grado y velocidad de su aclaramiento y eliminación del organismo. Se puede generar y utilizar también la aplicación de estos principios y técnicas a otras glicosaminoglicanasas, PEGiladas, super-sialadas y/u versiones modificada de otra manera de tales

otras glicosaminoglicanasas en el contexto de los métodos y técnicas descritos e ilustrados en la presente memoria (p. ej., técnicas para promover la dispersión de medicamentos et al. agentes dentro de los tejidos del organismo).

5 También se describen proteínas codificadas por variantes de corte y empalme de sHASEGP deficientes en ancla de GPI naturalmente.

Adicionalmente se describen composiciones de sHASEGP que comprenden, una glicoproteína sHASEGP soluble con un ion metálico, en donde el ion metálico es Calcio, Magnesio o Sodio. Las sHASEGP son generalmente óptimamente activas en presencia de dichos metales. También se describen formulaciones que consisten en sHASEGP en presencia de dichos iones metálicos.

15 Se describen modificaciones de las sHASEGP y otras glicosaminoglicanasas para prolongar adicionalmente su media vida. Se describen modificaciones químicas de una sHASEGP y otras glicosaminoglicanasas con polímeros tales como polietilenglicol y dextrano. Tales modificaciones protegen las sHASEGP y otras glicosaminoglicanasas de la eliminación de la circulación y del sistema inmunitario así como receptores de glicosilación para manosa y asialoglicoproteína. Adicionalmente se describen métodos para conectar grupos funcionales específicos, tales como sitios de glicosilación, aminoácidos cargados positivamente y cisteínas.

20 Los ensayos para la identificación de efectores, tales como compuestos, incluyendo moléculas pequeñas, y condiciones, tales como pH, temperatura y fuerza iónica, que modulan la activación, expresión o actividad de las sHASEGP, también se describen en la presente memoria. En ensayos ilustrativos, se evaluaron los efectos de los compuestos de ensayo sobre la capacidad de un dominio Hialuronidasa de sHASEGP para escindir un sustrato conocido, típicamente un glicosaminoglicano o proteoglicano. Los agentes, generalmente compuestos, particularmente moléculas pequeñas, que modulan la actividad del dominio hialuronidasa son compuestos candidato para modular la actividad de la sHASEGP. Los dominios Hialuronidasa también se pueden utilizar para producir anticuerpos específicos de hialuronidasa con actividad que altera su función. Los dominios hialuronidasa descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, el dominio glicosil-hidrolasa N-terminal con porciones truncadas C-terminales de los mismos que exhiben actividad catalítica in vitro.

25 También se describen moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas y dominios Hialuronidasa. Se describen moléculas de ácido nucleico que codifican un dominio Hialuronidasa soluble o porciones catalíticamente activas del mismo y también las que codifican la sHASEGP completa. El ácido nucleico que codifica un dominio Hialuronidasa ilustrativo y el ácido nucleico aguas abajo se expone en el SEQ ID NO: 6; y el dominio Hialuronidasa de una sHASEGP ilustrativa se expone en el SEQ ID NO: 1 (aminoácidos 35-464). La secuencia de proteínas y la secuencia de ácido nucleico codificante de una sHASEGP ilustrativa completa se exponen los SEQ ID NO: 1 y 6.

30 También se describen moléculas de ácido nucleico que hibridan con tal ácido nucleico que codifica sHASEGP a lo largo de su longitud completa o a lo largo de al menos aproximadamente 70%, 80% o 90% de la longitud completa y codifican el dominio Hialuronidasa o porción del mismo. La hibridación se efectúa generalmente en condiciones de al menos baja, generalmente al menos moderada y con frecuencia alta rigurosidad.

35 El fragmento de ácido nucleico aislado es ADN, incluyendo ADN genómico o ADNc, o es ARN, o puede incluir otros componentes, tales como el ácido nucleico de la proteína u otros análogos de nucleótidos. El ácido nucleico aislado puede incluir componentes adicionales, tales como promotores heterólogos o nativos, potenciadores y otras secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales, estos genes pueden estar ligados a otros genes, tales como genes indicadores u otros genes indicadores o genes que codifican indicadores.

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

45 También se describen fragmentos de los mismos u oligonucleótidos que pueden ser utilizados como sondas o cebadores y que contienen al menos aproximadamente de 10 a 16 nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 20 nucleótidos, y generalmente menos de 1000, típicamente menos de aproximadamente 100 nucleótidos, mostrados en el SEQ NO. 6 (o su complemento); o contienen al menos aproximadamente 30 nucleótidos (o su complemento) o contienen oligonucleótidos que hibridan a lo largo de su longitud completa (o al menos aproximadamente 70, 80 o 90% de la misma) a cualquiera de dichos fragmentos u oligonucleótidos. La longitud de los fragmentos es una función de la finalidad para la que se utilizan y/o de la complejidad del genoma de interés. Generalmente las sondas y cebadores contienen menos de aproximadamente 50, 150 o 500 nucleótidos.

50 También se describen los plásmidos que contienen cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria. También se describen células que contienen los plásmidos. Tales células incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, células vegetales, células de insecto y células animales.

También se describen sistemas de expresión de mamíferos mejorados que utilizan los líderes de señales susceptibles de secreción eficiente de sHASEGP. Un ejemplo de tal secuencia de aminoácidos secretora eficiente péptido líder y proteína de fusión con una sHASEGP se encuentra en los SEQ ID NO: 43 y 46.

5 También se describe un método de producción de sHASEGP cultivando las células descritas anteriormente en condiciones en las que la sHASEGP es expresada por las células, y recuperando el polipéptido o glicoproteína sHASEGP expresados. También se describen métodos para aislar ácido nucleico que codifica otras sHASEGP.

10 También se describen células, células en general eucariotas, tales como células de mamíferos y células de levadura, en el que un polipéptido sHASEGP se expresa en la superficie de las células. Tales células se pueden utilizar en ensayos de escrutinio de fármacos para identificar compuestos que modulan la actividad del polipéptido sHASEGP. Estos ensayos, incluyendo ensayos de unión in vitro, y ensayos basados en la transcripción en los que se evalúa la transducción de señales mediada directa o indirectamente, tal como a través de la activación de los factores a favor del crecimiento, por la sHASEGP.

15 También se describen péptidos codificados por tales moléculas de ácido nucleico. Se incluyen entre aquellos polipéptidos el dominio Hialuronidasa de sHASEGP o un polipéptido con cambios de aminoácidos de tal manera que la especificidad y/o actividad Hialuronidasa permanece sustancialmente inalterada. En particular, se describe una glicoproteína sHASEGP de mamífero sustancialmente purificada que comprende una enzima activa a pH neutro secretada.

20 Adicionalmente se describe en la presente memoria un dominio catalítico de Hialuronidasa que puede incluir además otros dominios. La sHASEGP puede formar homodímeros y también puede formar heterodímeros con alguna otra proteína, tal como una proteína unida a la membrana. También se describe una glicoproteína sustancialmente purificada que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con una sHASEGP ilustrativa en la que el porcentaje de identidad se determina utilizando algoritmos convencionales y penalizaciones por hueco que maximizan el porcentaje de identidad.

25 Las variantes de corte y empalme de sHASEGP, particularmente aquellas con dominios Hialuronidasa catalíticamente activos, se contemplan en la presente memoria.

30 En otros ejemplos, se describen polipéptidos sustancialmente purificados que incluyen un dominio Hialuronidasa de un polipéptido sHASEGP o una porción catalíticamente activa del mismo, pero que no incluyen toda la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 1. Entre estos están polipéptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia de 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% con el SEQ ID NO: 1 o 3.

35 En un ejemplo específico, se describe un ácido nucleico que codifica una glicoproteína hialuronidasa eucariótica, denominada sHASEGP eucariótica. En particular, el ácido nucleico incluye la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 6, particularmente expuesta como nucleótidos 106-1446 del SEQ ID NO: 6, o una porción de la misma que codifica un polipéptido catalíticamente activo.

40 También se describen moléculas de ácido nucleico que hibridan en condiciones de al menos baja rigurosidad, generalmente de moderada rigurosidad, más típicamente de alta rigurosidad con el SEQ ID NO: 6 o sus productos degenerados.

45 En un ejemplo, el fragmento de ácido nucleico aislado hibrida con una molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 6 (o productos degenerados del mismo) en condiciones de alta rigurosidad. Una sHASEGP completa se expone en el SEQ ID NO: 1 y está codificada por el SEQ ID NO: 6 o un producto degenerado del mismo.

50 También se describen muteínas del dominio Hialuronidasa de sHASEGP, particularmente muteínas en las que uno o más residuos de Cys en el dominio Hialuronidasa que estén libres (es decir, no forman enlaces disulfuro con cualquier otro residuo de Cys en el dominio Hialuronidasa) se sustituyen por otro amino ácido, típicamente, aunque no necesariamente, con una sustitución conservativa de aminoácidos o una sustitución que no elimina la actividad, y muteínas en las que se elimina un sitio (o sitios) de glicosilación específico.

55 Los polipéptidos sHASEGP, incluyendo, pero no limitados a variantes de corte y empalme de los mismos, y ácidos nucleicos que codifican sHASEGP y dominios, derivados y análogos de los mismos se describen en la presente memoria. También se describen glicoproteínas Hialuronidasa de cadena sencilla secretadas que tienen un extremo N-terminal funcionalmente equivalente al generado por activación de una peptidasa señal para formar sHASEGP. Hay siete sitios de glicosilación ligados a N potenciales en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de la sHASEGP PH20 humana ilustrada en el SEQ ID NO: 1. Se forman enlaces disulfuro entre los residuos de Cys C60-

C351 y residuos de Cys C224 a 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 el dominio sHASEGP de los aminoácidos 36 a Cys 464 en el SEQ ID NO: 1 comprende el dominio hialuronidasa de PH20 de sHASEGP humano mínimamente activo. Por lo tanto, sitio de glicosilación ligado a N N-490 no se requiere para la actividad apropiada de sHASEGP. Como apreciarán los expertos en la técnica, se pueden realizar cambios mínimos en tales composiciones como se ha descrito e ilustrado en la presente memoria sin eliminar sustancialmente o en algunos casos sin reducir sustancialmente (o, potencialmente, incluso mejorando) su actividad útil, y por lo tanto se pueden emplear igualmente en diversas aplicaciones como se describe en la presente memoria.

La glicosilación ligada a N de algunas de las sHASEGP (tal como la sHASEGP que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1) 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 en la antigenicidad, plegamiento estructural, solubilidad y estabilidad de una proteína, no se cree que la mayoría de las enzimas requieran glicosilación para una actividad óptima de la enzima. Tales sHASEGP 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 sHASEGP, la presencia de glicanos ligados a N es crítica para generar una enzima activa. Se incluyen sistemas de expresión de proteínas adecuados para la introducción de residuos de glicosilación unidos a N críticos en sHASEGP. Además, se incluye la introducción de polipéptido sHASEGP desglicosilado en presencia de extractos capaces de introducir glicanos ligados a N. En un aspecto de la invención, se describe la glicosilación compleja protegida terminalmente mediante sialación a la vez que también se contemplan otras protegidas terminalmente con residuos de manosa libres. Preferiblemente, los residuos de ácido siálico se encuentran en los residuos terminales de glicosilación ligada a N en las sHASEGP.

Los 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 a través del nitrógeno de la amida de los residuos de Asn que caen dentro de las secuencias Asn-Xaa-Thr/Ser- (donde Xaa no es Pro). Se ha informado sobre la glicosilación en un sitio -Asn-Xaa-Cys para la proteína C de coagulación. Los sitios ligados a N a menudo se asignan indirectamente por la aparición de un ciclo "en blanco" durante la secuenciación. La identificación positiva puede realizarse después de la liberación del oligosacárido por la PNGasa F, que convierte la Asn glicosilada en Asp. Después de la liberación de la PNGasa F, los oligosacáridos ligados a N se pueden purificar, por ejemplo mediante el uso de cromatografía en Bio-Gel P-6, sometiendo la reserva de oligosacárido a cromatografía preparativa de intercambio aniónico de alto pH (HPAEC) (Townsend et al., (1989) Anal. Biochem. 182, 1-8). Ciertos isómeros de oligosacáridos se pueden resolver utilizando HPAEC. Los residuos de fucosa desplazarán las posiciones de elución antes en el cromatograma de HPAEC, mientras que los residuos de ácido siálico adicionales aumentarán el tiempo de retención. El tratamiento concomitante de glicoproteínas cuyas estructuras de oligosacáridos son conocidas (p. ej., fetuina bovina, glicoproteína ácida α -1, ovoalbúmina, ARNasa B, transferrina) puede facilitar la asignación de los picos de oligosacáridos. Los oligosacáridos recogidos pueden caracterizarse por una combinación de análisis de enlace composicionales y de metilación (Waeghe et al., (1983). Carbohydr Res. 123, 281-304), asignando configuraciones anoméricas por medio de espectroscopía de RMN (VanHalbeek (1993) en Methods Enzymol 230).

En el caso de algunos sHASEGP, ilustrados por la sHASEGP humana rHuPH20 descrita en la presente memoria, la sHASEGP puede comprender enlaces tanto N-glicosídicos como O-glicosídicos. Por ejemplo, se ha descubierto que rHuPH20 (tal como se produce en la línea CHO DG44 3D3, como se describe en los Ejemplos de más abajo) tiene oligosacáridos ligados a O, así como los oligosacáridos ligados a N. Las modificaciones glicosídicas de tales sHASEGP (por ejemplo, modificaciones que comprende una o más adiciones, supresiones o alteraciones de tales oligosacáridos ligados a N y/o ligados a O se pueden utilizar para generar variantes de sHASEGP glicosídicas que exhiben perfiles farmacocinéticos y/o farmacodinámicos alterados que las hacen deseables para aplicaciones concretas. A modo de ilustración, pero sin limitarse a un mecanismo de acción concreto, se pueden utilizar la eliminación o alteración de (tal como mediante protección terminal o des-exponiendo de otra manera) uno o más oligosacáridos ligados a N y/o ligados a O que están implicados en la unión a receptores celulares u otros para alterar el grado y/o la velocidad a la que una sHASEGP se une a, o es absorbida por, un tejido concreto, que a su vez puede ser utilizado para alterar, por ejemplo, su perfil farmacocinético (p. ej., aumentando su media en suero vida o alterando de otra manera su bioabsorción).

También se describen formulaciones de las sHASEGP. Las sHASEGP pueden formularse en formas liofilizadas y soluciones estabilizadas, por ejemplo. Las formulaciones que contienen iones metálicos específicos, tales como calcio, magnesio o sodio, son útiles para una actividad óptima a pH neutro. Además de las formulaciones en solución estabilizadas, se contemplan en la presente memoria formulaciones de liberación lenta para la eliminación prolongada de glicosaminoglicanos o la promoción ampliada de propagación o difusión de agentes tales como medicamentos. También se describen en la presente memoria kits que proporcionan jeringas pre-ensadas de sHASEGP para la administración de pequeños volúmenes de sHASEGP para procedimientos quirúrgicos intraoculares et al. procedimientos de pequeño volumen. También se describen formulaciones salinas equilibradas

para uso *ex vivo* en procedimientos de tecnología de reproducción artificial.

También se describen métodos para el uso de glicosaminoglicanasas incluyendo sHASEGP en la eliminación de glicosaminoglicanos. Las glicosaminoglicanasas incluyendo sHASEGP abren canales en el espacio intersticial a través de la degradación de glicosaminoglicanos que generalmente permiten la difusión de moléculas de menos de aproximadamente 500 nm de tamaño. Estos canales pueden permanecer relativamente abiertos durante un período de 24-48 horas, dependiendo de la dosis y la formulación. Dichos canales se pueden utilizar para facilitar la difusión de moléculas añadidas exógenamente tales como fluidos, moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos y vectores de terapia génica y otras moléculas de menos de aproximadamente 500 nm de tamaño. Además, sin limitarse a una teoría o mecanismo de acción concretos, se cree que la formación de dichos canales puede facilitar el flujo masivo de fluido dentro de un espacio intersticial, que a su vez puede promover la dispersión o el movimiento de un soluto (tal como una molécula detectable u otro agente de diagnóstico, un anestésico u otro agente modificador de tejido, un agente farmacológico o farmacéuticamente eficaz, o un cosmético u otro agente estético) que es portado de manera eficaz por el fluido en un proceso referido a veces en la presente memoria como "transporte convectivo" o simplemente convección. Tal transporte convectivo puede exceder sustancialmente la tasa y efectos acumulativos de la difusión molecular y por lo tanto puede hacer que la molécula terapéutica o de otro tipo administrada profunda más rápida y eficazmente un tejido. Además, cuando una molécula tal como un agente terapéutico o de otro tipo (tal como un fármaco de molécula pequeña o una molécula más grande o complejo) es co-formulada o co-administrada con una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) y ambas se inyectan en un sitio local relativamente confinado, tal como un sitio de administración parenteral no intravenoso (p. ej., intradérmica, subcutánea, intramuscular, o dentro o alrededor de otros tejidos internos, órganos u otros espacios relativamente confinados dentro del organismo), el fluido asociado a la dosis administrada puede tanto proporcionar una fuerza de conducción local (es decir, presión hidrostática), como disminuir la impedancia para fluir (mediante la apertura de canales dentro de la matriz intersticial) - ambos los cuales tenderían a aumentar el flujo de fluido, y con ello el transporte convectivo del agente terapéutico u otra molécula contenida dentro del fluido. Como se ha discutido e ilustrado con más detalle en la presente memoria, y como será apreciado por los expertos en la técnica, estos aspectos de la utilización de las sHASEGP y otras glicosaminoglicanasas pueden tener utilidad sustancial para mejorar la biodisponibilidad, así como la manipulación de otras características farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de los agentes co-formulados o co-administrados.

Las sHASEGP y otras glicosaminoglicanasas también se pueden utilizar para eliminar el exceso de glicosaminoglicanos, tales como los que se producen después de la reperfusión de isquemia, inflamación, arteriosclerosis, edema, cáncer, lesión de la médula espinal y otras formas de cicatrización. En algunos casos, sHASEGP y otras glicosaminoglicanasas pueden suministrarse sistémicamente mediante infusión intravenosa. Esto puede ser útil cuando el acceso local no está fácilmente disponible tal como el corazón o el cerebro o en el caso de neoplasia diseminada en la que la enfermedad es a través del organismo. Para tales aplicaciones intravasculares intravenosas u otras, las sHASEGP Super-Sialadas son a menudo preferible aumentar la vida media en suero y la distribución sobre las enzimas hialuronidasa nativas que carecen de ácidos siálicos terminales.

En algunas circunstancias, tales como lesión de la médula espinal et al. trastornos del sistema nervioso, glaucoma y algunos otros trastornos del ojo, así como diversas afecciones inflamatorias autoinmunitarias, cánceres y otras enfermedades y afecciones crónicamente progresiva, y tratamientos cosméticos, se prefiere la liberación sostenida. Como apreciarán los expertos en la técnica, se han desarrollado varias composiciones y técnicas diferentes para proporcionar formulaciones o depósitos de moléculas de interés de liberación lenta o de liberación sostenida.

En otras indicaciones, es preferible una dosis única de acción corta. La eliminación temporal de glicosaminoglicanos puede usarse para mejorar el suministro de soluciones y fármacos en y/o a través de los espacios intersticiales. Esto puede ser útil para la difusión de anestesia y para la administración de fluidos, moléculas y proteínas terapéuticos. La administración subcutánea, intradérmica e intramuscular de moléculas en presencia de las sHASEGP (y/u otras glicosaminoglicanasas) también facilita su distribución sistémica más rápidamente. Tales métodos son muy útiles cuando el acceso intravenoso no está disponible o cuando se necesita más rápida administración sistémica de moléculas. A modo de ilustración, el suministro de otras moléculas grandes tales como el Factor VIII, que son escasamente biodisponibles tras la administración subcutánea, puede inyectarse con sHASEGP para aumentar su disponibilidad.

También se describen usos de las sHASEGP para la eliminación enzimática de los ovocitos que rodean la matriz del cumulus. La eliminación de la matriz del cumulus utilizando una sHASEGP purificada sin los contaminantes tóxicos de la hialuronidasa derivada del extracto permite una recuperación más suaves del ovocito con mayores viabilidades. Por otra parte, las sHASEGP se pueden fabricar sin el uso de extractos de ganado u otros organismos que portan virus et al. patógenos tales como encefalopatías espongiiformes transmisibles.

Las inyecciones de pequeños volúmenes de sHASEGP para uso intraocular también se pueden usar para espacios pequeños. Por ejemplo, las sHASEGP y/u otras glicosaminoglicanasas pueden inyectarse en la cámara anterior del ojo para eliminar sustratos viscoelásticos en exceso que se administran durante la cirugía. La inyección intraocular

de sHASEGP también se puede utilizar para reducir la presión intraocular en el glaucoma, para disolver agregados vítreos, o "partículas flotantes", para aclarar la hemorragia vítrea, para el tratamiento de la degeneración macular, para promover el desprendimiento vitreorretinal en la retinopatía diabética y para mezclarla con otras enzimas para promover la remodelación de la córnea, junto con lentes correctoras. Como se describe en la presente memoria, las sHASEGP y/u otras glicosaminoglicanasas también se pueden inyectar en el ojo o en sus espacios periorbitales circundantes como una forma de "agente de propagación", es decir, para promover la liberación de agentes de diagnóstico, anestésicos o farmacológicos para sitios dentro y/o alrededor del tejido diana. Por ejemplo, la inyección de una sHASEGP concomitante o en proximidad temporal a la inyección de agentes de diagnóstico, anestésicos o farmacológicos en el espacio sub-Tenon o episcleral se puede utilizar para promover el suministro transescleral del medicamento a las porciones interior del ojo (tales como la coroides, la retina y el cuerpo vítreo). El espacio episcleral es un espacio que contiene linfa entre la Fascia Bulbi (cápsula de Tenon) y la esclerótica, que es un tejido protector relativamente tenaz que rodea a la coroides y la retina y el interior del ojo. El espacio sub-Tenon o episcleral, que a veces es referido como espacio linfático periscleral, es generalmente también continuo con las cavidades subdurales y subaracnoideas y es atravesado por bandas de tejido conectivo que se extienden desde la fascia a la esclerótica. Como apreciarán los expertos en la técnica, la capacidad de promover el suministro de composiciones través de la capa escleral de protección que cubre el ojo permite suministrar convenientemente y eficazmente una gran variedad de agentes farmacológicos y de otro tipo a los tejidos subyacentes dentro del ojo, tales como la coroides, la retina o el humor vítreo. Mediante la aplicación de las composiciones de la presente invención a tales rutas de entrega in vivo se pueden tratar por medios mínimamente invasivos incluso tejidos relativamente difíciles de alcanzar, tales como los que están en la parte posterior del ojo. Se reconocerá que en algunos casos, será deseable el uso de una sHASEGP de mayor duración, tal como una sHASEGP pegilada.

Es importante observar que mientras que las hialuronidasas derivadas de animales pueden y se han aplicado para el tratamiento de ciertas afecciones de los ojos, y como un factor de propagador para promover el suministro de anestésicos et al. agentes terapéuticos o farmacológicos, se aplican varias consideraciones importantes a la utilización de enzimas derivadas de animales y potencialmente o limitan su uso o introducen preocupaciones de seguridad o riesgos adicionales cuando se utilizan para el tratamiento de los seres humanos. Entre estas consideraciones se encuentra la preocupación de que las proteínas y otras impurezas presentes en las formulaciones pueden conducir a problemas inmunogénicos y/o de otro tipo cuando se aplican a tejidos humanos in vivo. Además, en la medida en que se emplean enzimas animales no humanas, incluso las enzimas purificadas pueden por sí mismas contribuir adicionalmente a la inmunogenicidad, ya que son de origen no humano. Además, a este respecto, el potencial de enzimas degradativas tales como las hialuronidasas para promover eficazmente su propia dispersión (como se describe en la presente memoria), podría aumentar la probabilidad de que las versiones o formulaciones inmunogénicas de estos productos derivados de animales se pongan en contacto por medio del sistema inmunitario.

Las preocupaciones con los factores derivados de animales y/o impuros también son de mayor importancia en una serie de situaciones; por ejemplo, situaciones en las que el tejido diana ya ha sido sometido a procedimientos quirúrgicos o de otro tipo, situaciones en las que se está introduciendo el agente en un espacio relativamente privilegiado desde el punto de vista inmunitario (tal como porciones del ojo, el corazón, el sistema nervioso y muchos otros tejidos y órganos que no están normalmente expuestos al ambiente externo), y/o situaciones en las que el paciente está inmunocomprometido o de otra manera a elevado riesgo asociado con la infección. El uso de tales formulaciones derivadas de animales puede ser evitado de este modo en una serie de aplicaciones en las que el riesgo de infección u otras complicaciones socavan su utilidad potencial. En esas situaciones y en otras, el uso de las sHASEGP preparadas recombinantemente de la presente invención puede proporcionar aplicaciones que son altamente eficaces y tienen perfiles de seguridad favorables, y por lo tanto mejoran y amplían las condiciones y situaciones en las que se utilizan beneficiosamente estas enzimas.

En el contexto de las inyecciones parenterales no intravenosas (tales como intradérmicas, subcutáneas, intramusculares y otras inyecciones en espacios que no sean la vasculatura), una sHASEGP (y/u otra glicosaminoglicanasa) y otro agente (p. ej., una co-formulación o una mezcla que comprende una sHASEGP y otro agente tal como un agente de diagnóstico, un agente anestésico, un agente farmacológico, un agente estético, o combinaciones de los mismos) en un volumen de líquido (p. ej. un excipiente farmacéutico u otra solución) se pueden introducir en un sitio o en varios sitios dentro del organismo mediante inyección o infusión. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que se pueden poner en movimiento varias fuerzas para mejorar el suministro del agente farmacológico o de otro tipo (cuya medida depende en parte de la composición concreta, el volumen y sitio de administración, por ejemplo). Estas fuerzas impulsoras pueden incluir un aumento en la presión hidrostática a medida que un volumen de fluido es forzado eficazmente a un espacio contenido (tal como el espacio sub-Tenon mencionado anteriormente, o un sitio de inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular u otro sitio de inyección parenteral no IV), un posterior aumento en el transporte convectivo de solutos (o convección) a medida que el flujo de fluido aumenta por debajo de su gradiente de presión (y moléculas o complejos macromoleculares disueltos portados él), así como un aumento en la difusión y/o permeación mediado por la degradación de los glicosaminoglicanos y la formación concomitante de canales dentro de la matriz intercelular aguas abajo o en el espacio intersticial.

En el caso de las sHASEGP que se inyectan en la cámara anterior del ojo para eliminar sustratos viscoelásticos en exceso tales como formulaciones que contienen glicosaminoglicanos (que se utilizan comúnmente como ayudas oftalmquirúrgicas en una variedad de intervenciones del segmento anterior), los expertos en la técnica apreciarán, en vista de las enseñanzas de la presente solicitud, que sHASEGP se puede utilizar para complementar o para obviar la necesidad de procedimientos post-quirúrgicos tales como la irrigación y la aspiración, que se utilizan comúnmente para reducir la cantidad de compuesto viscoelástico aplicado que queda en el ojo después de que se ha completado la cirugía. Los productos viscoelásticos se utilizan comúnmente durante las cirugías del segmento anterior para mantener una cámara anterior profunda permitiendo manipulaciones más eficientes y potencialmente protegiendo el endotelio corneal et al. tejidos durante la cirugía. Se utiliza una variedad de productos viscoelásticos que contienen hialuronato y/o sulfato de condroitina en las cirugías tales como intervenciones del segmento anterior del ojo (véase, p. ej., Provisc™, Viscoat™ y DuoVisc™ (disponible de Alcon Laboratories, Inc., www.alconlabs.com); Healon™, Healon™ y Healon GV™ (disponible de Advanced Medical Optics, www.healon.com); Amvisc™ y Amvisc™ Plus (disponible en Bausch & Lomb, www.bausch.com); I-Visc™, I-Visc™ Plus, I-Visc™ 18 e I-Visc™ Phaco (disponible de I-MED Pharma, www.imedpharma.com); LA LON™ (disponible de General Innovations, www.generaltrade.net)). Sin embargo, como se conoce en la técnica, el compuesto viscoelástico retenido en la cámara anterior después de procedimientos quirúrgicos tales como cirugía de cataratas puede conducir al flujo de salida comprometido desde la cámara anterior (potencialmente mediante la reducción de flujo de salida a través de la malla trabecular) que puede causar elevaciones en la presión intraocular (picos IOP) que pueden conducir a glaucoma.

Por lo tanto las sHASEGP descritas en la presente memoria se pueden introducir, por ejemplo, por medio de inyección en la cámara anterior del ojo como un "antídoto viscoelástico" para formulaciones viscoelásticas previamente aplicadas que contienen glicosaminoglicanos tales como hialuronano. Para su uso como tal antídoto viscoelástico, la sHASEGP generalmente será introducida por medio de inyección post-quirúrgica en la cámara anterior (con o sin irrigación o aspiración anterior para eliminar alguna porción del compuesto viscoelástico aplicado anteriormente) siguiendo procedimientos del segmento anterior, tales como cirugía de cataratas e implantación de lente intraocular (p. ej., mediante facoemulsión o cirugía extracapsular), cirugía de filtración de glaucoma (trabeculectomía), cirugía de trasplante corneal (p. ej., queratoplastia penetrante), cirugía ocular post-traumática, y similares. Como apreciarán por los expertos en la técnica, la cantidad de una sHASEGP aplicada en tal contexto dependerá, entre otras cosas, de su actividad específica, así como de la cantidad de compuesto viscoelástico utilizado y de si se elimina o no primero físicamente algo del compuesto viscoelástico (p. ej., mediante irrigación y aspiración). Cada aplicación será así generalmente optimizada para las circunstancias concretas, como será apreciado por los expertos en la técnica en vista de las descripciones y las ilustraciones de la presente memoria.

Algunos productos viscoelásticos, tales como Viscoat™ y DuoVisc™ (disponible de Alcon Labs) comprenden tanto hialuronato como sulfato de condroitina. Ventajosamente, muchas sHASEGP de la presente invención son enzimáticamente activas como hialuronidasas y como condroitinasas, haciéndolas particularmente adecuadas para tales productos viscoelásticos de formulación dual.

Las hialuronidasas incluyendo sHASEGP también se pueden combinar con una o más glicosaminoglicanasas adicionales (tales como condroitinasas) para aplicaciones tales como las anteriores o para abrir adicionalmente canales dentro de los espacios intersticiales para otras aplicaciones tales como las descritas e ilustradas en la presente memoria.

En la medida en que los productos viscoelásticos también se utilizan en otros procedimientos, las sHASEGP descritas en la presente memoria se pueden utilizar igualmente combinadas con o como sustitución de técnicas para reducir o eliminar cantidades de compuesto viscoelástico aplicado, es decir, como un antídoto viscoelástico.

En las aplicaciones de las sHASEGP como agentes de propagación en tejidos tales como los del ojo, se aplica típicamente una formulación que comprende una o más sHASEGP como se describe en la presente memoria a un tejido diana antes de o concomitante a la aplicación de un agente anestésico, diagnóstico, terapéutico o de otro tipo que es deseable que sean suministrados dentro o en la proximidad del tejido diana. En algunos contextos, las sHASEGP pueden ser utilizadas para promover el suministro de un agente farmacológico o de otro tipo a través de un primer tejido para orientar uno o más tejidos distales con respecto al primer. A modo de ilustración, la introducción de las sHASEGP en el espacio episcleral que rodea el ojo antes de o concomitantemente a la introducción de un agente farmacológico o de otro tipo en el espacio episcleral se puede utilizar para promover el suministro del agente a través del tejido de la esclerótica protector y en la coroides, la retina y el cuerpo vítreo. De esta manera, se pueden suministrar varios agentes farmacológico y/u de otro tipo que son útiles para el tratamiento de afecciones de la coroides, la retina y/o el humor vítreo relativamente localmente con respecto a los tejidos diana, pero al mismo tiempo utilizando un enfoque relativamente no invasivo tal como la inyección Sub-Tenon. Existen situaciones análogas en otras situaciones en las que las sHASEGP se pueden aplicar a un tejido o localización en el organismo con el fin de facilitar la administración de un agente farmacológico o de otro tipo dentro de ese tejido o localización y/o a sitios distales, como se ha descrito e ilustrado en la presente memoria.

Mientras que el grado y la velocidad de dispersión de un agente co-administrado o co-formulado depende en parte de los tejidos y el agente implicados, tal dispersión se puede aumentar generalmente mediante, entre otras cosas, el aumento de la cantidad de sHASEGP aplicada, el empleo de una sHASEGP que tiene mayor actividad específica, el empleo de una sHASEGP que es más resistente a la degradación u otra inactivación (como una sHASEGP PEGilada, super-sialada u otra de tales sHASEGP modificadas), proporcionando una formulación de liberación sostenida o de depósito de la sHASEGP, et al. de tales enfoques para aumentar la actividad efectiva y/o la duración de la sHASEGP aplicada. Además, cuando se desea que la sHASEGP facilite la dispersión de un agente en un tejido o localización distal a, p. ej., un sitio de la inyección, se puede utilizar en ese caso el suministro de la sHASEGP y/o el agente en un volumen significativo de líquido (de manera que llenaría parcialmente o incluso distendería ligeramente el sitio de inyección), para promover adicionalmente la dispersión a través de un proceso de transporte convectivo, como se ha descrito e ilustrado en la presente memoria.

Como apreciarán los expertos en la técnica, las sHASEGP se pueden utilizar de este modo para promover eficazmente el suministro de diversos agentes anestésicos, de diagnóstico, farmacológicos y/o de otro tipo a los segmentos posteriores de los ojos para el tratamiento de afecciones tales como desprendimientos de retina, oclusiones de la vena de la retina, retinopatías proliferativas, retinopatías diabéticas, afecciones inflamatorias (tales como uveítis, coroiditis, retinitis y similares), así como enfermedades degenerativas, enfermedades vasculares y diversos tumores. Una vez más, como apreciarán los expertos en la técnica, se puede aplicar útilmente una variedad de agentes farmacológica o farmacéuticamente eficaces para el tratamiento de tales afecciones y enfermedades del segmento posterior, incluyendo, a modo de ilustración, agentes anestésicos y farmacológicos tales como los descritos e ilustrados a continuación.

Las co-formulaciones o co-administraciones de sHASEGP con otras sustancias también pueden ser previstos para plumas inyectables para administración de pequeño volumen o subcutánea rápida. Se pueden formular ejemplos tales como Epipen™, insulina et al. fluidos. Los métodos de la invención incluyen la administración del polipéptido sHASEGP o composiciones farmacéuticas que contienen sHASEGP antes de, simultáneamente a o después de la administración de otras moléculas terapéuticas. La sHASEGP se puede administrar en un sitio diferente del sitio de administración de la molécula terapéutica o la sHASEGP se puede administrar en el mismo sitio que el sitio de administración de la molécula terapéutica.

Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que la capacidad de las sHASEGP y otras glicosaminoglicanasas para causar la degradación de una parte de los glicosaminoglicanos en los espacios intersticiales entre las células da como resultado una apertura temporal de canales dentro del intersticio, lo que a su vez tiende a aumentar el flujo de fluido intersticial y facilitar de forma concomitante la difusión y/o el transporte convectivo de soluto (convección) de los componentes disueltos en el líquido intersticial (tales como anestésicos, fármacos et al. agentes farmacológicos, marcas y agentes de diagnóstico, y similares). Como apreciarán los expertos en la técnica, las sHASEGP de la presente invención se pueden aplicar para mejorar la biodisponibilidad (y potencialmente mejorar otras propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas) de diversos agentes farmacológicos y de otro tipo que son útiles para tratar o diagnosticar varias condiciones de enfermedad o modificar de otra manera uno o más tejidos in vivo. Las categorías ilustrativas de tales agentes incluyen: agentes anti-cancerosos, anti-infecciosos, anestésicos, antiinflamatorios, citoquinas, anticuerpos y otras proteínas, ácidos nucleicos, complejos macromoleculares, y numerosas otras moléculas y agentes farmacológicos que modifican actividades fisiológicas celulares u otras, incluyendo diversas categorías de agentes (y miembros ilustrativos de los mismos) descritos en la presente memoria y en la técnica.

Si bien el transporte de difusión y convectivo de incluso pequeñas moléculas puede ser mejorado mediante la apertura de canales intersticiales y el aumento del flujo de fluido, en el caso de los agentes farmacológicos o de otro tipo más grandes, como muchos agentes bioterapéuticos (incluyendo anticuerpos y otras proteínas, ácidos nucleicos grandes, complejos macromoleculares (tales como liposomas et al. portadores macromoleculares), así como vectores de terapia génica y similares)), el tamaño de las moléculas y la presencia de componentes intersticiales tales como glicosaminoglicanos perjudica sustancialmente la difusión y/o convección de los agentes. Se pueden producir varias consecuencias potencialmente limitantes de la utilidad del agente. Por ejemplo, la farmacocinética del agente puede verse afectada efectivamente por una disminución de la absorción y por lo tanto la distribución del agente. Además, la captura de una porción del agente en o cerca del sitio de administración limita su biodisponibilidad y también puede causar toxicidad, como resultado de una dosis local sostenida y potencialmente alta. En este último sentido, la toxicidad local que puede estar asociada con efectos secundarios dolorosos u otros es un problema con muchas de las grandes biomoléculas que son administradas por medio de inyección no intravenosa, tal como por medio de inyección subcutánea, intradérmica o intramuscular. Como resultado, diversos agentes farmacológicos tienen perfiles farmacocinéticos (PK) y/o farmacodinámicos (PD) que pueden ser mejorados co-formulando el agente con una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) y/o co-administrando el agente con una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa), que puede ser proporcionada antes, coincidente con o después del agente, y administrada en el mismo o en un sitio diferente, cuyos parámetros serían objeto de la optimización en modelos convencionales (tales como modelos animales típicamente utilizados para evaluar la farmacocinética y la farmacodinámica del agente). Cualquiera de una variedad de agentes terapéuticos y farmacológicos, así como otros

agentes (tales como formulaciones cosméticas o estéticas) que típicamente se administran por medio de administración parenteral pueden ser mejorados por lo tanto mediante el uso de las sHASEGP.

5 Aunque la administración intravascular, particularmente mediante inyección intravenosa (IV), puede generalmente proporcionar biodisponibilidad rápida, las inyecciones IV son a menudo inconvenientes, están asociadas a riesgos o son inaplicables (e incluso cuando se puedan emplear se pueden asociar con perfiles PK/PD globales menos que óptimos). Puesto que las sHASEGP se pueden aplicar para mejorar la biodisponibilidad de los agentes administrados por rutas parenterales no IV (tales como subcutánea, intradérmica, intramuscular y otras rutas de suministro de agentes en el intersticio), los agentes que han sido suministrados por inyección IV pueden ser reformulados para el suministro por rutas parenterales no IV. Estas reformulaciones pueden proporcionar importantes beneficios tales como permitir el uso de agentes en los que la administración IV es inconveniente, inaplicable, insegura, demasiado costosa o limitada de otra manera. La reformulación de agentes intravenosos como parenterales no IV también puede permitir a los pacientes a autoadministrarse los agentes, y puede permitir la optimización de la dosificación (p. ej., mejor adaptados a los parámetros PK/PD del agente), evitando la necesidad de administración mediante inyección intravenosa.

20 Como apreciarán los expertos en la técnica, los parámetros PK/PD que se pueden mejorar mediante el uso de las sHASEGP (y/u otras glicosaminoglicanasas) incluyen medidas tales como la C_{max} (la concentración máxima de agente alcanzada después de la absorción en, p. ej., el torrente sanguíneo), la T_{max} (el tiempo necesario para lograr la concentración máxima), el T_{1/2} (el tiempo necesario para que la concentración caiga por interrupción), la C_{min} (la concentración mínima de agente después del metabolismo y la excreción), el AUC (área bajo la curva de concentración frente al tiempo, una medida de la cantidad total de biodisponibilidad), las concentraciones en varios tejidos de interés (incluyendo, p. ej., la velocidad para lograr las concentraciones deseadas, los niveles globales, y la duración de mantenimiento de los niveles deseados) y el E_{max} (el efecto máximo alcanzado). A modo de ilustración, la reformulación de un fármaco u otro agente farmacológico con una sHASEGP o la co-administración del agente con una sHASEGP (que puede introducirse de forma local o sistémica, y antes, junto con o después del agente) se puede utilizar por ejemplo para aumentar la C_{max} de un agente, disminuir su T_{max}, disminuir su T_{1/2}, aumentar su AUC y/o aumentar su E_{max}. Como se apreciará, la capacidad de manipular fácilmente y proporcionalmente tales parámetros clave de PK y PD (p. ej., aplicando más o menos unidades de sHASEGP y alterando el tiempo y/o la localización de la administración) permite la mejora de varios agentes farmacológicos y de otros agentes. La evaluación de los niveles de estos parámetros se puede realizar en modelos tales como los modelos animales utilizados para las mediciones de PK/PD del agente, y co-formulaciones y/o co-administraciones que mejoran la eficacia relativa al perfil de seguridad así seleccionado para una aplicación concreta.

35 Entre las parenterales no IV, las sHASEGP (y/o otras glicosaminoglicanasas) también se pueden utilizar para permitir que los agentes sean administrados por rutas más convenientes, y/o con mayor eficiencia. A modo de ilustración (y sin limitación), reformulando y/o co-administrando agentes con sHASEGP (ya sea local o sistémicamente y, o bien antes, coincidente con o después de la administración del agente) los agentes que se administran típicamente por medio de inyección subcutánea se pueden administrar en cambio por medio de inyección intradérmica, y los agentes que se administran típicamente por medio de inyección intramuscular se pueden administrar en cambio por medio de inyección subcutánea o intradérmica. Alternativamente, los agentes se pueden administrar por la misma ruta, pero con una farmacocinética y/o una farmacodinámica mejoradas utilizando sHASEGP.

45 El uso de sHASEGP (y/u otras glicosaminoglicanasas) para reformular fármacos et al. agentes IV como parenterales no IV también permite el suministro de los agentes utilizando cualquiera de una variedad de nuevos dispositivos de inyección diseñados para facilitar y/o acelerar la velocidad de suministro, y para simplificar la autoadministración. Tales dispositivos incluyen, por ejemplo, dispositivos puntiagudos y microagujas (tales como los que están siendo desarrollados por Becton Dickinson et al.), así como dispositivos de inyección sin aguja (tales como Biojector™ et al. dispositivos disponibles de Bioject; IntraJect™ et al. dispositivos disponibles de Aradigm; dispositivos Medijector™ y similares). Diversos dispositivos (tales como Biojector) son particularmente útiles para facilitar inyecciones intradérmicas que tienden a requerir más experiencia cuando se utilizan agujas convencionales (debido al potencial para penetrar la dermis durante la colocación de la aguja, y suministrar el agente a un sitio del tejido subyacente tal como la capa subcutánea). Para algunos agentes farmacológicos, tales como vacunas, por ejemplo (p. ej., una basada en el ADN u otra vacuna), puede ser particularmente ventajoso administrar el agente en la capa dérmica en oposición a las capas sub-dérmicas ya que tiende a haber una concentración relativamente alta de las células presentadoras de antígeno (CPA) localizadas en la dermis.

60 En el contexto de aquellos agentes que normalmente se suministran mediante inyección intradérmica (ya sea mediante agujas convencionales u otros dispositivos más nuevos), o aquellos muchos otros agentes que no son actualmente, pero podrían ser suministrados mediante inyección intradérmica, se puede utilizar la co-introducción local de una sHASEGP (y/u otra glicosaminoglicanasa) para mejorar el suministro del agente farmacológico o de otro tipo suministrado y para promover su dispersión o propagación dentro de la dermis. En el caso de una vacuna, donde la dermis pueden ser el tejido diana primario, dada las abundancia local de CPA, la sHASEGP (y/u otra

glicosaminoglicanasa) por lo tanto puede facilitar la dispersión de la vacuna dentro del tejido diana, aumentando así la probabilidad y la magnitud de las interacciones entre una vacuna y las CPA (que pueden potenciar significativamente la generación de una respuesta inmunomoduladora). En el caso de otros agentes, la dermis puede no ser el tejido diana primario, sino más bien un tejido en el que se introduce una dosis del agente a partir del cual se desea que el agente sea absorbido en otro tejido, típicamente el torrente sanguíneo. En este último caso, el torrente sanguíneo puede ser en sí mismo el tejido diana de interés (p. ej., para los factores moduladores de la sangre como se describe en la presente memoria y en la técnica), o el torrente sanguíneo puede ser en sí mismo un tejido de suministro por medio del cual el agente es transportado a un objetivo distante de tejido (p. ej., un tejido en el organismo abastecido por el torrente sanguíneo). En cualquiera de estos últimos casos (en los que el suministro es intradérmico, pero se desea que el agente sea suministrado a la corriente sanguínea), la sHASEGP (y potencialmente un volumen de líquido en el que se inyecta) puede facilitar la dispersión del agente primero dentro de la dermis y de allí a la vasculatura drenando la dermis y, finalmente, al suministro mayor de sangre), como se describe e ilustra en la presente memoria.

El uso de las sHASEGP para mejorar la farmacocinética y/o la farmacodinámica de otros agentes terapéuticos o farmacológicos también se puede aplicar a agentes suministrados por rutas de administración distintas de la parenteral no IV. Por ejemplo, sin desear estar limitados por la teoría, se cree que la presencia de las sHASEGP en los espacios intersticiales dentro del organismo (que se puede conseguir por la administración local y/o sistémica de sHASEGP) tiende a promover canales intersticiales y un aumento en el flujo de líquido dentro del espacio intersticial que a su vez facilita tanto la difusión como el transporte convectivo de agentes disueltos con el fluido intersticial (tales como agentes farmacológicos y de otro tipo). A modo de ilustración, los agentes que se administran directamente al torrente sanguíneo (p. ej., por inyección intravenosa), o por vía oral (y por lo tanto entran en el torrente sanguíneo después de la absorción desde el tracto gastrointestinal, por ejemplo), todavía pueden estar sujetos a limitaciones en la post-absorción, es decir, en la fase de distribución de su farmacocinética. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que la sHASEGP puede mejorar el suministro para dirigir células mediante el aumento de la permeabilidad intersticial y el flujo de fluido y por lo tanto el aumento de la difusión y/o convección de agentes dentro del espacio intersticial (que forma efectivamente el intermedium entre casi todas las rutas de suministro de medicamentos y las células diana).

Además, se cree que los cambios en la presión oncótica provocados por la administración de las sHASEGP pueden contribuir a mejorar la administración de agentes farmacológicos. De nuevo, sin desear estar limitado por la teoría, la presencia de sHASEGP y la degradación concomitante a lo largo del lado intersticial de un tejido vascularizado, tenderían a disminuir la presión oncótica dentro del espacio intersticial que a su vez mejoraría la filtración de fluido desde la vasculatura en el espacio intersticial.

El potencial para disminuir la presión intersticial se considera que es particularmente importante en el contexto de muchos tipos de cáncer en el que se elevación de la presión intersticial dentro del tumor (presión intersticial en el tumor del TIF). Un alto TIF puede dar como resultado la impedancia relativa al flujo de fluido desde la vasculatura hacia el centro de un tumor, limitando así la cantidad de un agente anti-cáncer que alcanza eficazmente un tumor, los sitios concretos que son más profundos dentro de una masa tumoral. La introducción de las sHASEGP en los intersticios del tumor tendería por lo tanto a mejorar la prestación de los agentes anticancerosos suministrados localmente, así como sistémicamente disponibles que pueden penetrar más fácilmente el tumor cuando se reduce la presión oncótica intersticial y aumentan la difusión y/o el transporte convectivo. Las mediciones de TIF y conductividad hidráulica (K) dentro de los tumores (p. ej., utilizando moléculas marcadas tales como albúmina marcada con colorante azul de Evan) se pueden utilizar para evaluar cuantitativamente el efecto de diversas concentraciones de las sHASEGP en la dinámica de fluidos de tumores in vivo, como se ilustra en la presente memoria y/o en la técnica.

Exacerbando adicionalmente la dinámica de fluidos reducida en muchos tumores, y resaltando un beneficio potencial adicional de la aplicación de las sHASEGP a los tumores, el hecho es que muchos tumores presentan acumulación de glicosaminoglicanos, en particular hialuronano (que puede ser debido al hecho de que los vasos linfáticos, que son la ruta predominante para el catabolismo de ácido hialurónico, se deterioran o están ausentes en muchos tumores). Tal exceso de ácido hialurónico puede contribuir a impedir el conductividad hidráulica. La introducción de las sHASEGP por lo tanto se puede utilizar para contrarrestar la acumulación de glicosaminoglicanos en muchos tumores, mejorando la conductividad hidráulica dentro del tumor y volviéndolos de manera efectiva más susceptibles a los agentes anti-tumorales (ya se suministren localmente o sistémicamente).

Como apreciarán los expertos en la técnica, los principios descritos en la presente memoria también pueden aplicarse a otros numerosos medicamentos et al. agentes que se desean suministrar a sitios dentro del organismo, tal como para la prevención, el diagnóstico y/o el tratamiento de una enfermedad o de otro modo para modular funciones fisiológicas. Las clases ilustrativas de tales agentes (y miembros ilustrativos de los mismos) se describen en la presente memoria, y muchos más se conocen en la técnica o están en desarrollo.

Además de su uso en mejoras y/o reformulaciones potenciales de una variedad de medicamentos y/o agentes

administrados parenteralmente, las sHASEGP también se pueden emplear de forma útil en relación con agentes no parenterales (tales como agentes formulados en forma de píldoras, líquidos u otras formas para la ingestión y la absorción típica a través del tracto gastrointestinal). Por ejemplo, ya que la mayoría de los fármacos no parenterales deben en última instancia, llegar a las células en el intersticio con el fin de ejercer sus efectos deseados, el uso de las sHASEGP para mejorar la difusión y/o el transporte convectivo dentro del intersticio (ya sea sistémica o localmente (p. ej., administración local o dirigida de sHASEGP)) se puede aplicar para mejorar el grado y/o la velocidad a la que los no parenterales (así como los parenterales) alcanzan las células diana deseadas.

Además, se pueden reformular diversos agentes que se administran típicamente no parenteralmente (p. ej., por vía oral), o reformular sus ingredientes activos, para su uso en administraciones parenterales que se vuelven más eficaces y/o seguras combinándolas con las sHASEGP. Para ilustrar este enfoque ampliamente aplicable, la capacidad de las sHASEGP para facilitar el suministro dirigido a tejidos concretos (tal como la capacidad de las sHASEGP para proporcionar suministro transescleral a los tejidos dentro de la parte posterior del ojo) se puede utilizar para suministrar cualquiera de una variedad de agentes (incluyendo agentes previamente administrados por vía sistémica) directamente y preferentemente a un sitio localizado de interés dentro del organismo. Esto no solo puede proporcionar concentraciones más deseables y/o alcanzadas más rápidamente en el sitio de interés, sino que puede reducir sustancialmente problemas y limitaciones potenciales asociados con la administración sistémica en la que las concentraciones en sitios no deseados pueden ser iguales o incluso superar las concentraciones en el sitio diana deseado (desencadenando potencialmente efectos secundarios no deseados, también como agente de desecho). En algunos casos, los agentes que no son ampliamente utilizados o no se utilizan para ciertas indicaciones o en ciertos pacientes, por ejemplo, se puede aplicar eficazmente a beneficiar a los pacientes adicionales siendo co-formulados o co-administrados con las sHASEGP como se ha descrito e ilustrado en la presente memoria.

Como apreciarán los expertos en la técnica, la capacidad de emplear sHASEGP para mejorar, la velocidad y/o la biodistribución en la diana de agentes co-formulados y/o coadministrados, y para manipular otros aspectos de su farmacocinética o farmacodinámica (p. ej., con el fin de mejorar su perfil de riesgo:beneficio o facilitar su uso por los pacientes, familiares o los profesionales del cuidado de la salud), proporciona una gran oportunidad para la mejora de los medicamentos et al. agentes que se utilizan para tratar, diagnosticar o prevenir enfermedades.

Sin limitarse a un conjunto particular de aplicaciones, las glicosaminoglicanasas, incluyendo las sHASEGP como se describe en la presente memoria (así como otras hialuronidasas y otras glicosaminoglicanasas) se pueden utilizar para lograr eficazmente el suministro en embolada o de tipo embolada de cualquier número de agentes farmacológicos y de otros agentes por rutas parenterales no intravenosas, así como por otras rutas de administración (p. ej., mediante la mejora del suministro de agentes a y/o a través de un tejido diana después de salir del torrente sanguíneo (ya se hayan introducido en el torrente sanguíneo directamente (p. ej., mediante administración IV) o indirectamente (p. ej., mediante administración oral o parenteral no IV)).

Sin limitarse a un mecanismo específico de acción o aspecto del mismo, se cree que la capacidad de estas enzimas para degradar temporalmente componentes de la matriz intersticial entre las células (que representa una parte sustancial del espacio de fluido en el organismo y un espacio correspondientemente grande que debe ser atravesado para que los medicamentos et al. agentes lleguen a la mayoría de las células diana) puede promover significativamente el suministro de agentes a las células diana por uno o más de varios medios potencialmente sinérgicos. En primer lugar, mientras que el grueso del fluido intersticial exhibe un cierto grado de flujo, ese flujo es a menudo restringido o impedido por glicosaminoglicanos tales como el ácido hialurónico et al. componentes intersticiales. La capacidad de la glicosaminoglicanasas incluyendo sHASEGP (así como otras hialuronidasas y otras glicosaminoglicanasas) para abrir canales dentro de tales espacios intersticiales, como se describe e ilustra en la presente memoria, se puede utilizar para disminuir la impedancia y aumentar el grado y la velocidad de flujo "aguas abajo" como resultado de cualquier presión "aguas arriba" dada. En segundo lugar, en el caso de las inyecciones parenterales no IV de sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasas) y otro agente farmacológico o de otro tipo, el volumen de la inyección parenteral no IV se puede utilizar para aumentar la presión de impulsión o la carga de presión aguas arriba (p. ej., aumentando la presión hidrostática dentro de un espacio confinado), que puede promover adicionalmente el flujo. En tercer lugar, puesto que el volumen de fluido que comprende la sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasas) introducida y otro agente es impulsado de manera eficaz por el gradiente de aumento de la presión (es decir, el aumento del gradiente creado elevando la presión hidrostática asociada dentro del "bolo" inyectado y al mismo tiempo disminuyendo la presión intersticial dentro del tejido circundante), los solutos dentro del bolo pueden ser portados efectivamente (p. ej., mediante transporte convectivo) al tejido adyacente. Este fluido o bolo inyectados pueden ser por lo tanto movidos eficazmente y de manera relativamente rápida al tejido adyacente y suministrar cualquier agente farmacológico o de otro tipo introducido en o cerca del mismo sitio de introducción (p. ej., co-formulando o co-administrando el agente combinado con la sHASEGP u otra glicosaminoglicanasas).

A modo de ilustración, el uso de glicosaminoglicanasas tales como sHASEGP para abrir canales dentro de los espacios intersticiales, como se describe y se ilustra en la presente memoria, se puede utilizar para aumentar el flujo intersticial a y a través de tejidos tales como los tumores et al. en los que el flujo es típicamente impedido, y las

presiones intersticiales elevadas. Los ejemplos ilustrativos de estos principios como se describe en la presente memoria incluyen el uso de la sHASEGP para reducir la presión intersticial dentro de un tumor in vivo.

5 El aumento del flujo se puede aplicar del mismo modo a tejido normal para, p. ej., permitir que un agente anestésico, de diagnóstico, cosmético u otro estético o un agente farmacológico o de otro tipo sea suministrado a un tejido (p. ej., para modificar el tejido o introducir una formulación de depósito en un tejido). El aumento del flujo se puede aplicar del mismo modo a un primer tejido o tejido proximal para promover la administración de un agente a través del tejido de introducción a un tejido distal, cuyo el tejido distal puede a su vez ser el tejido diana deseado o una ruta hacia el tejido diana deseado. Los ejemplos ilustrativos de estos principios, como se describe en la presente memoria incluyen, por ejemplo: (i) el uso de las sHASEGP introducidas en el espacio episcleral que rodea el ojo para promover el suministro de agentes a través de la esclerótica con el fin de localizar tejidos diana distales dentro del interior del ojo tales como la retina y la coroides; y (ii) el uso de las sHASEGP introducidas por vía intradérmica para promover el suministro de agentes a través de las capas subdérmicas y al torrente sanguíneo, que a su vez puede ser el tejido diana (p. ej., para agentes modificadores de la sangre) o una ruta por la cual el agente o los agentes pueden ser suministrados a otros tejidos diana dentro del organismo.

20 A modo de ilustración adicional de estas técnicas y composiciones para promover el suministro de medicamentos et al. agentes a los tejidos deseados en el interior del organismo, se proporcionan los siguientes ejemplos adicionales. Mediante métodos como los descritos e ilustrados en la presente memoria, la farmacocinética y/o perfiles farmacodinámicos de los agentes farmacológicos y la absorción, distribución y/o perfiles de eficacia de otros agentes, pueden ser mejorados o modificados de otra manera. Además, los agentes que estaban limitados en esencia o en la práctica al suministro por una ruta (tal como mediante inyección IV) pueden ser suministrados por otras vías más seguras, menos intrusivas, menos costosas, y/o más convenientes.

25 A modo de ilustración adicional y sin estar limitado a un tipo particular de aplicación, un volumen (V) de líquido (L) que comprende una sHASEGP u otra glicosaminoglicanasa (Enzima GAG) se puede introducir en un sitio del tejido en el organismo (un Tejido de Dosificación). Mediante métodos como los descritos e ilustrados en la presente memoria, la Enzima GAG puede ser suministrada a y hasta cierto punto a través del tejido de dosificación. Sin estar limitado a un mecanismo particular de acción, la Enzima GAG se puede llevar eficazmente al Tejido de Dosificación por medio de transporte convectivo por el volumen de líquido (L). El transporte convectivo puede a su vez ser promovido en parte por la presión hidrostática asociada con L (que puede proporcionar una presión de impulsión) y en parte por la capacidad de la Enzima GAG para abrir canales dentro de los espacios intersticiales del Tejido de Dosificación (que puede reducir la impedancia aguas al flujo y con ello reducir la presión de resistencia). Por lo tanto se puede crear un diferencial de presión de impulsión del fluido y en la medida deseada se puede aumentar, por ejemplo, por medio de uno o ambos de los siguientes: (i) introduciendo y si se desea aumentando una presión hidrostática de impulsión (p. ej., introduciendo L en un espacio confinado y si se desea aumentando V); y (ii) reduciendo la impedancia aguas abajo al flujo (p. ej., mediante la introducción de la Enzima GAG, y si se desea aumentando su eficacia mediante, por ejemplo el aumento de su concentración, el aumento de su resistencia a la degradación (p. ej., mediante la PEGilación, super-sialación u otra modificación), y/o el aumento de su suministro por medio de transporte convectivo (p. ej., aumentando V)).

45 En ciertos ejemplos (p. ej., en los que se desea aumentar el grado o la velocidad de suministro), V es un volumen suficiente para distender temporalmente el sitio dentro del Tejido de Dosificación en el que se introduce la Enzima GAG. Como apreciarán los expertos en la técnica, el volumen (V) que puede ser acomodado y el grado resultante de distensión (D) depende del tejido concreto. Para fines de ilustración y no de limitación, el grado en que se produce la distensión varía, por ejemplo, de situaciones en las que (i) el Tejido de Dosificación es un espacio lleno de líquido relativamente grande y/o que se mueve rápidamente (tal como el torrente sanguíneo en relación con el suministro intravenoso o intraarterial), en cuyo caso L puede ser grande (p. ej., si se desean muchos mL) pero D tiende a ser relativamente mínima; (ii) el Tejido de Dosificación es un espacio lleno de líquido relativamente más pequeño y/o se mueve menos rápidamente (tal como el líquido cefalorraquídeo en relación con el suministro intratecal), en cuyo caso L todavía puede ser relativamente grande pero D puede ser más que mínima dependiendo del sitio preciso y el volumen de inyección; (iii) el Tejido de Dosificación es un espacio relativamente pequeño pero algo distensible (tal como el espacio episcleral que rodea el ojo con fines ilustrativos); o (iv) el Tejido de Dosificación es un espacio relativamente más denso y/o más confinado con mayor presión de resistencia (tal como la dermis en relación con el suministro intradérmico con fines ilustrativos).

60 Como apreciarán los expertos en la técnica, V puede oscilar de volúmenes de menos de 0,1 mL a volúmenes de más de 100 mL, para muchas aplicaciones en el intervalo de aproximadamente 0,5 mL a 20 mL, y para muchos en el intervalo de 1 mL a 10 mL, con frecuencia de 2 a 5 mL; pero se puede variar para situaciones concretas, como se ilustra en la presente memoria. V también puede ser optimizado específicamente dentro de tales intervalos para una aplicación concreta según se desee; por ejemplo, comparando perfiles farmacocinéticos y/o farmacodinámicos convencionales a lo largo de un intervalo de volúmenes de ensayo.

Como apreciarán los expertos en la técnica en vista de estas enseñanzas, mediante la combinación de la acción

rápida y el reinicio de la actividad de apertura de canal de la Enzima GAG (que tanto promueve como es promovida por su propio suministro), junto con un sistema de suministro que tanto promueve como es promovido por la actividad catalítica, se puede generar por lo tanto un sistema de administración de fármacos sinérgico se múltiple; como se describe adicionalmente y se ilustra en la presente memoria.

5 En un primer aspecto ilustrativo, un volumen de líquido (V) que comprende una sHASEGP u otra glicosaminoglicanasa (Enzima GAG) y uno o más agentes farmacológicos o de otro tipo (Agente o Agentes (tales como moléculas detectables u otros agentes de diagnóstico, anestésicos u otros agentes que modifican tejidos, agentes farmacológicos o farmacéuticamente eficaces, cosméticos u otros agentes estéticos et al. agentes que se desea introducir en uno o más tejidos dentro del organismo) se introduce en un primer sitio del tejido en el organismo (un Tejido de Dosificación) que es en sí mismo un tejido deseado diana (un Tejido Diana) para el agente. Por medio de los métodos descritos e ilustrados en la presente memoria, el Agente o los Agentes se suministran a y por todo el Tejido Diana en mayor medida y/o velocidad de lo que ocurriría en ausencia de la Enzima GAG.

15 Como apreciarán los expertos en la técnica en relación con éste y los otros aspectos ilustrativos de la presente memoria, el Tejido de Dosificación puede ser cualquiera de una variedad de tejidos que se puede alcanzar fácilmente desde fuera del organismo (p. ej., utilizando distintas rutas de administración como se ha descrito e ilustrado en la presente memoria y/o como se conoce en la técnica) o desde el interior del organismo (p. ej., en relación con la cirugía o utilizando cualquiera de una variedad de enfoques y dispositivos no quirúrgicos o mínimamente invasivos para llegar a los tejidos dentro del organismo). Tales tejidos de dosificación incluyen los descritos e ilustrados aquí, así como otros conocidos en la técnica.

25 Como será igualmente apreciado por los expertos en la técnica en relación con esto y los otros aspectos ilustrativos de la presente memoria, el Tejido Diana puede ser cualquiera de una variedad de tejidos a los que se desea que se suministren una enzima GAG y potencialmente otro u otros Agentes (p. ej., (i) tejidos que son objeto de los esfuerzos para diagnosticar, prevenir o tratar una enfermedad (ya sea causada intrínsecamente tal como una enfermedad heredada o desarrollada o causada extrínsecamente tal como una infección), (ii) tejidos que se desea anestesiarse o modular de otra manera (p. ej., en el contexto de la cirugía y/u otros procedimientos); (iii) tejidos en los que se desea desencadenar una respuesta inmunitaria (p. ej., asociada con la vacunación); (iv) los tejidos que van a servir como un sitio de depósito para el agente o los agentes de liberación a otros tejidos; (v) tejidos que van a ser modificados para fines estéticos o cosméticos, y (vi) tejido o sitios en el organismo que van a ser modificados para otros fines). Tales Tejidos Diana incluyen los descritos e ilustrados en la presente memoria, así como otros conocidos en la técnica.

35 Como será igualmente apreciado por los expertos en la técnica en relación con lo anterior y con otros aspectos ilustrativos de la presente memoria, el agente o los agentes puede ser cualquiera de una variedad de moléculas, macromoléculas y complejos macromoleculares, que son o pueden ser utilizados para alterar o modular afecciones dentro del organismo (p. ej., (i) para propósitos de diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad (ya sea causada intrínsecamente tal como una enfermedad heredada o desarrollada o causada extrínsecamente tal como una infección) que afectan el Tejido Diana y/o tejidos adyacentes; (ii) para propósitos de anestesiarse o modular de otro modo la fisiología del Tejido Diana; (iii) para propósitos de desencadenar una respuesta inmunitaria como la asociada con la vacunación; (iv) para propósitos de utilizar el Tejido Diana como un sitio de depósito para liberar uno o varios agentes a otros tejidos; (v) para propósitos estéticos o cosméticos; y/o (vi) para otros propósitos servidos por el suministro de una enzima GAG y potencialmente otro Agente et al. Agentes a un tejido u otro sitio en el organismo). Tales Agentes incluyen las diversas clases de agentes y miembros de los mismos descritos e ilustrados en la presente memoria, así como otros miembros de estas clases de agentes, y otras clases de agentes (y miembros de los mismos) conocidos en la técnica.

50 En un segundo aspecto ilustrativo, se introduce un volumen de líquido (V) que comprende una sHASEGP u otra glicosaminoglicanasa (Enzima GAG) y uno o más agentes farmacológicos o de otro tipo (Agente o Agentes) en un sitio del tejido en el organismo (Tejido de Dosificación) que es adyacente o proximal a un tejido (Tejido B), que es en sí mismo un tejido diana deseado. Mediante los métodos descritos e ilustrados en la presente memoria, el Agente o los Agentes se suministran desde el Tejido A al Tejido Diana B en mayor medida y/o velocidad de lo que ocurriría en ausencia de la Enzima GAG.

55 En un tercer aspecto ilustrativo, un volumen de líquido (V) que comprende una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) (Enzima GAG) y uno o más agentes farmacológicos o de otro tipo (Agente o Agentes) se introduce en un sitio del tejido en el organismo (Tejido de Dosificación), que es proximal a uno o más tejidos (Tejidos Intermedios) situados entre los tejidos A y otro tejido o tejidos (Tejidos Distales) que son en sí mismos tejidos diana deseados o incluyen un tejido diana deseado (Tejidos Diana). Mediante los métodos descritos e ilustrados en la presente memoria, el Agente o los Agentes se suministran desde el Tejido A y a través de uno o más Tejidos Intermedios para llegar a uno o más Tejidos Diana en mayor medida y/o velocidad de lo que ocurriría en ausencia de la Enzima o Enzimas GAG.

60

En un cuarto aspecto ilustrativo, un volumen de líquido (V) que comprende una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) (Enzima GAG) y uno o más agentes farmacológicos o de otro tipo (Agente o Agentes) se introduce en un sitio del tejido en el organismo (Tejido de dosificación), que es proximal a uno o más tejidos de suministro, tales como el torrente sanguíneo, la linfa o el fluido cerebroespinal (Tejidos de Suministro), que son tejidos diana deseados o incluyen un tejido diana deseado. Mediante los métodos descritos e ilustrados en la presente memoria, el Agente o los Agentes se suministran desde el Tejido A a uno o más Tejidos de Suministro en mayor medida y/o velocidad de lo que ocurriría en ausencia de la Enzima o Enzimas GAG.

En un quinto aspecto ilustrativo, un volumen de líquido (V) que comprende una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) (Enzima GAG) y uno o más agentes farmacológicos o de otro tipo (Agente o Agentes) se introduce en un sitio del tejido en el organismo (Tejido de Dosificación), que es proximal a uno o más tejidos de suministro, tales como el torrente sanguíneo, la linfa o el fluido cerebroespinal (Tejidos de Suministro), que suministran el fluido a uno o más tejidos diana deseados (Tejidos Diana) dentro del organismo. Mediante los métodos descritos e ilustrados en la presente memoria, el Agente o los Agentes se suministran desde el Tejido A a uno o más Tejidos de Suministro y de allí a uno o más Tejidos Diana aguas abajo en mayor medida y/o velocidad de lo que ocurriría en ausencia de la Enzima o Enzimas GAG.

En un sexto aspecto ilustrativo, un volumen de líquido (V) que comprende una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) (Enzima GAG) junto con uno o más agentes farmacológicos o de otro tipo (Agente o Agentes) se introduce en uno o más tejidos de suministro, tales como el torrente sanguíneo, la linfa o el líquido cefalorraquídeo (Tejidos de Suministro) que suministran fluido a uno o más Tejidos Diana deseados (p. ej., a través del torrente sanguíneo que abastece el Tejido Diana). Mediante los métodos descritos e ilustrados en la presente memoria, el Agente o los Agentes penetran el Tejido Diana en mayor medida y/o velocidad de lo que ocurriría en ausencia de la Enzima o Enzimas GAG.

En un séptimo aspecto ilustrativo, un volumen de líquido (V) que comprende una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) (Enzima GAG) se introduce en un sitio del tejido en el organismo (Tejido A) que es un tejido diana deseado o cerca de un tejido diana deseado (Tejido Diana), y uno o más agentes farmacológicos o de otro tipo (Agente o Agentes) se introducen en el organismo mediante otra ruta de administración (p. ej., mediante administración oral o intravenosa) que permite que el agente (s) para alcance el Tejido Diana (p. ej. a través del torrente sanguíneo que abastece el Tejido Diana, después de la absorción o inyección en la sangre). Mediante los métodos descritos e ilustrados en la presente memoria, el Agente o los Agentes penetran el Tejido Diana en mayor medida y/o velocidad de lo que ocurriría en ausencia de la Enzima o Enzimas GAG.

En un octavo aspecto ilustrativo, un volumen de líquido (V) que comprende una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) (Enzima GAG) se introduce en un sitio o sitios del tejido dentro del organismo (Sitio o Sitios del Tejido), que tiene una presión intersticial elevada. Mediante los métodos descritos e ilustrados en la presente memoria, la presión intersticial dentro del Sitio o los Sitios del tejido se reduce por la actividad degradativa de la Enzima o Enzimas GAG.

En un noveno aspecto ilustrativo, un volumen de líquido (V) que comprende una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) (Enzima GAG) se introduce en uno o varios sitios del tejido dentro del organismo (Sitio o Sitios del tejido), que tienen un exceso de hialuronano u otros glicosaminoglicanos. Mediante los métodos descritos e ilustrados en la presente memoria, el exceso de ácido hialurónico u otros glicosaminoglicanos dentro del Sitio o Sitios del tejido se reduce por la actividad degradativa de la Enzima o Enzimas GAG.

En un décimo aspecto ilustrativo, un volumen de líquido (V) que comprende una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) (Enzima GAG) se introduce en uno o varios sitios del tejido dentro del organismo (Sitio o Sitios del Tejido) que están en o cerca de un punto de acceso deseado para la hipodermoclis (un Sitio de Clisis). Mediante los métodos descritos e ilustrados en la presente memoria, los líquidos pueden ser suministrados a continuación a y a través del Sitio o los Sitios de clisis en mayor medida y/o velocidad de lo que ocurriría en ausencia de la Enzima o Enzimas GAG.

Como apreciarán los expertos en vista de las descripciones detalladas y la realizaciones ilustrativas proporcionadas en la presente memoria, se puede co-introducir cualquiera de una gran variedad de agentes (p. ej., mediante co-formulación o co-administración con la Enzima GAG) y se puede emplear cualquiera de una variedad de Enzimas GAG a concentraciones en intervalos tales como los proporcionados en la presente memoria pero típicamente optimizadas para el tejido concreto y objetivo implicado. El volumen de líquido (V) aplicado en los aspectos ilustrativos anteriores generalmente dependerá de la naturaleza del sitio de introducción y será igualmente típicamente optimizado para el tejido concreto y objetivo implicado. Como se ha descrito e ilustrado en la presente memoria, en el caso de las administraciones parenterales no IV, V se puede aumentar (dentro de las limitaciones concretas del sitio del tejido) con el fin de proporcionar una mayor presión de impulsión hidrostática que, junto con la impedancia disminuida asociada con la degradación de hialuronano u otros glicosaminoglicanos, puede hacer eficazmente que el volumen de líquido funcione como un bolo que transporte cualquier soluto que contiene en el

espacio intersticial aguas abajo y potencialmente más allá.

Por lo tanto, se describe en la presente memoria una variedad de técnicas que emplean hialuronidasas (y/u otras glicosaminoglicanasas) para promover el suministro de agentes farmacológicos y de otro tipo a los sitios dentro del organismo, así como una familia de glicoproteínas hialuronidasas activas neutras secretadas eucarióticas denominadas sHASEGP, y dominios funcionales de las mismas, especialmente dominios Hialuronidasa (o catalíticos) de las mismas, muteínas et al. derivados y análogos de los mismos. También se proporcionan en la presente memoria ácidos nucleicos que codifican las sHASEGP. Además se proporcionan formulaciones, co-formulaciones y usos terapéuticos de dichas sHASEGP (incluyendo mediante co-administración con otros agentes) para tratar, prevenir o diagnosticar enfermedades, y para su uso como enzimas de modificación de tejidos.

Breve descripción de los dibujos

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

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones: A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención o invenciones. En caso de que exista una pluralidad de definiciones para los términos de 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 en particular la información en Internet puede aparecer y desaparecer, pero la información equivalente se puede encontrar buscando en Internet. La referencia a esto evidencia la disponibilidad y difusión pública de tal información.

En la presente memoria, las abreviaturas de los grupos protectores, aminoácidos et al. compuestos, están, a menos que se indique lo contrario, de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas, o la IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (véase, (1972) Biochem. 11: 942-944).

Según se utiliza en la presente memoria, hialuronidasa eucariótica se refiere a una familia diversa de glicosaminoglicanos endoglucosaminidasas, en donde un residuo de glutamato en la Hialuronidasa hidroliza los enlaces beta 1,4 del hialuronano y sulfatos de condroitina a través de un mecanismo catalítico ácido-base.

De particular interés son las hialuronidasas o sHASEGP activas a pH neutro solubles de mamífero, incluyendo las de origen humano. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson et al., (1987) Molecular Biology of the Gene, 4^a Edición, The Benjamin/Cummings Pub. co., pág. 224).

Según se utiliza en la presente memoria, HASEGP anclada a membrana, se refiere a una familia de hialuronidasas ancladas a membrana que comparten características estructurales comunes a las descritas en la presente memoria. Como se ha descrito e ilustrado en la presente memoria, las hialuronidasas (es decir glicosaminoglicanasas capaces de romper el hialuronano, preferiblemente aquellas que exhiben al menos alguna actividad en los intervalos de pH neutro) que normalmente están ancladas a la membrana pueden ser convertidas en HASEGP solubles o sHASEGP mediante la eliminación o modificación de otra manera de una o más de las regiones que están asociadas con el anclaje de la hialuronidasa en la membrana.

Según se utiliza en la presente memoria, la hialuronidasa soluble se refiere a un polipéptido caracterizado por su solubilidad en condiciones fisiológicas. La HASEGP soluble puede diferenciarse por ejemplo por su reparto en la fase acuosa de una solución de Triton X-114 calentada a 37°C (Bordier et al. J Biol Chem. 25 de Feb. de 1981;256 (4):1604-7). La HASEGP anclada a lípidos por otra parte se repartirá en la fase rica en detergente, pero se repartirá en la fase pobre en detergente o acuosa después del tratamiento con Fosfolipasa C.

Por lo tanto, la referencia, por ejemplo, a "sHASEGP" abarca todas las glicoproteínas codificadas por la familia de genes de sHASEGP, incluyendo pero no limitadas a: sHASEGP humana, sHASEGP de ratón, o una molécula equivalente obtenida de cualquier otra fuente o que se ha preparado sintéticamente o que exhibe la misma actividad. Las secuencias de moléculas de ácido nucleico codificantes y las secuencias de aminoácidos codificadas de sHASEGP y/o dominios de las mismas ilustrativas se exponen, por ejemplo en el SEQ ID NO: 4. El término también abarca las sHASEGP con sustituciones de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad de cada miembro y también abarca variantes de corte y empalme de las mismas. Las sustituciones adecuadas, incluyendo, aunque no necesariamente, sustituciones conservativas de aminoácidos, son conocidas por los expertos en esta técnica y pueden realizarse sin eliminar la actividad biológica, tal como la actividad catalítica, de la molécula

resultante.

Según se utiliza en la presente memoria, una sHASEGP, siempre que sea citada en la presente memoria, incluye al menos uno o todos o cualquier combinación de: un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 6 o por una secuencia de nucleótidos que incluye nucleótidos que codifican los aminoácidos 1-509 del SEQ ID NO: 1; un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones de baja, moderada o alta rigurosidad a la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO:6; un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 1-509 del SEQ ID NO: 1; un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 o como aminoácidos 1-448 del SEQ ID NO: 4.

En particular, se proporciona el polipéptido sHASEGP, con los dominios hialuronidasa como se indica en SEQ ID NO: 4. El polipéptido es una cadena polipeptídica sencilla o doble. También se proporcionan las porciones más pequeñas del mismo que conservan la actividad hialuronidasa. Los dominios hialuronidasa de las sHASEGP varían en tamaño y constitución, incluyendo inserciones y deleciones en bucles superficiales. Por lo tanto, para los propósitos de la presente memoria, el dominio catalítico es una porción de una sHASEGP, como se define en la presente memoria, y es homólogo a un dominio de otras secuencias de tipo hialuronidasa, tales como HYAL1, HYAL2, HYAL3, que se han identificado previamente; no se reconoció, sin embargo, que una forma de cadena sencilla aislada del dominio Hialuronidasa humano pudiera funcionar en ensayos in vitro. Los residuos necesarios para la actividad aspartato y glutamato están presentes en motivos conservados.

Según se utiliza en la presente memoria, un "dominio hialuronidasa neutro de una sHASEGP soluble" se refiere a un dominio endoglucosaminidasa beta 1,4 de una sHASEGP que presenta actividad Hialuronidasa a pH neutro, es soluble en las condiciones descritas y comparte homología y características estructurales con los dominios de la familia de hialuronidasa glicosil-hidrolasa pero contiene secuencias adicionales en el extremo carboxilo terminal que son requeridas para la actividad neutra. Por lo tanto es al menos la porción mínima del dominio la que presenta actividad hialuronidasa como se evalúa por ensayos convencionales in vitro y sigue siendo soluble. En la presente memoria se contemplan dichos dominios hialuronidasa y porciones catalíticamente activas de los mismos. También se proporcionan formas truncadas del dominio Hialuronidasa que incluyen el fragmento más pequeño del mismo que actúa catalíticamente como una forma de cadena sencilla. Según se utiliza en la presente memoria y en la técnica, neutra o activo a pH neutro se refiere a una actividad que exhibe la proteína a pH neutro (p. ej., que exhibe actividad a pH de aproximadamente 7) y que, por tanto, es activa en un intervalo de pH característico de muchos tejidos fisiológicos. Como también será apreciado por los expertos en la técnica, una proteína generalmente exhibe un espectro de actividad en torno a su pH óptimo. El pH óptimo de una proteína activa a pH neutro estará típicamente dentro de una a varias unidades de pH por encima o debajo de pH 7, pero su intervalo de actividad se puede extender a lo largo de muchas unidades de pH.

Un dominio Hialuronidasa de una sHASEGP, cada vez que sea citado en la presente memoria, incluye al menos uno o todos o cualquier combinación de o una porción catalíticamente activa de: un polipéptido de glicoproteína ligada a N que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 1; un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones de baja, moderada o alta rigurosidad a la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 6; un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 1; un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90 %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1; y/o un dominio Hialuronidasa de un polipéptido codificado por una variante de empalme de la sHASEGP.

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

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

Según se utiliza en la presente memoria, el dominio catalíticamente activo de una sHASEGP se refiere al dominio endoglucosaminidasa activo neutro como se define por la actividad in vitro hacia un sustrato de glicosaminoglicano.

Las sHASEGP de interés incluyen aquellas que son activas contra sulfatos de condroitina y proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) in vivo e in vitro; y aquellas que son activas contra hialuronano. Según se utiliza en la presente memoria, una sHASEGP humana es una codificada por un ácido nucleico, tal como ADN, presente en el genoma de un ser humano, incluyendo todas las variantes alélicas y variaciones conservativas siempre que no sean variantes encontradas en otros mamíferos.

Según se utiliza en la presente memoria, el ácido nucleico que codifica un dominio Hialuronidasa o porción catalíticamente activa de una sHASEGP" se interpretará como una referencia a un ácido nucleico que codifica solo el dominio hialuronidasa de cadena sencilla recitado o una porción activa del mismo, y no las otras porciones contiguas de la sHASEGP como una secuencia continua.

Según se utiliza en la presente memoria, "enfermedad" o "trastorno" se refieren a una afección patológica en un organismo como resultado de, p. ej., una infección o defecto genético, y se caracterizada por síntomas identificables.

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 ácido nucleico genómico, tal como ADN, que da como resultado más de un tipo de ARNm. En la presente memoria se proporcionan variantes de empalme de las sHASEGP.

Según se utiliza en la presente memoria, el dominio Hialuronidasa de una proteína sHASEGP se refiere al dominio Hialuronidasa de una sHASEGP que presenta actividad endoglucosaminidasa a pH neutro. Por lo tanto es al menos la porción mínima de la proteína que presenta actividad endoglucosaminidasa según se evalúa por ensayos convencionales in vitro. Los dominios hialuronidasa humanos ilustrativos incluyen al menos una porción suficiente de secuencias de aminoácidos expuestas en el SEQ ID NO: 4 que presentan actividad endoglucosaminidasa.

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

Para los dominios hialuronidasa de PH20 por ejemplo, los residuos dentro de la región N-terminal pueden ser críticos aunque no suficientes para la actividad. Mediante la aplicación de técnicas tales como las mostradas en la presente memoria se pueden generar dominios hialuronidasa de sHASEGP el que son catalíticamente activos. A modo de ilustración, si bien mientras que el dominio de Hialuronidasa PH20 humana generalmente requiere los aminoácidos N-terminales del mismo para su actividad; la porción C-terminal se puede trunca hasta el último residuo de Cisteína, sin embargo, requiere aminoácidos adicionales para ser óptimamente activa. La cantidad que se puede eliminar puede determinar empíricamente sometiendo a ensayo el polipéptido para determinar la actividad Hialuronidasa en un ensayo in vitro que evalúe la escisión catalítica.

Por lo tanto se contemplan porciones más pequeñas de los dominios hialuronidasa, particularmente los dominios de cadena sencilla de los mismos que conservan la actividad hialuronidasa. Tales versiones más pequeñas son generalmente versiones truncadas C-terminales de los dominios hialuronidasa. Los dominios hialuronidasa varían en tamaño y constitución, incluyendo inserciones y deleciones en bucles superficiales. Tales dominios exhiben estructura conservada, incluyendo al menos una característica estructural, tal como el donador de protones, y/u otras características de dominios hialuronidasa de endoglucosaminidasas. Por lo tanto, para los propósitos de la presente memoria, el dominio Hialuronidasa es una porción de cadena sencilla de una sHASEGP, según se define en la presente memoria, pero es homólogo en sus características estructurales y retención de la secuencia de similitud u homología del dominio Hialuronidasa de otras secuencias de tipo hialuronidasa. La glicoproteína exhibe actividad hialuronidasa en forma de cadena sencilla.

Según se utiliza en la presente memoria, homóloga significa más de aproximadamente 25% de identidad de secuencia de ácido nucleico, tal como 25% 40%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%. Si fuera necesario, se especificará el porcentaje de homología. Los términos "homología" e "identidad" se usan indistintamente. En general, las secuencias se alinean de manera que se obtenga el emparejamiento de mayor orden (véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed, Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Compute Analysis of Sequence Data, Part/, Griffin, A. M., y Griffin, H. G, eds, Humana Press, Nueva Jersey, 1994.; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carillo et al. (1988), Slam J Applied Math 48] : 1073).

Mediante la identidad de secuencia, el número de aminoácidos conservados es determinado por programas de algoritmos de alineamiento convencionales, y se utilizan con las penalizaciones por hueco por defecto establecidas

por cada proveedor. Las moléculas de ácidos nucleicos sustancialmente homólogos hibridarían típicamente a rigurosidad moderada o a alta rigurosidad a lo largo de la longitud del ácido nucleico o a lo largo de al menos aproximadamente 70%, 80% o 90% de la molécula de ácido nucleico completa 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 de ácido nucleico tengan secuencias de nucleótidos que sean al menos, por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% "idénticas" 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: 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 del Centro Nacional para la base de datos de Información sobre Biotecnología se puede utilizar para determinar la identidad. Otros programas comercialmente o públicamente disponibles incluyen, DNASTAR "MEGALIGN" PROGRAM (Madison, WI) y el programa "Gap" del University of Wisconsin Genetics Computer Group (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 informático GAP, por ejemplo Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48: 443, revisado por Smith y Waterman Adv. Appl. Math (1981) 2:482). En resumen, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son similares, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación 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 y 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" representa una comparación entre una prueba y un polipéptido de referencia o polinucleótido.

Según se utiliza en la presente memoria, el término al menos "90% idéntica a" se refiere a identidades por ciento de 90 a 99,99 con relación a los polipéptidos de referencia. Identidad a un nivel de 90% o más es indicativa del hecho de que, suponiendo para fines ilustrativos se comparan una longitud de polinucleótido de ensayo y de referencia de 100 aminoácidos. No más de 10% (es decir, 10 de cada 100) aminoácidos en el polipéptido de ensayo difieren del de los polipéptidos 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 una secuencia de aminoácidos o pueden agruparse en una o más localizaciones de longitud variable hasta el máximo permisible, por ejemplo, diferencia de 10/100 aminoácidos (identidad de aproximadamente 90%). Las diferencias se definen como sustituciones o deleciones de ácido nucleico o de aminoácidos. A nivel de homologías o identidades por encima de aproximadamente 85-90%, el resultado debería ser independiente del programa y de los parámetros de hueco establecidos; dichos altos niveles de identidad pueden evaluarse fácilmente, con frecuencia sin depender del soporte lógico.

Según se utiliza en la presente memoria, el cebador se refiere a un oligonucleótido que contiene dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, típicamente más de tres, a partir de los cuales se puede iniciar la síntesis de un producto de extensión del cebador. Las condiciones experimentales propicias para la síntesis incluyen la presencia de nucleósidos trifosfato y un agente para la polimerización y extensión, tal como ADN polimerasa, y un tampón adecuado, temperatura y pH.

Según se utiliza en la presente memoria, los animales incluyen cualquier animal, tal como, pero no limitado, cabras, vacas, ciervos, ovejas, roedores, cerdos y seres humanos. Los animales no humanos, excluyen a los seres humanos como animales contemplado. Las sHASEGP proporcionadas en la presente memoria son de cualquier fuente, animal, vegetal, procariota y fúngica. Las sHASEGP preferidas son de origen animal, incluyendo origen mamífero, y más preferiblemente son de origen humano en el caso de su uso en seres humanos.

Según se utiliza en la presente memoria, la terapia genética implica la transferencia de ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, a ciertas células, células diana, de un mamífero, particularmente un ser humano, con un trastorno o afecciones para las que se solicita dicha terapia. El ácido nucleico, tal como ADN, se introduce en las células diana seleccionadas de tal manera que el ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, se expresa y se produce un producto terapéutico codificado por el mismo.

Alternativamente, el ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, puede de alguna manera mediar en la expresión del ADN que codifica el producto terapéutico, o puede codificar un producto, tal como un péptido o ARN que de alguna manera media, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. La terapia genética también se puede utilizar para suministrar ácido nucleico que codifica un producto génico que sustituye a un gen defectuoso o

5 complementa un producto génico producido por el mamífero o la célula en la que se introduce. El ácido nucleico introducido puede codificar un compuesto terapéutico, tal como un inhibidor del factor de crecimiento del mismo, o un factor de necrosis tumoral o inhibidor del mismo, tal como un receptor del mismo, que no se produce normalmente en el anfitrión mamífero o que no se produce en cantidades terapéuticamente eficaces o en un momento terapéuticamente útil. El ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, que codifica el producto terapéutico puede modificarse antes de la introducción en las células del anfitrión afligido con el fin de mejorar o alterar de otro modo el producto o la expresión del mismo. La terapia genética también puede implicar el suministro de un inhibidor o represor u otro modulador de la expresión génica.

10 Según se utiliza en la presente memoria, el ácido nucleico heterólogo es el ácido nucleico que codifica las proteínas (o, si es ADN, codifica ARN que codifica las proteínas) que no son producidas normalmente in vivo por la célula en la que se expresa o que media o codifica mediadores que alteran la expresión de ácido nucleico endógeno, tal como ADN, afectando a la transcripción, traducción, u otros procesos bioquímicos regulables. Ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, también se puede hacer referencia a un ácido nucleico foráneo, tal como ADN. Cualquier ácido nucleico, tal como ADN, que un experto en la técnica reconocería o consideraría heterólogo o extraño a la célula en la que se expresa en la presente memoria está abarcado por el ácido nucleico heterólogo; ácido nucleico heterólogo incluye ácido nucleico añadido exógenamente que también se expresa de forma endógena. Los ejemplos de ácido nucleico heterólogo incluyen, pero no se limitan a, ácido nucleico que codifica proteínas marcadoras rastreables, tales como una proteína que confiere resistencia a medicamentos, ácido nucleico que codifica sustancias terapéuticamente eficaces, tales como agentes anti-cancerosos, enzimas y hormonas, y ácidos nucleicos (tales como ADN y ARN), que codifican directa o indirectamente otros tipos de proteínas, tales como anticuerpos. Los anticuerpos que están codificados por el ácido nucleico heterólogo pueden secretarse o expresarse en la superficie de la célula en la que se ha introducido el ácido nucleico heterólogo.

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

30 Generalmente, aunque no necesariamente, tal ácido nucleico codifica ARN y/o proteínas que no son producidas normalmente por la célula en la que se expresa.

Según se utiliza en la presente memoria, un producto terapéuticamente eficaz es un producto que está codificado por el ácido nucleico heterólogo, típicamente ADN, que, tras la introducción del ácido nucleico en un anfitrión, se expresa un producto que mejora o elimina los síntomas, manifestaciones de una enfermedad heredada o adquirida o que cura la enfermedad.

35 Según se utiliza en la presente memoria, la recitación de que una glicoproteína consiste esencialmente en el dominio Hialuronidasa significa que la única porción de sHASEGP del polipéptido es un dominio Hialuronidasa o una porción catalíticamente activa del mismo. El polipéptido puede opcionalmente, y generalmente, incluir secuencias de aminoácidos no derivadas de sHASEGP adicionales.

40 Según se utiliza en la presente memoria, dominio se refiere a una porción de una molécula, p. ej., glicoproteínas o ácidos nucleicos codificantes que es estructuralmente y/o funcionalmente diferente de otras porciones de la molécula.

45 Según se utiliza en la presente memoria, Hialuronidasa se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis de glicosaminoglicanos incluyendo hialuronanos.

50 Para mayor claridad, la referencia a Hialuronidasa se refiere a todas las formas y serán designadas específicamente las formas concretas. Para los fines de la presente memoria, el dominio Hialuronidasa incluye las formas unidas a membrana y solubles de una proteína sHASEGP.

55 Según se utiliza en la presente memoria, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo los ácidos nucleicos de proteínas (PNA) y mezcla de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser de hebra sencilla o doble. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, opcionalmente marcados con un marcador detectable, tal como un colorante fluorescente o radiomarcador, se contemplan generalmente las moléculas de cadena sencilla. Dichas moléculas son típicamente de una longitud tal que su diana es estadísticamente única o de bajo número de copias (típicamente menor de 5, generalmente menor de 3) para sondear o cebar una biblioteca. Como es sabido en la técnica, en general, una sonda o cebador contiene al menos 14, 16, 20 o 30 residuos de secuencia contigua o casi contigua 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.

60 Según se utiliza en la presente memoria, el ácido nucleico que codifica un fragmento o porción de una sHASEGP se refiere a un ácido nucleico que codifica solo el fragmento o porción de sHASEGP recitados y no las otras porciones contiguas de la sHASEGP.

Según se utiliza en la presente memoria, la conexión operativa del ácido nucleico heterólogo a secuencias reguladoras y efectoras de nucleótidos, tales como promotores, potenciadores, sitios de parada transcripcionales y traduccionales, y otras secuencias señal se refiere a la relación entre dicho ácido nucleico, tal como ADN, y dichas secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, la unión operativa de ADN heterólogo a un promotor se refiere a la relación funcional (y típicamente física) entre el ADN y el promotor de tal manera que la transcripción de tal ADN es iniciada a partir del promotor por una ARN polimerasa que reconoce específicamente, se une a y transcribe el ADN en marco de lectura. Por lo tanto, conectado operativamente o asociado operativamente se refiere a la relación funcional de ácido nucleico, tal como ADN, con secuencias reguladoras y efectoras de nucleótidos, tales como promotores, potenciadores, sitios de parada transcripcionales y traduccionales, y otras secuencias señal. Con el fin de optimizar la expresión y/o transcripción in vitro, puede ser necesario eliminar, añadir o alterar porciones no traducidas 5' de los clones para eliminar codones extra de iniciación de la traducción (es decir de inicio) alternativos apropiados potenciales u otras secuencias que pueden interferir en, o reducir la expresión, ya sea en el nivel de transcripción o traducción. Alternativamente, los sitios de unión al ribosoma consenso (véase, por ejemplo, Kozak J. Biol. Chem. 266: 19867-19870 (1991) se pueden insertar inmediatamente 5' del codón de inicio y pueden aumentar la expresión. La conveniencia (o necesidad) de tal modificación se puede determinar empíricamente.

Según se utiliza en la presente memoria, una secuencia complementaria a al menos una porción de un ARN, con referencia a los oligonucleótidos antisentido, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad para ser capaz de hibridar con el ARN, generalmente en condiciones de rigurosidad moderada o alta, formando un dúplex estable; en el caso de los ácidos nucleicos antisentido de sHASEGP de doble hebra, se puede someter a ensayo por lo tanto una sola hebra del ADN dúplex (o ARNdh), o se puede someter a ensayo la formación de triplex. La capacidad para hibridar depende del grado de complementariedad y la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto mayor sea el ácido nucleico que hibrida, más emparejamientos erróneos de bases con un ARN que codifica sHASEGP puede contener y aún formar un dúplex estable (o triplex, según sea el caso). Un experto en la técnica puede determinar un grado tolerable de emparejamientos erróneos mediante el uso de procedimientos convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Para los fines de la presente memoria, las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar en cualquiera de las sHASEGP y dominios Hialuronidasa de las mismas, siempre que la proteína resultante exhiba actividad Hialuronidasa. Las sustituciones de aminoácidos contempladas incluyen sustituciones conservativas, tales como las expuestas en la Tabla 1, y otras modificaciones que no eliminen la actividad proteolítica. Como se describe en la presente memoria, también se contemplan sustituciones que alteran propiedades de las proteínas, tales como la eliminación de sitios de escisión et al. sitios; dichas sustituciones son generalmente no conservativas, pero pueden ser efectuadas fácilmente por los expertos en la técnica.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas son conocidas por los expertos en esta técnica y se pueden realizar en general, sin eliminar (y preferiblemente sin alterar sustancialmente) la actividad biológica, por ejemplo la actividad enzimática, de la molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, p. ej., Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4ª Edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p. 224). También se incluye dentro de la definición, el fragmento catalíticamente activo de una sHASEGP, particularmente una porción hialuronidasa de cadena sencilla. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se realizan, por ejemplo, de acuerdo con las establecidas en la Tabla 1 como sigue:

50 TABLA 1 Sustitución Conservativa del residuo original Ala (A) Gly; Ser, Abu Arg (R) Lys, Orn Asn (N) Gln; His Cys (C) Ser Gln (Q) Asn Glu (E) ASP Gly (G) Ala; Pro His (H) Asn; Gln Ile (I) Leu; Val; Met; Nle; Nva Leu (L); Val; Met; Nle; Nva Lys (K) Arg; Gln; Glu Met (M) Leu; Tyr; Ile; Nle Val Orn Lys; Arg Phe (F) Met; Leu; Tyr Ser (S) Thr Thr (T) Ser Trp (W) Tyr Tyr (Y) Trp; Phe Val (V) ILE; Leu; Met; Nle; Nva. Otras sustituciones también son permisibles y pueden determinarse empíricamente o de acuerdo con sustituciones conservativas conocidas.

Según se utiliza en la presente memoria, Abu es el ácido 2-aminobutírico; Nle es norleucina; Nva es norvalina; Orn es ornitina. Según se utiliza en la presente memoria, los aminoácidos, que se producen en las diversas secuencias de aminoácidos que aparecen en la presente memoria, se identifican de acuerdo a sus abreviaturas, de tres letras o de una letra bien conocidas. Los nucleótidos, que aparecen en los diversos fragmentos de ADN, se designan con las denominaciones de una sola letra convencionales utilizadas rutinariamente en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, una sonda o cebador basado en una secuencia de nucleótidos descrita en la presente memoria, incluye una secuencia de nucleótidos de al menos 10, 14, típicamente al menos 16 nucleótidos contiguos del SEQ ID NO:6, e incluso más preferiblemente una secuencia de nucleótidos de al menos 20, 30, 50 o 60 100 nucleótidos contiguos del SEQ ID NO: 6. La longitud de la sonda o cebador para la hibridación única está en función de la complejidad del genoma de interés.

Según se utiliza en la presente memoria, la mejora de los síntomas de un trastorno concreto mediante la administración de una composición farmacéutica concreta se refiere a cualquier disminución, ya sea permanente o

temporal, duradera o transitoria que se puede atribuir o asociar a la administración de la composición.

5 Según se utiliza en la presente memoria, los polinucleótidos antisentido se refieren a secuencias sintéticas de bases de nucleótidos complementarias a ARNm o a la cadena efectora del ADN de doble hebra. La mezcla de polinucleótidos efectores y antisentido en condiciones apropiadas conduce a la unión de las dos moléculas, o a la hibridación. Cuando estos polinucleótidos se unen a (hibridan con) ARNm, se produce la inhibición de la síntesis de proteínas (traducción). Cuando estos polinucleótidos se unen a ADN de doble hebra, se produce la inhibición de la síntesis de ARN (transcripción).

10 La inhibición resultante de la traducción y/o transcripción conduce a una inhibición de la síntesis de la proteína codificada por la cadena efectora. Las moléculas de ácido nucleico antisentido contienen típicamente un número suficiente de nucleótidos para unirse Específicamente a un ácido nucleico diana, generalmente al menos 5 nucleótidos contiguos, a menudo al menos 14 o 16 o 30 nucleótidos contiguos o nucleótidos modificados complementarios a la porción codificante de una molécula de ácido nucleico que codifica un gen de interés, por
15 ejemplo, ácido nucleico que codifica un dominio Hialuronidasa de cadena sencilla de una SHASEGP.

Según se utiliza en la presente memoria, una matriz se refiere a una colección de elementos, tales como anticuerpos, que contienen tres o más miembros. Una matriz direccionable es una en la que los miembros de la matriz son identificables, típicamente por su posición en un soporte en fase sólida. Por lo tanto, en general los
20 miembros de la matriz se inmovilizan en loci identificables discretos en la superficie de una fase sólida.

Según se utiliza en la presente memoria, el anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina, ya sea natural o producida de manera parcialmente o totalmente sintética, incluyendo cualquier derivado del mismo que retiene la capacidad de unión específica del anticuerpo. Por lo tanto anticuerpo incluye cualquier proteína que tiene un dominio de unión que
25 es homólogo o sustancialmente homólogo a un dominio de unión de inmunoglobulina. Los anticuerpos incluyen miembros de reivindicaciones de inmunoglobulinas cualesquiera, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

Según se utiliza en la presente memoria, fragmento de anticuerpo se refiere a cualquier derivado de un anticuerpo que tiene menos que la longitud completa, que conserva al menos una parte de la capacidad de unión específica del anticuerpo completo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a Fab, Fab', F(AB)₂, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv, diacuerpo dsFV y fragmentos Fd. El fragmento puede incluir múltiples cadenas conectadas entre sí, tal como mediante puentes disulfuro. Un fragmento de anticuerpo contiene generalmente al
30 menos aproximadamente 50 aminoácidos y típicamente al menos 200 aminoácidos.

35 En la presente memoria, un fragmento de anticuerpo Fv se compone de un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera unidos por interacciones no covalentes.

Según se utiliza en la presente memoria, un dsFV se refiere a un Fv con un enlace disulfuro intermolecular modificado genéticamente.
40

Según se utiliza en la presente memoria, un fragmento F(AB)₂ es un fragmento de anticuerpo que resulta de la digestión de una inmunoglobulina con pepsina a pH 4,0-4,5; puede expresarse de forma recombinante para producir el fragmento equivalente.

45 Según se utiliza en la presente memoria, los fragmentos Fab son fragmentos de anticuerpos que resultan de la digestión de una inmunoglobulina con papaína; pueden expresarse de forma recombinante para producir el fragmento equivalente.

Según se utiliza en la presente memoria, los scFv se refieren a fragmentos de anticuerpos que contienen una cadena ligera variable V, y una cadena pesada variable (VH) conectadas covalentemente por un conector polipeptídico en cualquier orden. El conector es de una longitud tal que los dos dominios variables están puenteados sin interferencia sustancial. Los conectores incluidos son residuos (Gly-Ser) n con algunos residuos de Glu o Lys dispersos a lo largo para aumentar la solubilidad.
50

55 Según se utiliza en la presente memoria, los anticuerpos humanizados se refieren a anticuerpos que están modificados para incluir secuencias humanas de aminoácidos por lo que la administración a un ser humano no provoca una respuesta inmunitaria. Se conocen métodos para la preparación de tales anticuerpos. Por ejemplo, para producir dichos anticuerpos, el hibridoma u otra célula procarionota o eucariota, tal como una E. coli o una célula CHO, que expresan el anticuerpo monoclonal se alteran por técnicas de ADN recombinante para expresar un anticuerpo en el que la composición de aminoácidos de la región no variable se basa en anticuerpos humanos. Se han diseñado programas de ordenador para identificar dichas regiones.
60

Según se utiliza en la presente memoria, los diacuerpos son scFV diméricos; los diacuerpos tienen típicamente conectores peptídicos más cortos que los ScFV, y generalmente se dimerizan.

Según se utiliza en la presente memoria, la producción por medios recombinantes mediante el uso de métodos de ADN recombinante significa el uso de los métodos bien conocidos de la biología molecular para expresar proteínas codificadas por el ADN clonado.

5 Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término evaluación incluya la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una sHASEGP, o un dominio del mismo, presente en la muestra, y también de obtener un índice, razón, porcentaje, valor visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta y las especies químicas detectadas realmente no tienen que ser, por supuesto, el producto de la proteólisis en sí, sino puede ser por ejemplo un derivado del mismo o alguna sustancia adicional.

10 Según se utiliza en la presente memoria, la actividad biológica se refiere a las actividades in vivo de un compuesto o a las respuestas fisiológicas que resultan tras la administración in vivo de un compuesto, composición u otra mezcla. La actividad biológica, por lo tanto, abarca los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de tales compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas pueden observarse en sistemas in vitro diseñados para someter a ensayo o utilizar dichas actividades. Por lo tanto, para los fines en la presente memoria la actividad biológica de una luciferasa es su actividad oxigenasa mediante la cual, tras la oxidación de un sustrato, se produce luz.

15 En la presente memoria, la actividad funcional se refiere a un polipéptido o a una porción del mismo, que muestra una o más actividades asociadas con una proteína completa.

20 Las actividades funcionales incluyen, pero no se limitan a, la actividad biológica, la actividad catalítica o enzimática, la antigenicidad (capacidad para unirse o competir con un polipéptido por la unión a un anticuerpo anti-polipéptido), la inmunogenicidad, la capacidad para formar multímeros, la capacidad para unirse Específicamente a un receptor o ligando para el polipéptido.

25 Según se utiliza en la presente memoria, un producto conjugado se refiere a los compuestos proporcionados en la presente memoria que incluyen una o más de las sHASEGP, incluyendo una sHASEGP, particularmente sus dominios Hialuronidasa de cadena sencilla, y uno o más agentes de direccionamiento. Estos productos conjugados incluyen los producidos por medios recombinantes en forma de proteínas de fusión, los producidos por medios químicos, tal como mediante acoplamiento químico, a través de, por ejemplo, acoplamiento a grupos sulfhidrilo y los producidos por cualquier otro método mediante el cual al menos una sHASEGP, o un dominio del mismo, se liga, directa o indirectamente a través de uno o varios conectores a un agente de direccionamiento.

30 Según se utiliza en la presente memoria, un agente de direccionamiento es cualquier radical, tal como una proteína o una porción eficaz de la misma, que proporciona la unión específica del producto conjugado a un receptor de la superficie celular, el cual, puede internalizar el producto conjugado o la porción sHASEGP del mismo. Un agente de direccionamiento también puede ser uno que promueva o facilite, por ejemplo, el aislamiento o la purificación por afinidad del producto conjugado; la unión del producto conjugado a una superficie; o la detección del producto conjugado o de complejos que contienen el producto conjugado.

35 Según se utiliza en la presente memoria, un producto conjugado de anticuerpo se refiere a un producto conjugado en el que el agente de direccionamiento es un anticuerpo.

40 Según se utiliza en la presente memoria, derivado o análogo de una molécula se refiere a una porción derivada de o una versión modificada de la molécula.

45 Según se utiliza en la presente memoria, una cantidad eficaz de un compuesto para tratar una enfermedad concreta es una cantidad que es suficiente para mejorar, o de alguna manera reducir los síntomas asociados con la enfermedad. Tal cantidad se puede administrar como una sola dosis o se puede administrar de acuerdo con un régimen, por medio del cual eficaz. La cantidad puede curar la enfermedad pero, típicamente, se administra con el fin de mejorar los síntomas de la enfermedad. Puede ser necesaria la administración repetida para lograr la mejora deseada de los síntomas.

50 Según se utiliza en la presente memoria, equivalente, cuando se refiere a dos secuencias de ácidos nucleicos significa que las dos secuencias en cuestión codifican la misma secuencia de aminoácidos o proteínas equivalentes. Cuando se utiliza equivalente al referirse a dos proteínas o péptidos, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos con solo sustituciones de aminoácidos (tal como, pero no limitados a, cambios conservativos tales como los expuestos en la Tabla 1, de más arriba) que no alteran sustancialmente la actividad o función de la proteína o péptido. Cuando equivalente se refiere a una propiedad, la propiedad no necesita estar presente en la misma medida (p. ej., dos péptidos pueden presentar diferentes velocidades del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades son habitualmente sustancialmente iguales. Complementaria, cuando se refiere a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de

nucleótidos son capaces de hibridar, típicamente con menos de 25%, 15%, 5% o 0% de emparejamientos erróneos entre nucleótidos opuestos. Si fuera necesario se especifica el porcentaje de complementariedad. Típicamente las dos moléculas se seleccionan de modo que hibridarán en condiciones de alta rigurosidad.

5 Según se utiliza en la presente memoria, un agente que modula la actividad de una proteína o expresión de un gen o ácido nucleico o bien disminuye o aumenta o altera de otra manera la actividad de la proteína o, de algún modo regula al alza o a la baja o altera de otra manera la expresión del ácido nucleico en una célula.

10 Según se utiliza en la presente memoria, inhibidor de la actividad de una sHASEGP abarca cualquier sustancia que prohíbe o disminuye la producción, la modificación o modificaciones post-traduccionales, la maduración o localización en la membrana de la sHASEGP o cualquier sustancia que interfiera con o disminuya la eficacia proteolítica de la misma, en particular de una forma de cadena sencilla en un ensayo de escrutinio in vitro.

15 Según se utiliza en la presente memoria, un método para tratar o prevenir la enfermedad neoplásica significa que cualquiera de los síntomas, tales como el tumor, su metástasis, la vascularización de los tumores u otros parámetros por los que se caracteriza la enfermedad son reducidos, mejorados, impedidos, colocados en un estado de remisión, o mantenidos en un estado de remisión. También significa que las características de la enfermedad neoplásica y la metástasis pueden eliminarse, reducirse o prevenirse mediante el tratamiento. Los ejemplos no limitantes de las características distintivas incluyen la degradación descontrolada de la membrana basal y la matriz extracelular proximal, la migración, la división y la organización de las células endoteliales en nuevos capilares funcionales y la persistencia de dichos capilares funcionales.

20 Según se utiliza en la presente memoria, las sales farmacéuticamente aceptables, los ésteres u otros derivados de los productos conjugados incluyen sales, ésteres o derivados cualesquiera que pueden ser preparados fácilmente por los expertos en esta técnica utilizando métodos conocidos para tal derivatización y que producen compuestos que se pueden administrar a animales o seres humanos sin efectos tóxicos sustanciales y que son sustancias farmacéuticas activas o son profármacos.

25 Según se utiliza en la presente memoria, un profármaco es un compuesto que, tras la administración in vivo, es metabolizado o convertido de otra manera en la forma biológicamente, farmacéuticamente o terapéuticamente activa del compuesto. Para producir un profármaco, el compuesto activo farmacéutico se modifica de tal manera que el compuesto activo se regenera mediante procesos metabólicos. El profármaco puede ser diseñado para alterar la estabilidad metabólica o las características de transporte de un fármaco, para enmascarar efectos secundarios o toxicidad, para mejorar el sabor de un fármaco o para alterar otras características o propiedades de un fármaco. En virtud del conocimiento de los procesos farmacodinámicos y el metabolismo de fármacos in vivo, los expertos en esta técnica, una vez un compuesto farmacéuticamente activo es conocido, pueden diseñar profármacos del compuesto (véase, por ejemplo, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, Nueva York, páginas 388-392).

30 Según se utiliza en la presente memoria, un fármaco identificado por los métodos de escrutinio proporcionados en la presente memoria se refiere a cualquier compuesto que es un candidato para su uso como agente terapéutico o como un compuesto cabeza de serie para el diseño de un agente terapéutico. Tales compuestos pueden ser moléculas pequeñas, incluyendo moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, miméticos de péptidos, moléculas antisentido o ARN de doble hebra, tales como ARNdH, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos recombinantes et al. de tales compuestos que pueden servir como candidatos a fármacos o compuestos cabeza de serie.

35 Según se utiliza en la presente memoria, un peptidomimético es un compuesto que imita la conformación y ciertas características estereoquímicas de la forma biológicamente activa de un péptido concreto. En general, los peptidomiméticos están diseñados para imitar ciertas propiedades deseables de un compuesto, pero no las propiedades no deseables, tales como la flexibilidad, que conducen a una pérdida de una conformación biológicamente activa y rotura del enlace. Los peptidomiméticos pueden prepararse a partir de compuestos biológicamente activos mediante la sustitución de ciertos grupos o enlaces que contribuyen a las propiedades no deseables con los bioisómeros. Bioisómeros son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el bioisómero de metileno CH₂S se ha utilizado como un reemplazo de amida en análogos de encefalina (véase, p. ej. Spatola (1983) págs. 267-357 en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Weinstein, Ed. volume 7, Marcel Dekker, Nueva York). La morfina, que puede administrarse por vía oral, es un compuesto que es un peptidomimético del péptido endorfina. Para los propósitos de la presente memoria, los péptidos cíclicos se incluyen entre los peptidomiméticos.

40 Según se utiliza en la presente memoria, una región promotora o elemento promotor se refiere a un segmento de ADN o ARN que controla la transcripción del ADN o ARN al que está conectado operativamente. La región promotora incluye secuencias específicas que son suficientes para el reconocimiento de la ARN polimerasa, la unión y la iniciación de la transcripción.

Esta porción de la región promotora se denomina promotor. Además, la región promotora incluye secuencias que modulan la actividad de iniciación de este reconocimiento, unión y transcripción de la ARN polimerasa. Estas secuencias pueden ser de acción en cis o pueden ser sensibles a factores que actúan en trans. Los promotores, dependiendo de la naturaleza de la regulación, pueden ser constitutivos o regulados. Los promotores ilustrativos contemplados para su uso en procariontes incluyen los promotores T7 y T3 de bacteriófagos.

Según se utiliza en la presente memoria, un receptor se refiere a una molécula que tiene una afinidad por un ligando dado. Los receptores pueden ser de origen natural o moléculas sintéticas. Los receptores también pueden denominarse en la técnica como antiligandos. En la presente memoria, el receptor y el anti-ligando son intercambiables. Los receptores pueden ser utilizados en su estado natural o como agregados con otras especies. Los receptores pueden estar unidos, covalentemente o no covalentemente a, o en contacto físico con, un miembro de unión, ya sea directa o indirectamente a través de una sustancia de unión específica o conector. Los ejemplos de los receptores incluyen, pero no se limitan a: anticuerpos, receptores de membrana celular receptores de superficie y receptores de internalización, anticuerpos monoclonales y antisueros reactivos con determinantes antigénicos específicos tales como en virus, células u otros materiales], fármacos, polinucleótidos, ácidos nucleicos, péptidos, factores, lectinas, azúcares, polisacáridos, células, membranas celulares, y orgánulos.

Los ejemplos de los receptores y las aplicaciones que utilizan este tipo de receptores, incluyen pero no se limitan a: a) enzimas: las proteínas de transporte específicas o enzimas esenciales para la supervivencia de los microorganismos, que podrían servir como dianas para la selección de antibióticos [ligando]; b) anticuerpos: se puede investigar la identificación de un sitio de unión al ligando de la molécula de anticuerpo que se combina con el epítipo de un antígeno de interés; la determinación de una secuencia que imita un epítipo antigénico puede conducir al desarrollo de vacunas en las cuales el inmunógeno se basa en una o más de dichas secuencias o conduce al desarrollo de agentes de diagnóstico relacionados o compuestos útiles en tratamientos terapéuticos tal como para enfermedades autoinmunitarias c) ácidos nucleicos: identificación de ligandos, tales como proteínas o ARN, sitios de unión; d) polipéptidos catalíticos: polímeros, incluyendo polipéptidos, que son capaces de promover una reacción química que implica la conversión de uno o más reactivos en uno o más productos; dichos polipéptidos incluyen generalmente un sitio de unión específico para al menos un reactivo o intermedio de reacción y una funcionalidad activa próxima al sitio de unión, en el que la funcionalidad es capaz de modificar químicamente el reactivo unido (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos número 5.215.899); e) receptores de hormonas: la determinación de los ligandos que se unen con alta afinidad a un receptor es útil en el desarrollo de terapias de reemplazo de hormonas; por ejemplo, la identificación de ligandos que se unen a dichos receptores puede conducir al desarrollo de fármacos para controlar la presión arterial; y f) receptores de opiáceos: la determinación de ligandos que se unen a los receptores opiáceos en el cerebro es útil en el desarrollo de sustitutos menos adictivos para la morfina y fármacos relacionados.

Según se utiliza en la presente memoria, la muestra se refiere a cualquier cosa que pueda contener un analito para el que se desea un ensayo de analito. La muestra puede ser una muestra biológica, tal como un fluido biológico o un tejido biológico. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, moco, esperma, líquido amniótico o similares. Los tejidos biológicos son agregados de células, normalmente de un tipo concreto junto con su sustancia intercelular que forman uno de los materiales estructurales de un ser humano, animal, vegetal, bacteriano, fúngico o estructura viral, incluyendo los tejidos conectivo, epitelial, muscular y nervioso. Los ejemplos de los tejidos biológicos también incluyen órganos, tumores, ganglios linfáticos, arterias y células individuales.

Según se utiliza en la presente memoria: rigurosidad de la hibridación en la determinación de porcentaje emparejamiento erróneos es el siguiente: 1) alta rigurosidad: 0,1 x SSPE, SDS al 0,1%, 65°C 2) rigurosidad media: 0,2 x SSPE, SDS al 0,1%, 50°C 3) baja rigurosidad : 1,0 x SSPE, SDS al 0,1%, 50°C. Los expertos en esta técnica saben que la etapa de lavado selecciona híbridos estables y también saben los ingredientes de SspE (véase, por ejemplo, Sambrook, EF Fritsch, T. Maniatis, en: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, véanse, también, numerosos catálogos que describen soluciones de laboratorio utilizadas comúnmente). SspE es NaCl al 0,18 tamponado con fosfato de pH 7,4. Además, los expertos en la técnica reconocen que la estabilidad de los híbridos está determinada por TMT que es una función de la concentración de iones de sodio y la temperatura ($T_m = 81,5^\circ\text{C} - 16,6 + 0,41 (\% \text{ G} + \text{C}) - 600/\text{L}$) de modo que los únicos parámetros en las condiciones de lavado críticas para la estabilidad del híbrido son la concentración de ión sodio en el SspE (o SSC) y la temperatura.

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

- Las hibridaciones se llevan a cabo en la misma solución con las siguientes modificaciones: PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, ADN de esperma 100VG/M, sulfato de dextrano al 10% (peso/vol), y se utiliza sonda marcada con 5-20 X 106 cpm de 32P. Los filtros se incuban en mezcla de hibridación durante 18-20 horas a 40°C y a continuación se lavan durante 1,5 horas a 55°C en una solución que contiene 2X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, y SDS al 0,1%. La solución de lavado se sustituye por solución de nueva aportación y se incuba durante 1,5 horas adicionales a 60°C. Los filtros se secan y se exponen para la autorradiografía. Si es necesario, los filtros se lavan una tercera vez a 65-68°C y se reexponen a la película. Otras condiciones de baja rigurosidad que se pueden utilizar son bien conocidas en la técnica, p. ej. las empleadas para las hibridaciones cruzadas de especies).
- A modo de ejemplo y no a modo de limitación, los procedimientos que utilizan condiciones de rigurosidad moderada incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, procedimientos que utilizan tales condiciones de rigurosidad moderada como sigue: Los filtros que contienen ADN se tratan previamente durante 6 horas a 55°C en una solución que contiene 6X SSC, 5X solución de Denhart, SDS al 0,5% y ADN desnaturalizado de esperma de salmón de 100 ug/mL. Las hibridaciones se llevan a cabo en la misma solución y se utiliza sonda marcada con 5-20 X 106 de 32P. Los filtros se incuban en mezcla de hibridación durante 18-20 horas a 55°C y después se lavan dos veces durante 30 minutos a 60°C en una solución que contiene 1X SSC y SDS al 0,1%. Los filtros se secan y se exponen para la autorradiografía. Otras condiciones de rigurosidad moderada que se pueden utilizar son bien conocidas en la técnica. El lavado de los filtros se realiza a 37°C durante 1 hora en una solución que contiene 2X SSC, SDS al 0,1%.
- A modo de ejemplo y no a modo de limitación, los procedimientos que utilizan condiciones de alta rigurosidad son los siguientes: La prehibridación de los filtros que contienen ADN se lleva a cabo durante 8 horas a toda la noche a 65°C en tampón compuesto de 6X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,02%, y ADN desnaturalizado de esperma de salmón de 500 ug/mL. Los filtros se hibridan durante 48 horas a 65°C en mezcla de prehibridación que contiene ADN de esperma de salmón 100 ug/mL desnaturalizado y sonda marcada con 5 a 20 X 106 CPM de 32P. El lavado de los filtros se realiza a 37°C durante 1 hora en una solución que contiene 2X SSC, PVP al 0,01%, Ficoll al 0,01%, y BSA al 0,01%. Esto está seguido por un lavado en 0,1X SSC a 50°C durante 45 minutos antes de la autorradiografía. Otras condiciones de alta rigurosidad que se pueden utilizar son bien conocidas en la técnica.
- El término sustancialmente idéntico o sustancialmente homólogo o similar varía con el contexto que es entendido por los expertos en la técnica relevante y generalmente significa una identidad de al menos 60% o 70%, preferiblemente significa al menos 80%, 85% o más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferiblemente al menos 95%.
- Según se utiliza en la presente memoria, sustancialmente idéntico a un producto significa suficientemente similar de manera que la propiedad de interés es suficientemente inalterada de manera que el producto sustancialmente idéntico puede usarse en lugar del producto.
- Según se utiliza en la presente memoria, sustancialmente puro significa suficientemente homogéneo para aparecer libre de impurezas fácilmente detectables según se determina por métodos de análisis convencionales, tales como cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), utilizados por los expertos en la técnica para evaluar tal pureza, o suficientemente puro tal que la purificación adicional no alteraría de forma detectable las propiedades físicas y químicas, tales como las actividades enzimática y biológica, 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 puede, sin embargo, ser una mezcla de estereoisómeros o isómeros. En tales casos, la purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.
- Según se utiliza en la presente memoria, célula diana se refiere a una célula que expresa una sHASEGP (en el contexto de la producción de sHASEGP como se describe en la presente memoria), o a una célula que es elegida como diana por una sHASEGP o agente co-formulado o co-administrado in vivo (en el contexto de la utilización de sHASEGP para promover el suministro de medicamentos et al. agentes a las células diana como se describe en la presente memoria).
- Según se utiliza en la presente memoria, la sustancia de ensayo (o compuesto de ensayo) se refiere a un compuesto químicamente definido (p. ej., moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas/inorgánicas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, lípidos, polisacáridos, sacáridos o híbridos entre estas moléculas tales como glicoproteínas, etc.) o mezclas de compuestos (p. ej., una biblioteca de compuestos de ensayo, extractos naturales o sobrenadantes de cultivo, etc.) cuyo efecto sobre una sHASEGP, particularmente una forma de cadena sencilla que incluye el dominio Hialuronidasa o una porción suficiente del mismo para su actividad, como se determina por un método in vitro, tal como los ensayos proporcionados en la presente memoria.
- Según se utiliza en la presente memoria, los términos un agente terapéutico, régimen terapéutico, radioprotector o quimioterapéutico significan fármacos convencionales y terapias farmacológicas, incluyendo vacunas, que son

conocidas para los expertos en la técnica. Los agentes radioterapéuticos son bien conocidos en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, el tratamiento significa cualquier manera en la cual los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad son mejorados o alterados beneficiosamente de otra manera.

5 El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de las composiciones de la presente invención.

Según se utiliza en la presente memoria, vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se utilizan para introducir ácido nucleico heterólogo en células para la expresión o replicación del mismo. Los vectores suelen permanecer en forma episómica, pero pueden ser diseñados para llevar a cabo la integración de un gen o porción del mismo en un cromosoma del genoma. También se contemplan vectores que son cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de mamíferos. La selección y uso de tales vehículos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que está unido operativamente a secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de tales fragmentos de ADN. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a un constructo recombinante de ADN o ARN, tal como un plásmido, un fago, un 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 procariotas y los que permanecen en forma episómica o aquellos que se integran en el genoma de la célula anfitriona.

Según se utiliza en la presente memoria, secuencia de unión a proteína se refiere a una proteína o secuencia peptídica que es susceptible de unión específica a otras secuencias de proteínas o péptidos en general, a un conjunto de secuencias de proteínas o péptidos o a una secuencia de proteína o péptido concreta.

Según se utiliza en la presente memoria, etiqueta epitópica se refiere a un corto tramo de residuos de aminoácidos correspondiente a un epítipo para facilitar el posterior análisis bioquímico e inmunológico de la proteína o péptido etiquetado con el epítipo. El etiquetado epitópico se consigue incluyendo la secuencia de la etiqueta epitópica en la secuencia que codifica la proteína en un vector de expresión apropiado. Las proteínas con etiqueta epitópica pueden ser purificadas por afinidad utilizando anticuerpos altamente específicos originados contra las etiquetas.

Según se utiliza en la presente memoria, secuencia de unión a metal se refiere a una proteína o secuencia peptídica que es susceptible de unión específica a iones metálicos en general, a un conjunto de iones metálicos o a un ión metálico concreto.

Según se utiliza en la presente memoria, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o entre varios elementos.

Según se utiliza en la presente memoria, una composición se refiere a cualquier mezcla. Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, acuosos, o no acuosos o cualquier combinación de los mismos.

Según se utiliza en la presente memoria, fluido se refiere a cualquier composición que puede fluir. Los fluidos abarcan de este modo composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras tales composiciones.

Según se utiliza en la presente memoria, un extracto celular se refiere a una preparación o fracción que se prepara a partir de una célula lisada o desorganizada.

Según se utiliza en la presente memoria, se dice que un agente va a ser seleccionado al azar cuando el agente se elige al azar sin considerar las secuencias específicas implicadas en la asociación de una proteína sola o con sus sustratos asociados, compañeros de unión, etc. Un ejemplo de agentes seleccionados al azar es el uso de una biblioteca química o una biblioteca combinatoria de péptidos, o un caldo de crecimiento de un organismo o medio acondicionado.

Según se utiliza en la presente memoria, se dice que un agente que se ha seleccionado o diseñado racionalmente cuando se elige el agente sobre una base no aleatoria que tiene en cuenta la secuencia del sitio diana y/o su conformación en relación con la acción del agente. Según se describe en los Ejemplos, se han propuesto sitios de unión para Hialuronidasa y sitios (catalíticos) en la glicoproteína de que tiene el SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 4. Los agentes pueden ser seleccionados racionalmente o diseñados racionalmente mediante la utilización de las secuencias peptídicas que componen estos sitios. Por ejemplo, un agente peptídico seleccionado racionalmente puede ser un péptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a los sitios o dominios de unión a ATP o calmodulina.

Se considera que los oligosacáridos tienen un extremo reductor y un extremo no reductor, sea o no el sacárido en el

extremo reductor, de hecho, un azúcar reductor. De acuerdo con la nomenclatura aceptada, los oligosacáridos se representan en la presente memoria con el extremo no reductor a la izquierda y el extremo reductor a la derecha. Todos los oligosacáridos descritos en la presente memoria se describen con el nombre o abreviatura para el sacárido no reductor (p. ej., Gal), seguido de la configuración del enlace glicosídico (.alfa. o .beta.), el enlace del anillo, la posición del anillo del sacárido reductor implicado en el enlace, y a continuación el nombre o la abreviatura del sacárido reductor (p. ej., GlcNAc). El enlace entre dos azúcares puede expresarse, por ejemplo, como 2,3, 2.fw darw.3, o (2,3). Cada sacárido es una piranosa.

Según se utiliza en la presente memoria, radical azúcar ligado a N se refiere a un oligosacárido unido a una SHASEGP mediante el nitrógeno amidídico de los residuos de Asn. Los oligosacáridos ligados a N se clasifican en varios tipos principales (oligomanosa, complejos, híbridos, sulfatados), todos los cuales tienen núcleos de (Man) 3-GlcNAc-GlcNAc unidos a través del nitrógeno amidídico de los residuos de Asn que caen dentro de las secuencias Asn-Xaa-Thr/Ser- (donde Xaa no es Pro). Los sitios unidos a N son a menudo asignados indirectamente por la aparición de un ciclo "en blanco" durante la secuenciación. La identificación positiva puede realizarse después de la liberación del oligosacárido por la PNGasa F, que convierte la Asn glicosilada en Asp. Después de la liberación por la PNGasa F, los oligosacáridos ligados a N pueden purificarse utilizando cromatografía Bio-Gel P-6, con la reserva de oligosacáridos sometida a cromatografía de intercambio aniónico preparativa a alto pH (HPAEC) (Townsend et al., (1989) Anal. Biochem. 182, 1-8). Ciertos isómeros de oligosacáridos se pueden resolver utilizando HPAEC. Los residuos de fucosa desplazarán las posiciones de elución antes en el cromatograma de HPAEC, mientras que los residuos de ácido siálico adicionales aumentarán el tiempo de retención. El tratamiento concomitante de glicoproteínas cuyas estructuras de oligosacáridos son conocidas (p. ej., fetuina bovina, glicoproteína ácida a-1, ovoalbúmina, ARNasa B, transferrina) puede facilitar la asignación de los picos de oligosacáridos. Los oligosacáridos recogidos pueden caracterizarse por una combinación de análisis de unión composicional y de metilación (Waegheet al., (1983). Carbohydr Res 123, 281-304), con configuraciones anoméricas asignadas por medio de espectroscopía de RMN (Van Halbeek (1993) en Methods Enzymol 230).

Alternativamente, los oligosacáridos pueden ser identificados por fluorescencia asistida por electroforesis en carbohidratos (FACE) Callewaert et al. (2001) Glycobiology 11, 275-281.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "ácido siálico" se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia del ácido siálico es el ácido N-acetilneuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-onico (a menudo abreviado como Neu5Ac, NeuAc, o NANA). Un segundo miembro de la familia es el ácido N-glicolil-neuramínico (Neu5Gc o NeuGc), en el que el grupo N-acetilo de NeuAc está hidroxilado. Un tercer miembro de la familia del ácido siálico es el ácido 2-ceto-3-desoxi-nonulosónico (KDN) (Nadano et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori et al. (1990) J. Biol. Chem. 265: 21811-21819. También se incluyen ácidos siálicos sustituidos en la posición 9 tales como un 9-O-C.sub.1-C.sub.6 acil-Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para la revisión de la familia del ácido siálico, véase, por ejemplo. Varki (1992) Glycobiology 2: 25-40; Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed (Springer-Verlag, NY (1992)). La síntesis y uso de compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialación se describe en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de Octubre de 1992 .

Según se utiliza en la presente memoria, PNGasa se refiere a una N-glicosidasa F específica de péptido con Asparragina como la péptido-N-glicosidasa F de Flavobacterium meningoseptum. Las enzimas PNGASA se caracterizan por su especificidad hacia oligosacáridos ligados a N en lugar de ligados a O. La caracterización de la eficacia de la PNGASA se puede definir mediante electroforesis SDS PAGE, o electroforesis de carbohidratos asistida por fluorescencia.

Según se utiliza en la presente memoria sialación terminada sustancialmente se refiere a oligosacáridos ligados a N que terminan con residuo de ácido siálico como azúcar terminal. Los ácidos siálico terminales se pueden identificar por el análisis FACE de carbohidratos liberados después del tratamiento con neuraminidasa.

El tiempo de vida circulatorio de las glicoproteínas en la sangre es altamente dependiente de la composición y la estructura de sus grupos de carbohidrato ligados a N. Este hecho tiene importancia directa para las glicoproteínas terapéuticas que están destinadas a ser administrados por vía parenteral. En general, la vida media circulatoria máxima de una glicoproteína requiere que sus grupos carbohidrato ligados a N terminen en la secuencia NeuAc-Gal-GlcNAc. Sin el ácido siálico terminal (NeuAc), la glicoproteína se elimina rápidamente de la sangre mediante un mecanismo que implica el reconocimiento de los residuos de N-acetilgalactosamina (GalNAc) o galactosa (Gal) subyacentes (Goochee et al. (1991) Biol/Technology 9: 1347-55). Por esta razón, asegurar la presencia de ácido siálico terminal en grupos carbohidrato ligados a N de glicoproteínas terapéuticas es una consideración importante para su desarrollo comercial.

Las glicoproteínas circulantes están expuestas a una o varias sialidasas (o neuraminidasa) que pueden eliminar los residuos de ácido siálico terminales. Típicamente, la eliminación del ácido siálico expone los residuos de galactosa, y

5 estos residuos son reconocido y unidos por los receptores específicos de galactosa en los hepatocitos (revisado por Ashwell y Harford (1982) Ann. Rev. Biochem. 51:531). El hígado también contiene otros receptores específicos de azúcar que median la eliminación de glicoproteínas de la circulación. Las especificidades de tales receptores también incluyen N-acetilglucosamina; manosa, fucosa y fosfomanosa. Las glicoproteínas aclaradas por los receptores de galactosa de los hepatocitos se someten a una degradación sustancial y a continuación entran en la bilis; las glicoproteínas aclaradas por el receptor de manosa de las células de Kupffer entran en el sistema reticuloendotelial (revisado por Ashwell y Harford (1982) Ann. Rev. Biochem. 51:53).

10 Según se utiliza en la presente memoria Activa pH Neutro se refiere a una glicoproteína sHASEGP con actividad catalítica hacia un sustrato de glicosaminoglicano in vitro a un pH entre 5 y 8 en condiciones de sal de menos de 150 mM y la fuerza tamponadora menor de 50 mM.

15 Según se utiliza en la presente memoria, una solución estabilizada se refiere a una sHASEGP que conserva más de 60% de su actividad inicial después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 30 días.

20 Según se utiliza en la presente memoria a menos que se especifique lo contrario, una unidad se expresa en unidades de reducción de turbidez (TRU). Una TRU se define como la cantidad de actividad hialuronidasa necesaria para reducir la turbidez de una solución acidulada de ácido hialurónico y es equivalente a las unidades U.S.P./National Formulary (NF XIII) (NFU). El ensayo enzimático de tipo ELISA descrito en la presente memoria puede estar relacionado con la unidad TRU, NFU, y U.S.P a través de una curva patrón de una muestra de hialuronidasa (p. ej., patrón USP o WHO) normalizada a través de la U.S.P. Por lo tanto, las actividades enzimáticas determinadas por el ensayo enzimático de tipo ELISA son en realidad TRU relativas, ya que la actividad de la enzima no se mide en realidad utilizando el ensayo turbidimétrico (Dorfman et al., 1948, J. Biol. Chem. 172:367).

25 Según se utiliza en la presente memoria, la potencia se define por la cantidad de proteína sHASEGP necesaria para degradar sustrato in vitro basándose en una Unidad de Reducción de Turbidez o la Unidad de Reducción de Turbidez Relativa.

30 En la presente memoria, la actividad específica se refiere a unidades de actividad por mg de proteína. La cantidad de proteína sHASEGP se define por la absorción de una solución de sHASEGP a 280 nm suponiendo un coeficiente de extinción molar de aproximadamente 1,7, en unidades de M⁻¹ cm⁻¹.

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

40 Una aplicación estrechamente relacionada es la síntesis de redes de PEG degradable entrecruzado o formulaciones para su uso en la administración de fármacos ya que gran parte de la misma química utilizada en el diseño de portadores de fármacos solubles, degradables también se puede utilizar en el diseño de geles degradables (Sawhney et al., Macromolecules 26: 581-87, 1993). También se sabe que se pueden formar complejos intermoleculares mediante la mezcla de soluciones de dos polímeros complementarios. Dichos complejos se estabilizan generalmente mediante interacciones electrostáticas (polianión-policación) y/o enlaces de hidrógeno (poliácido-polibase) entre los polímeros implicados, y/o por interacciones hidrófobas entre los polímeros en un medio acuoso circundante (Krupers et al., Eur. Polym J. 32: 785-790, 1996). Por ejemplo, la mezcla de soluciones de poli(ácido acrílico) (PAAc) y poli(óxido de etileno) (POE) en las condiciones apropiadas da como resultado la formación de complejos basados principalmente en enlaces de hidrógeno. La disociación de estos complejos en condiciones fisiológicas se ha utilizado para el suministro de fármacos libres (es decir, no pegilados). Además, se han formado complejos de polímeros complementarios a partir tanto de homopolímeros como de copolímeros.

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

60 Si bien se han descrito numerosas reacciones para la PEGilación, las que son más generalmente aplicables confieren direccionalidad, utilizan condiciones de reacción suaves, y no requieren procesamiento exhaustivo aguas abajo para eliminar catalizadores tóxicos o subproductos. Por ejemplo, el monometoxi PEG (mPEG) solo tiene un hidroxilo terminal reactivo, y por lo tanto su uso limita algo de la heterogeneidad de la mezcla de producto de PEG-

proteína resultante. La activación del grupo hidroxilo en el extremo del polímero opuesto al grupo metoxi terminal es generalmente necesaria para llevar a cabo la PEGilación eficaz de la proteína, con el objetivo de hacer el PEG derivatizado más susceptible al ataque nucleofílico. El nucleófilo atacante es por lo general el grupo epsilon-amino de un residuo de lisilo, pero otras aminas también puede reaccionar (p. ej., la alfa-amina N-terminal o las aminas anulares de histidina) si las condiciones locales son favorables. Un anclaje más dirigido es posible en proteínas que contienen una sola lisina o cisteína. Este último residuo puede ser objetivo de PEG-maleimida para la modificación específica de tiol. Alternativamente, la hidrazida de PEG se puede hacer reaccionar con sHASEGP oxidada con peryodato y reducir en presencia de NaCNBH₃. Más específicamente, los azúcares CMP PEGilados pueden hacerse reaccionar con sHASEGP en presencia de glicosil-transferasas apropiadas. Una técnica es la técnica de "PEGilación", donde varias moléculas poliméricas se acoplan al polipéptido en cuestión. Cuando se utiliza esta técnica el sistema inmunitario tiene dificultades para reconocer los epítomos en la superficie del polipéptido responsable de la formación de anticuerpos, reduciendo así la respuesta inmunitaria. Para los polipéptidos introducidos directamente en el sistema circulatorio del organismo humano para proporcionar un efecto fisiológico concreto (es decir los productos farmacéuticos) la respuesta inmunitaria potencial típica es una respuesta de IgG y/o de IgM, mientras que los polipéptidos que se inhalan a través del sistema respiratorio (es decir polipéptido industrial) pueden causar potencialmente una respuesta de IgE (es decir respuesta alérgica). Una de las teorías que explican la reducción de la respuesta inmunitaria es que molécula o moléculas poliméricas protege o protegen el epítomo o los epítomos en la superficie del polipéptido responsable de la respuesta inmunitaria que conduce a la formación de anticuerpos. Otra teoría o por lo menos un factor parcial es que cuanto más pesado es el producto conjugado, se obtiene la respuesta inmunitaria más reducida.

En el caso de las sHASEGP humanas que se utilizan en el organismo humano, una combinación preferida descrita en la presente memoria, la tendencia de la sHASEGP a provocar una respuesta inmunitaria se puede reducir significativamente en comparación con, por ejemplo, enzimas derivadas de animales no humanos tales como hialuronidasas bovinas u ovinas (es decir, incluso si esas enzimas de origen animal pudieran ser completamente separadas mediante purificación de otras proteínas de origen animal, que es difícil o imposible de lograr en la práctica). Aunque las sHASEGP humanas representan por tanto una mejora sustancial y muy importante sobre los productos derivados de animales, éstas pueden para muchos usos mejorarse aún más por medio de modificaciones post-traduccionales (PTM) tales como la PEGilación para mejorar su resistencia a la degradación o eliminación y/o para mejorar otras propiedades que las hacen aún más beneficiosas para aplicaciones concretas.

Por ejemplo, aunque las composiciones preferidas para los seres humanos (tales como las sHASEGP humanas) presentan una inmunogenicidad reducida en comparación con las hialuronidasas de origen animal o sHASEGP no humanas, la PEGilación de tales sHASEGP humana se puede utilizar por ejemplo para prolongar su media vida en el torrente sanguíneo y/o en otros tejidos dentro del organismo. Sin estar limitado a un mecanismo particular de acción, se considera generalmente que la unión de restos de PEG a sHASEGP puede usarse para proteger eficazmente la molécula, disminuyendo su sensibilidad relativa a las proteasas y potencialmente también para disminuir la magnitud y velocidad de su aclaramiento y la eliminación del organismo.

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

Ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas del grupo que comprende poli(óxidos de alquileo) (POA), tales como polialquilenglicoles (PAG), incluyendo polipropilenglicoles (PEG), metoxipolietilenglicoles (mPEG) y polipropilenglicoles, éteres de PEG-glicidilo (Epoxy-PEG), polietilenglicoles (PEG) ramificados con PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, poli-D, L-aminoácidos, anhídrido de ácido polietileno-co-maleico, anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico, dextranos incluyendo carboximetil dextranos, heparina, albúmina homóloga, celulosas, incluyendo metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, carboxietilcelulosa hidroxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa, productos hidrolizados de quitosano, almidones tales como hidroxietilalmidones e hidroxipropilalmidones, glucógeno, agarosas y derivados de los mismos, goma guar, pululano, inulina, goma xantana, carragenina, pectina, productos hidrolizados de ácido alginico y biopolímeros.

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

En términos generales los poli(óxidos de alquileo) (POA), tales como los poli(óxidos de etileno), tales como PEG y especialmente mPEG, son las moléculas poliméricas preferidas, ya que estas moléculas poliméricas, en comparación con polisacáridos tales como dextrano, pululano y similares, tienen pocos grupos reactivos susceptibles de entrecruzamiento, lo que no es deseable.

Las mejoras en la PEGilación et al. tipos de modificaciones post-traduccionales ("PTM" en sus siglas en Inglés") han sido extensas y ahora hay un gran número de mecanismos PTM y reactivos conocidos en la técnica, y los nuevos se están desarrollando regularmente. Las técnicas y reactivos para la PEGilación incluyen, por ejemplo: (i) conectores especializados y químicas de acoplamiento (véanse, por ejemplo, los reactivos y tecnologías revisados por Harris, J. M., Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 459-476 (2002) y las referencias primarias revisadas allí); (ii) PEG ramificados que permiten eficazmente que grupos PEG adicionales estén unidos a un solo sitio de conjugación (véase, por ejemplo, Veronese, F.M. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 12:177-180 (2002)); (iii) PEGilación específica de sitio, incluyendo monopegilación específica de sitio (véase, por ejemplo, Chapman, A.P. et al., Nature Biotech 17: 780-783 (1999); y (iv) PEGilación enzimática dirigida al sitio (p. ej., utilizando una reacción de la transglutaminasa según lo descrito por Sato, H., Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 487-504 (2002)). También existen tecnologías adicionales y reactivos disponibles a partir de un número creciente de proveedores comerciales (véase, p. ej., Nektar/Shearwater (www.nektar.com), SunBio (www.sunbio.com) y www.sunbio.com/peg-shop), Celares GmbH (www.celares.com), et al.).

B. Perfiles de expresión en tejidos de sHASEGP.

Mientras que anteriormente se consideraba específica de testículo, la sHASEGP humana se expresa en múltiples tejidos en seres humanos cuando se utilizan técnicas más sensibles tales como RT-PCR. La transcripción de sHASEGP se encuentra en médula (cerebro), endotelio microvascular, próstata, mama, retina, melanocitos humanos reunidos, corazón fetal, y útero grávido. La sHASEGP también se expresa en tumores de células germinales. La detección basada en RT-PCR de los transcritos de sHASEGP se requiere generalmente para detectar niveles en tejidos distintos de testículo.

C. Ensayos para determinar la actividad enzimática de sHASEGP

Ensayo de microtitulación turbidométrico para determinar la actividad hialuronidasa

Actividad hialuronidasa puede detectarse por medio de un ensayo turbidimétrico modificado en solución de suero acidulado. Los reactivos necesarios son los siguientes:

2X-Agua desionizada esterilizada mediante UV o agua estéril para irrigación Braun		R5000-01
Hylumed Medical - Hialuronato de Sodio, HA de Alto Peso Molecular	Genzyme Avanzados	Biomateriales 4876
Patrón de Referencia de Hialuronidasa	USP	31200
Acetato de Potasio, Granular, USP, ACS	JTBaker	2914-01
Ácido Acético, Glacial, 99+%	Sigma	A-6283
Monohidrato de Fosfato de Sodio Monobásico, USP Granular	Mallinkrodt	7774
Fosfato de sodio Dibásico Anhidro, USP	Mallinkrodt	7771
Cloruro de Sodio, Cristales, GR, ACS	EMScience	SX0420-5
Producto Hidrolizado Enzimático de Gelatina	Sigma	G-0262
Suero de Caballo, Grupo de Donantes, Cultivo de Hibridoma Sometido a Ensayo, Origen EE.UU.	Sigma	H-1270
Albúmina de suero humano al 20%	Griffols	
Ácido Clorhídrico, Reactivo ACS	Sigma	H-7020
Cloruro de calcio, dihidrato, Granular, USP, -FCC	JTBaker	1336-01

Se preparan Los siguientes reactivos: Solución de Tampón de Acetato - 14,0 g de acetato de potasio y 25,0 mL de ácido acético glacial en agua para preparar 1000 mL. Solución de Tampón de Fosfato - 2,5 g de fosfato monobásico de sodio, 1,0 g de fosfato de sodio dibásico anhidro, y 8,2 g de cloruro de sodio en agua para preparar 1000 mL. Solución de Partida de Diluyente de Enzima - 500 mL de solución tampón de fosfato con 500 mL de agua. Solución Trabajo de Diluyente de Enzima - 33 mg de gelatina hidrolizada en 50 mL de Solución de Partida de Diluyente de Enzima-preparada en el plazo de 2 horas de uso. Solución Tampón de Estabilización de la Muestra (Sol. "SSB") - 125 microlitros (µl) de una solución albúmina de suero humano al 20% y 50 µl de una solución 1 M de cloruro de calcio en 50 mL de Solución de Trabajo de Diluyente de Enzima, y mezclar bien. Solución de Partida de Suero-Diluir 1 volumen de Suero de Caballo con 9 volúmenes de Solución Tampón de Acetato. Ajustar con ácido clorhídrico 4 N a un pH de 3,1 y permita que la solución repose a temperatura ambiente durante 18 a 24 hrs. Almacenar la solución a 4°C, y el utilizar de un plazo de 30 días. Solución de Trabajo de Suero - 10 mL de la Solución de Partida de Suero en 30 mL de la solución tampón de acetato, ajustada a la temperatura ambiente. Solución de Partida de Ácido Hialurónico - Sal de sodio de ácido hialurónico a una concentración 5,0 mg/mL en agua. Solución de Trabajo de

5 Ácido Hialurónico-. 0,75 mL de la Solución de Partida de Ácido Hialurónico en 4,25 mL de la Solución de Tampón de Fosfato. Solución de Partida Patrón- Un contenedor de Patrón de Referencia USP de Hialuronidasa a una concentración de 1000 unidades/mL en agua, alícuotas en porciones de 50 µL, y almacenadas a -20°C. Solución de Trabajo Patrón- 40 µl de Solución de Partida Patrón en 960 µl de Solución de Trabajo de Diluyente de Enzima fría para obtener una solución con una concentración conocida de 40 Unidades/mL, preparada inmediatamente antes de su uso en el ensayo.

10 Todas las muestras de enzimas se diluyen en una placa de 96 pocillos de "Baja Unión a Proteínas" de acuerdo con las siguientes pautas:

15 a) El intervalo de máxima sensibilidad de este ensayo es entre 10-30 Unidades/mL. Para reducir al mínimo el número de veces que un ensayo debe repetirse con el fin de obtener resultados que están dentro del intervalo, primero determinar el número aproximado del total de unidades/mL para la muestra, y a continuación elegir una dilución (número entero) de tal manera que la concentración final sea de aproximadamente 20 Unidades/mL.

b) Los volúmenes de muestra mínimos necesarios para llevar a cabo el ensayo son los siguientes: Fracciones FPLC = 50 µL, Sobrenadantes de Cultivo de Tejido= 1 mL, Material Purificado/Concentrado/Etapa Final = 10 µL.

20 c) Para las muestras con diluciones seriadas, se preparan por triplicado diluciones 1:10 en la placa de 96 pocillos de "Baja Unión a Proteínas" pipeteando 360 µl de la solución "SSB" y 40 µl de la Muestra en cada pocillo.

Para la preparación del Patrón USP preparar la Curva Patrón USP en la placa de 96 pocillos de "Baja Unión a Proteínas" como sigue:

Curva Patrón USP:

Pocillos:	Patrón:	Sol. de Diluyente de Enzima (en µl):	Sol. de trabajo Patrón (en µl):	Conc. final (en Unidades/ml):
A1-A3	St01	0	100	40
B1-B3	ST02	20	80	32
C1-C3	ST03	40	60	24
D1-D3	ST04	60	40	16
E1-E3	ST05	80	20	8
F1-F3	ST06	90	10	4
G1-G3	ST07	100	0	0

25 Para la preparación del Control de Ácido Hialurónico en las columnas 1-3, preparar el control de H.A. El Control en la placa de 96 pocillos de "fondo plano" se prepara de la siguiente manera:

Controles de HA:

Pocillos:	Control:	Sol. de Trabajo de Ácido Hialurónico (en µL):	Sol. de Trabajo de Diluyente de Enzima (en µL):
H1-H3	CO01	0	60

30 La Placa de Reacción: Se pipetea 30 µL por pocillo de Solución de Trabajo de Ácido Hialurónico utilizando una pipeta de transferencia de 8 canales de 50 µL a una placa de microtitulación de 96 pocillos de "Fondo Plano" dejando vacíos los pocillos H1-H3. Se pipetea 60 µL/pocillo de Solución de Trabajo de Diluyente de Enzima a los pocillos H1-H3 del mismo placa como control de HA.

35 Solución de Trabajo de Suero: Se dispensan 40 mL de Solución de Trabajo de Suero a una cubeta de transferencia y al continuación al Bloque de Calor.

40 Etapa de Pre-calentamiento: Una vez que ambas placas han sido preparadas, la placa de 96 Pocillos de Baja Unión a Proteínas que contenía las muestras diluidas, los patrones, los controles y la placa de 96 pocillos de Fondo Plano que contiene la Solución de Trabajo de Ácido Hialurónico se colocan sobre un bloque de calor y se permite que se calienten durante 5 min. a 37°C.

45 La reacción se inicia mediante la adición de Enzima al Sustrato: 30 µL de la placa de enzima a todos los pocillos en la columna Núm. 1 de la placa de 96 pocillos de fondo plano (que contiene el sustrato) utilizando una pipeta de 8 canales de 5-50 µL. La mezcla de reacción Enzima/Sustrato se aspira 5 veces (arrastrando la solución arriba y abajo con la transferencia durante los primeros 15 segundos para asegurar la mezcla completa de la muestra. Después de mezclar la enzima y el sustrato, las puntas se eyectan y se carga una nueva serie de puntas en los pipeteadores de

transferencia para la siguiente columna. Se reinicia un temporizador, y al tiempo (t) = 0:30, este proceso se repite para la columna 2. En el siguiente intervalo de 30 segundos (t) = 1:00, este proceso se repite para la columna 3. Este proceso se repite moviendo de izquierda a derecha por la placa, cada 30 segundos hasta que todos los pocillos contienen tanto enzima como sustrato.

5 Detención de la reacción: Cuando el temporizador alcanza los 6 minutos (t) = 6:00, se pipetea 240 µL de la Solución de Trabajo de Suero a cada pocillo, utilizando una pipeta de transferencia de 8 canales de 50-300 µL, a la columna 1 de la placa de fondo plano de 96 pocillos del Reservorio de Reactivo de 50 mL. La mezcla se aspira 3 veces (arrastrando la solución arriba y abajo con el Pipeteador de Transferencia) durante los primeros 10 segundos para asegurar la mezcla completa. El proceso se repite cada 30 segundos, partiendo de la columna 1 a 12. Después de completar la última columna (columna 12), la placa de reacción se retira del bloque de calor y se coloca la placa en la bandeja de lectura del lector de placas a 640 nM. Se genera un ajuste de la curva lineal a partir de la curva patrón que permite la extrapolación de las muestras de ensayo.

15 Ensayos alternativos para hialuronidasa

Ensayo de microtitulación de hialuronano biotinilado

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

30 La actividad específica de hialuronidasa se expresa en unidades de reducción de la turbidez (TRU). Una TRU se define como la cantidad de actividad hialuronidasa necesaria para reducir la turbidez de una solución acidulada de ácido hialurónico y es equivalente a las unidades U.S.P/National Formulary (NF XIII) (NFU). El ensayo enzimático de tipo ELISA utilizado para la purificación se relaciona con la unidad TRU, NFU, y U.S.P a través de una curva patrón de una muestra de hialuronidasa (p. ej., USP) normalizada a través de la U.S.P. Por lo tanto, las actividades enzimáticas determinadas por el ensayo enzimático de tipo ELISA son en realidad TRU relativas, ya que la actividad de la enzima no se mide en realidad utilizando el ensayo turbidométrico (Dorfman et al., 1948, J. Biol. Chem. 172:367).

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

45 Los sustratos de glicosaminoglicanos sustancialmente purificados también se pueden utilizar para en un Ensayo de Desplazamiento en Gel. Los glicosaminoglicanos se mezclan con sHASEGP recombinante para someter a ensayo la actividad endoglucosidasa que da como resultado un cambio en la movilidad de sustrato dentro del gel. El condroitin-4 y 6 sulfato, el dermatán sulfato, el heparán sulfato se pueden obtener de Sigma Chemical. El hialuronano de cordón umbilical humano se puede obtener de ICN. Cada sustrato de ensayo se diluye a 0,1 mg/mL en un tampón que oscila de pH 3,5 a 7,5. Se mezclan muestras de 10 µL de sHASEGP purificada o medios acondicionados de células que expresan sHASEGP, con 90 µL de sustrato de ensayo en tampón deseado y se incuban durante 3 horas a 37°C. después de la incubación las muestras se neutralizan con tampón de muestra (Tris EDTA pH 8,0, Azul de Bromofenol y glicerol) seguido de electroforesis. Los glicosaminoglicanos se detectan por tinción de los geles en Azul Alcian al 0,5% en Ácido Acético Glacial al 3% durante una noche seguido de la decoloración en Ácido Acético Glacial al 7%. La degradación se determina por la comparación de la movilidad del sustrato en presencia y ausencia de enzima.

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

60 D. Identificación y aislamiento de genes del polipéptido sHASEGP.

El gen del polipéptido sHASEGP y/o los dominios del mismo, se pueden obtener mediante métodos bien conocidos en la técnica para el aislamiento de ADN. Se puede utilizar cualquier método conocido por los expertos en la técnica

para la identificación de ácidos nucleicos que codifican genes deseados. Cualquier método disponible en la técnica se puede utilizar para obtener un clon de ADNc o de ADN genómico completo (es decir, que abarca la región codificante completa) que codifica un polipéptido sHASEGP. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede utilizar para amplificar una secuencia que se expresa en los tejidos normales, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican un polipéptido sHASEGP (SEC NO: 1 y 2), en una biblioteca genómica o de ADNc. Los cebadores de oligonucleótidos que hibridan con secuencias en los extremos 3' y 5' de las secuencias identificadas se pueden utilizar como cebadores para amplificar mediante secuencias de PCR a partir de una muestra de ácido nucleico (ARN o ADN, generalmente una biblioteca de ADNc, a partir de una fuente apropiada (e. testículo, próstata, mama).

La PCR se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el uso de un termociclador Perkin-Elmer Cetus y polimerasa Taq (Gene Amp). El ADN amplificado puede incluir ARNm o ADNc o ADN genómico de cualquier especie eucariótica. Se puede elegir sintetizar varios cebadores degenerados diferentes, para su uso en las reacciones de PCR.

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

Después de la amplificación satisfactoria del ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia del polipéptido sHASEGP identificada o de un ácido nucleico que codifica toda o una porción de un homólogo del polipéptido sHASEGP, ese segmento puede ser clonado y secuenciado molecularmente, y utilizado como una sonda para aislar un ADNc completo o clon genómico. Esto, a su vez, permite la determinación de la secuencia de nucleótidos completa del gen, el análisis de su expresión, y la producción de su producto proteico para el análisis funcional. Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos, se puede determinar un marco de lectura abierto que codifica el producto proteico del gen de polipéptido sHASEGP mediante cualquier método bien conocido en la técnica para la determinación de marcos de lectura abiertos, por ejemplo, utilizando programas informáticos disponibles públicamente para el análisis de la secuencia de nucleótidos. Una vez que se define un marco de lectura abierto, es rutinario determinar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el marco de lectura abierto. De esta manera, se pueden identificar las secuencias de nucleótidos de la totalidad de los genes del polipéptido sHASEGP así como las secuencias de aminoácidos de las proteínas y análogos de polipéptidos sHASEGP.

Cualquier célula eucariota puede servir potencialmente como fuente de ácido nucleico para la clonación molecular del gen del polipéptido sHASEGP. Los ácidos nucleicos se pueden aislar de vertebrados, mamífero, seres humanos, suidos, bóvidos, félicos, aves, équidos, cánidos, así como fuentes de primates adicionales, insectos, plantas et al. organismos. El ADN puede obtenerse por procedimientos convencionales conocidos en la técnica a partir de ADN clonado (p. ej., una "biblioteca" de ADN), mediante síntesis química, mediante clonación de ADNc, o mediante la clonación de ADN genómico, o fragmentos del mismo, purificados a partir de la célula deseada (véase, por ejemplo, Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Glover, D. M. Ed., 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, Reino Unido Vol. 1, 11. Los clones derivados de ADN genómico pueden contener regiones de ADN reguladoras e intrones además de las regiones codificantes; los clones derivados de ADNc contendrán solo secuencias de exones. Para cualquier fuente, el gen es clonado en un vector adecuado para la propagación del mismo.

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

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

Alternativamente, se puede utilizar ADNasa en presencia de manganeso para fragmentar el ADN, o el ADN puede ser físicamente cortado, por ejemplo, mediante sonicación. Los fragmentos de ADN lineales pueden ser separados a continuación de acuerdo con el tamaño mediante técnicas convencionales, incluyendo pero no limitadas a, electroforesis en gel de agarosa y poli(acrilamida) y cromatografía en columna.

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

Por ejemplo, una porción del gen del polipéptido sHASEGP (de cualquier especie) (p. ej., un producto de

amplificación de PCR obtenido como se describió anteriormente o un oligonucleótido que tiene una secuencia de una porción de la secuencia de nucleótidos conocida) o su ARN específico, o un fragmento del mismo pueden ser purificados y marcados, y los fragmentos de ADN generados pueden escrutarse mediante hibridación de ácido nucleico con la sonda marcada (Benton y Davis, Science 196: 180 (1977); Grunstein y Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3961 (1975)). Aquellos fragmentos de ADN con homología sustancial con la sonda hibridarán. También es posible identificar el fragmento apropiado mediante digestión o digestiones con enzimas de restricción y comparación de tamaños de los fragmentos con los esperados de acuerdo con un mapa de restricción conocido si tal está disponible o mediante el análisis de la secuencia ADN y comparación con la secuencia de nucleótidos conocida del polipéptido sHASEGP. Además la selección se puede llevar a cabo sobre la base de las propiedades del gen. Alternativamente, la presencia del gen puede detectarse mediante ensayos basados en las propiedades físicas, químicas, o inmunológicas de su producto expresado. Por ejemplo, se pueden seleccionar los clones de ADNc o clones de ADN que hibridan-seleccionan el ARNm adecuado que producen una proteína que, por ejemplo, tiene migración electroforética, comportamiento de isoelectroenfoque, mapas de digestión proteolítica, propiedades antigénicas, actividad hialuronidasa similares o idénticos. Si un anticuerpo anti-polipéptido sHASEGP está disponible, la proteína puede identificarse por unión del anticuerpo marcado a los supuestos clones que sintetizan el polipéptido sHASEGP, en un procedimiento de tipo ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas).

Las alternativas para aislar el ADN genómico del polipéptido sHASEGP incluyen, pero no se limitan a, sintetizar químicamente la secuencia del gen a partir de una secuencia conocida o preparando el ADNc con el ARNm que codifica el polipéptido sHASEGP.

Por ejemplo, el ARN para la clonación del ADNc del gen del polipéptido sHASEGP puede aislarse a partir de células que expresan la proteína. Los ácidos nucleicos identificado y aislado se pueden insertar a continuación en un vector de clonación apropiado. Se puede utilizar un gran número de sistemas de vector-anfitrión conocidos en la técnica. Los posibles vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema vector debe ser compatible con la célula anfitrión utilizada. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como derivados del plásmido pBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). La inserción en un vector de clonación puede, por ejemplo, llevarse a cabo ligando el fragmento de ADN a un vector de clonación que tiene extremos cohesivos complementarios.

Si los sitios de restricción complementarios utilizados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente. Alternativamente, cualquier sitio deseado puede ser producido ligando secuencias de nucleótidos (conectores) sobre los extremos del ADN; estos conectores ligados pueden incluir oligonucleótidos sintetizados químicamente específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen del polipéptido sHASEGP pueden modificarse mediante adición de un cola homopolimérica.

Las moléculas recombinantes pueden introducirse en células anfitrionas a través de transformación, transfección, infección, electroporación, precipitación con calcio et al. métodos, de modo que se generen muchas copias de la secuencia del gen.

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

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

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

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

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

También se describen células que contienen los vectores. Las células incluyen células eucariotas y procariotas, y los vectores adecuados para su uso en las mismas.

Se describen células eucariotas, incluyendo Células de Ovario de Hámster Chino (DG44) deficientes en dihidrofolato reductasa, que contienen los vectores. Las células adecuadas incluyen células de levadura, células fúngicas, células vegetales, células de insecto y células animales. Las células se utilizan para producir un polipéptido sHASEGP o un dominio Hialuronidasa del mismo (a) cultivando las células descritas anteriormente bajo condiciones en las que el polipéptido sHASEGP codificado o el dominio Hialuronidasa del polipéptido sHASEGP son expresados por la célula, y a continuación (b) recuperar la proteína del dominio Hialuronidasa expresado. En los ejemplos, el dominio Hialuronidasa es secretado al medio.

En un ejemplo, se describen los vectores incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad Hialuronidasa y contiene toda o una porción solo del dominio Hialuronidasa, o múltiples copias del mismo, de una proteína sHASEGP. También se describen vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio Hialuronidasa y también se describen porciones adicionales de una proteína sHASEGP hasta e incluyendo una proteína sHASEGP completa, así como múltiples copias de los mismos. Los vectores pueden seleccionarse para la expresión de la proteína sHASEGP o dominio Hialuronidasa de la misma en la célula o de modo que la proteína sHASEGP se exprese como una proteína secretada. Alternativamente, los vectores pueden incluir las señales necesarias para la secreción de proteínas codificadas. Cuando se expresa el dominio Hialuronidasa el ácido nucleico está ligado al ácido nucleico que codifica una señal de secreción, tal como una secuencia señal del factor de apareamiento de *Saccharomyces cerevisiae* o una porción de la misma, o la secuencia señal nativa.

Con el fin de generar una sHASEGP activa a pH neutro soluble, se requieren células capaces de introducir glicosilación ligada a N. En el ejemplo preferido, las Células de Ovario de Hámster Chino deficientes en dihidrofolato reductasa tales como DG44, se someten a electroporación con un plásmido que codifica un promotor fuerte de mamífero, tal como CMV, un ácido nucleico que codifica una sHASEGP seguido de un sitio interno de entrada al ribosoma, el gen de la dihidrofolato reductasa de ratón y la secuencia de poliadenilación de SV40 como se muestra en SEQ ID NO 51. Dichas células se cultivan a continuación en un medio químicamente definido en ausencia de hipoxantina y timidina, seguido de posterior amplificación génica con concentraciones crecientes de metotrexato.

Se puede utilizar una variedad de sistemas anfitrión-vector para expresar la secuencia codificante de proteínas. Estos incluyen, pero no se limitan a sistemas de células de mamíferos infectadas con virus vaccinia p. ej., virus, adenovirus, etc.); sistemas de células de insecto infectadas con virus (p. ej., baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófago, ADN, ADN de plásmido, o ADN de cósmido. Los elementos de expresión de los vectores varían en sus fuerzas y especificidades. Dependiendo del sistema anfitrión-vector utilizado, se puede utilizar cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados. Téngase en cuenta que la expresión bacteriana del ADN de sHASEGP no dará lugar a una sHASEGP catalíticamente activa per se, pero cuando se combina con la maquinaria de glicosilación apropiada puede ser glicosilada artificialmente como tal.

Cualquier método conocido por los expertos en la técnica para la inserción de fragmentos de ácido nucleico a un vector se puede utilizar para construir vectores de expresión que contienen un gen quimérico que contiene señales de control de la transcripción/traducción apropiadas y secuencias codificantes de proteínas. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante y sintéticas in vitro y recombinantes in vivo (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptido sHASEGP o dominios, derivados, fragmentos u homólogos del mismo, puede ser regulada por una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que los genes o fragmentos de los mismos se expresen en un anfitrión transformado con la molécula o moléculas de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede controlarse mediante cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. En un ejemplo específico, el promotor no es nativo para los genes del polipéptido sHASEGP. Los promotores que se pueden utilizar incluyen pero no se limitan al promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, *Nature* 290: 304-310 (1981) el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., *Ce//22:787-797* (1980) el promotor de la timidina quinasa del herpes (Wagner et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1441-1445 (1981) las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster et al., *Nature* 296: 39-42 (1982)); vectores de expresión procariotas tales como el promotor de 13-lactamasa (Villa-Kamaroff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3727-3731 1978)) o el Promotor TAC, Deboer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25 (1983)); véase también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": en *Scientific American* 242: 79-94 (1980)); los vectores de expresión de plantas que contienen el promotor de la opalina sintetasa (Herrar-Estrella et al., *Nature* 303: 209-213(1984)) o el promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner et al., *Nucleic Acids Res.* 9: 2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bifosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., *Nature* 310: de 115-120 (1984)); elementos promotores de levaduras y otros hongos tales como el promotor Gal4, el promotor de la alcohol deshidrogenasa, el promotor de la fosfoglicerol quinasa, el promotor de la fosfatasa alcalina, y las siguientes regiones de control de la transcripción en animales que presentan especificidad tisular y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control gen de la elastasa I que es activo en células acinares pancreáticas (Swift et al., *Cell* 38: 639-646 (1984.); Ornitz et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); Macdonald, *Hepatology* 7: 425-515 (1987)); la región de control del gen de la insulina que es activo en células beta pancreáticas (Hanahan et al., *Nature* 315: 115-122 (1985)), la región

- de control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., Cell 38: 647-658 (1984); Adams et al., Nature 318: 533-538 (1985); Alexander et al., Mol Cell Biol 7: 1436-1444 (1987)), la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activo en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., Cell 45: 485-495 (1986)), la región de control del gen de la albúmina que es activo en el hígado (Pinckert et al., Genes and Devel. 1: 268- 276 (1987)), la región de control del gen de la alfa-fetoproteína que es activo en el hígado (Krumlauf et al., Mol. Cell. Biol. 5: 1639/48 (1985); Hammer et al., Science 235: 1987, 53-58)), la región de control del gen de la alfa-1 antitripsina que es activo en el hígado (Kelsey et al., Genes and Devel. 1: 161-171 (1987)), la región de control del gen de la beta globina que es activo en células mieloides (Mogram et al., Nature. 315: 338-340 (1985); Kollias et al., CE//46: 89-94 (1986)), la región de control del gen de la proteína básica de mielina que es activo en oligodendrocitos de cerebro (Readhead et al., Cell 48: 703-712 (1987)), la región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina que es activo en músculo esquelético (Sani, Nature 314: 283-286 (1985)), y región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina que es activo en gonadotropos del hipotálamo (Mason et al., Science 234: 1372-1378 (1986)).
- 15 En un ejemplo específico, se utiliza un vector que contiene un promotor conectado operativamente a ácidos nucleicos que codifican un polipéptido sHASEGP o un dominio, fragmento, derivado u homólogo, del mismo, uno o más orígenes de replicación y opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (p. ej., un gen de resistencia a los antibióticos).
- 20 También pueden ser necesarias señales de iniciación específicas para una traducción eficaz de una secuencia de sHASEGP. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En los casos en los que sHASEGP, su codón de iniciación y secuencias aguas arriba se insertan en el vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias señales de control de la traducción adicionales. Sin embargo, en los casos en que los que solo se inserta la secuencia codificante, o una porción de la misma, se deben proporcionar las señales de control de la transcripción exógenas incluyendo el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debe estar en el marco de lectura correcto para asegurar la transcripción del inserto completo. Los elementos transcripcionales exógenos y los codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (Scharf D et al. (1994) Results Probl Cell Differ 20: 125-62; Bittner et al. (1987) Methods in Enzymol 153: 516-544).
- 30 Además, se puede elegir una cepa de célula anfitriona por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la manera deseada. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento post-traduccional que escinde una forma "prepro" de la proteína también puede ser importante para la correcta inserción, plegamiento y/o función. Diferentes células anfitrionas tales como CHO (DG44, DXB 11 CHO-K1), HeLa, MDCK, 293, WI38, etc. tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades post-traduccionales y pueden ser elegidos para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína foránea introducida.
- 40 Para la producción de proteínas recombinantes de alto rendimiento a largo plazo, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable sHASEGP se pueden transformar utilizando vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Tras la introducción del vector, las células pueden cultivarse durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan con éxito las secuencias introducidas. Se pueden hacer proliferar grupos resistentes de células transformadas de manera estable utilizando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de célula.
- 45 Se puede utilizar cualquier número de sistemas de selección para recuperar las líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero no se limitan a, los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler M et al. (1977) Cell 11:223-32) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy I et al. (1980) Cell 22:817-23) que pueden emplearse en células TK- o APRT-, respectivamente. Asimismo, la resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas puede usarse como base para la selección; por ejemplo, DHFR que confiere resistencia a metotrexato (Wigler M et al. (1980) Proc Natl Acad Sci 77: 3567-70); npt, que confiere resistencia al aminoglucósido neomicina y G-418 (Colbere-Garapin F et al. (1981) J Mol Biol 150: 1-14) y als o pat, que confieren resistencia a clorsulfurón y fosfinotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, supra). Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo, trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman, S C, y R C Mulligan (1988) Proc Natl Acad Sci 85:8047-51). Recientemente, el uso de marcadores visibles ha ganado popularidad con marcadores tales como antocianinas, beta glucuronidasa y su sustrato, GUS, y luciferasa y su sustrato, luciferina, siendo ampliamente utilizados no solo para identificar transformantes, sino también para cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable atribuible a un sistema vector específico (Rhodes C A et al. (1995) Methods Mol Biol 55: 121-131).

Identificación de transformantes que contienen la secuencia de polinucleótidos

Aunque la presencia/ausencia de expresión del gen marcador sugiere que el gen de interés también está presente, se deben confirmar la presencia y expresión de una sHASEGP activa. Por ejemplo, si la sHASEGP se inserta dentro de una secuencia del gen marcador, las células recombinantes que contienen sHASEGP se pueden identificar por la ausencia de función del gen marcador. Alternativamente, un gen marcador puede ser colocado en tándem con una secuencia de sHASEGP bajo el control de un único promotor. La expresión del gen marcador en respuesta a la inducción o selección usualmente indica también la expresión del tándem sHASEGP. La detección de una sHASEGP activa a pH neutro apropiadamente glicosilada puede determinarse por medio de ensayos de los medios acondicionado para determinar la actividad enzimática de sHASEGP en condiciones apropiadas.

Purificación de sHASEGP

Las células anfitrionas transformadas con una secuencia de nucleótidos de sHASEGP pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante es preferiblemente secretada pero puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector utilizados. Como entenderán los expertos en la técnica, los vectores de expresión que contienen sHASEGP pueden diseñarse con secuencias señal que faciliten la secreción directa de sHASEGP a través de una membrana celular procarionta o eucariota. Otras construcciones recombinantes pueden unir sHASEGP a la secuencia nucleótidos que codifica un dominio de polipéptido que facilitará la purificación de proteínas solubles (Kroll D J et al. (1993) DNA Cell Biol 12:441-53; véase la discusión de vectores más abajo que contienen proteínas de fusión).

La sHASEGP también puede expresarse como una proteína recombinante con uno o más dominios polipeptídicos adicionales añadidos para facilitar la purificación de proteínas. Tales dominios que facilitan la purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelantes de metales tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada y el dominio utilizado en el sistema de extensión/purificación por afinidad FLAGS (Immunex Corp, Seattle Wash.). La inclusión de secuencias conectoras escindibles tales como el Factor Xa o enteroquinasa (Invitrogen, San Diego Calif.) entre el dominio de purificación y la sHASEGP es útil para facilitar la purificación. Uno de tales vectores de expresión proporciona la expresión de una proteína de fusión que compromete una sHASEGP y contiene ácido nucleico que codifica residuos de histidina 6 seguidos por tiorredoxina y un sitio de escisión de enteroquinasa. Los residuos de histidina facilitan la purificación en IMIAC (cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados como describen Porath et al. (1992) en Protein Expression and Purification 3: 263-281), mientras que el sitio de escisión de enteroquinasa proporciona un medio para purificar la quimioquina a partir de la proteína de fusión.

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

Los vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes, o porciones de las mismas, de un polipéptido sHASEGP, se preparan, por ejemplo, subclonando las porciones codificantes en el sitio de restricción EcoR1 de cada uno de los tres vectores pGEX (vectores de expresión de glutatión S-transferasa (Smith y Johnson, Gene 7: 31-40 (1988).) Esto permite la expresión de productos en el marco de lectura correcto. Los vectores y sistemas ilustrativos para la expresión de los dominios hialuronidasa de los polipéptidos sHASEGP incluyen los vectores de Pichia bien conocidos (disponibles, por ejemplo, de Invitrogen, San Diego, CA), particularmente los diseñados para la secreción de las proteínas codificadas. La proteína también puede expresarse citoplásmicamente, por ejemplo en los cuerpos de inclusión. Un vector ilustrativo se describe en los ejemplos.

Los plásmidos para la transformación de células de E. coli, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, la Patente de los Estados Unidos 4.952.496; disponible de Novagen, Madison, WI; véase, también la bibliografía publicada por Novagen describiendo el sistema).

Tales plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T7lac, el terminador de T7, el operador lac de E. coli inducible, y el gen represor lac; pET 12A-C, que contiene el promotor de T7, terminador de T7, y la señal de secreción de OMPT de E. coli; y pET 15B y PET19B (Novagen, Madison, WI), que contienen una secuencia líder etiqueta de His para su uso en la purificación con una columna His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión después de la purificación sobre la columna; la región del promotor T7-lac y el terminador de T7.

Los vectores se introducen en células anfitrionas, tales como células de *Pichia* y células bacterianas, tales como *E. coli*, y las proteínas expresadas en las mismas. Las cepas de *Pichia* ilustrativas incluyen, por ejemplo, GS115. Los anfitriones bacterianos ilustrativos contienen copias cromosómicas de ADN que codifica la ARN polimerasa de T7 conectada operativamente a un promotor inducible, tal como el promotor LACUV (véase, la patente de los Estados Unidos Núm. 4.952.496). Tales anfitriones incluyen, pero no se limitan a, la cepa lisogénica de *E. coli* BL21 (DE3).

Las dominios, derivados y análogos de sHASEGP se pueden producir por varios métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una vez que se identifica una célula recombinante que expresa un polipéptido sHASEGP o un dominio, fragmento o derivado del mismo, se puede aislar y analizar el producto génico individual. Esto se consigue mediante ensayos basados en las propiedades físicas y/o funcionales de la proteína, incluyendo, pero no limitados a, marcaje radioactivo del producto seguido de análisis mediante electroforesis en gel, inmunoensayo, entrecruzamiento a producto marcado con marcador, y ensayos de la actividad proteolítica.

Los polipéptidos sHASEGP pueden aislarse y purificarse por métodos convencionales conocidos en la técnica (ya sea a partir de fuentes naturales o células anfitrionas recombinantes que expresan los complejos o proteínas), incluyendo, pero no restringidos a cromatografía en columna (p. ej., intercambio iónico, afinidad, exclusión en gel, fase inversa a alta presión y líquida rápida de proteínas), centrifugación diferencial, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional utilizada para la purificación de proteínas.

En un ejemplo, una sHASEGP se puede purificar hasta homogeneidad a partir de los medios acondicionados definidos químicamente de células DG44 transfectadas con HZ24 y amplificadas con metotrexato mediante 1) diafiltración de flujo tangencial, 2) unión y elución a partir de cromatografía de intercambio aniónico, 3) flujo a través de cromatografía de fenilsefariosa, 4) unión y elución a partir de cromatografía de fenilboronato y 4) unión y elución con cromatografía de hidroxipatita.

Propiedades funcionales se pueden evaluar utilizando cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica.

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

Las manipulaciones de las secuencias de polipéptidos sHASEGP se pueden realizar a nivel de proteínas. También se contemplan en la presente memoria proteínas de polipéptidos sHASEGP, dominios de las mismas, derivados o análogos o fragmentos de las mismas, que se modifican diferencialmente durante o después de la traducción, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, pegilación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular.

Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo pero no limitadas a escisión química específica por bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, V8, NaBH₄, acetilación, formilación, oxidación, reducción, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina y otros de tales agentes.

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

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

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

Modificaciones- En la presente memoria se contempla una variedad de modificaciones de los polipéptidos y

dominios de sHASEGP. Una molécula de ácido nucleico que codifica sHASEGP puede ser modificada mediante cualquiera de numerosas estrategias conocidas en la técnica (Sambrook et al., (1990), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York). Las secuencias pueden ser escindidas en sitios apropiados con una o varias endonucleasas de restricción, seguido de modificación enzimática adicional si se desea, aisladas y ligadas in vitro. En la producción del gen que codifica un dominio, derivado o análogo de sHASEGP, debe tenerse cuidado para asegurar que el gen modificado conserva el marco de lectura de la traducción original, ininterrumpido por señales de parada de la traducción, en la región génica en donde se codifica la actividad deseada.

Además, las moléculas de ácido nucleico que codifican sHASEGP se pueden mutar in vitro o in vivo, para crear y/o destruir las secuencias de traducción, iniciación, y/o terminación, o para crear variaciones en regiones codificantes y/o formar nuevos sitios de endonucleasas de restricción o destruir los preexistentes, para facilitar adicionalmente la modificación in vitro. También, como se describe en la presente memoria se contemplan muteínas con alteraciones de la secuencia primaria, tales como sustituciones de restos Cys y eliminación o adición de sitios de glicosilación; la sHASEGP del SEQ ID NO: 1 tiene siete sitios de glicosilación potenciales. Tales mutaciones pueden efectuarse mediante cualquier mecanismo de mutagénesis conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, mutagénesis química y mutagénesis dirigida al sitio in vitro (Hutchinson et al., J. Biol. Chem. 253: 6551-6558 (1978)), uso de Conectores TABE (Pharmacia). En un ejemplo, un polipéptido sHASEGP o dominio del mismo se modifica para que incluya una etiqueta fluorescente. En otros ejemplos específicos, el polipéptido sHASEGP es modificado para que tenga un reactivo heterobifuncional, dichos reactivos heterobifuncionales se pueden utilizar para entrecruzar los miembros del complejo.

Además, se pueden sintetizar químicamente dominios, análogos y derivados de una sHASEGP. Por ejemplo, se puede sintetizar un péptido correspondiente a una porción de una sHASEGP, que incluye el dominio deseado o que media la actividad deseada in vitro mediante el uso de un sintetizador de péptidos. Además, si se desea, se pueden introducir aminoácidos no clásicos o análogos de aminoácidos químicos como una sustitución o adición en la secuencia de sHASEGP. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero no se limitan a los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido α -aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, S-ABU, e-Ahx, ácido 6-aminohexanoico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, 13-alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos de diseño tales como ti-metilaminoácidos, ca-metilaminoácidos, na-metilaminoácidos y análogos de aminoácidos en general. Además, el aminoácido puede ser d (dextrógiro) o l (levógiro).

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

Se requiere una sHASEGP humana correctamente N-glicosilada para generar una proteína catalíticamente estable. La N-glicosilación ligada a N de sHASEGP se puede lograr mediante diversas técnicas. La glicosilación de sHASEGP se puede lograr introduciendo ácidos nucleicos que codifican sHASEGP en células de origen eucariótico susceptibles de glicosilación ligada a N adecuada o alternativamente, poniendo en contacto el polipéptido sHASEGP con extractos libres de células o enzimas purificadas capaces de introducir los radicales de azúcares ligados a N deseados.

Selección de un sistema de expresión

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

Los sistemas de expresión eucarióticos adicionales que introducen glicosilación ligada a N para generar un producto de sHASEGP funcional pueden ser sometidos a ensayo introduciendo un plásmido de expresión de sHASEGP humana en dichas células y sometiéndolas a ensayo para determinar la actividad a pH neutro. La glicosilación ligada a N apropiada puede ser determinada por medio de análisis FACE de oligosacáridos liberados con PNGASA. Los perfiles de glicosilación de sHASEGP catalíticamente activos se describen adicionalmente en la presente memoria. La verificación de la glicosilación también puede realizarse mediante el tratamiento de sHASEGP de dichas células con PNGASA-F o por mediante el cultivo de dichas células en tunicamicina seguido de la introducción de los ácidos nucleicos que codifican sHASEGP.

N-glicosilación del polipéptido sHASEGP in vitro. El polipéptido sHASEGP puede ser N-glicosilado por contacto del polipéptido sHASEGP con extractos libres de células que contienen actividad capaz de transferir azúcares ligados a N al polipéptido sHASEGP, tales como membranas microsomales caninas o a través de transcripción y traducción acopladas como está comercialmente disponible (Promega Madison WI) .

Se considera que los oligosacáridos tienen un extremo reductor y un extremo no reductor, sea o no el sacárido en el

extremo reductor, de hecho, un azúcar reductor. De acuerdo con la nomenclatura aceptada, los oligosacáridos se representan en la presente memoria con el extremo no reductor a la izquierda y el extremo reductor a la derecha. Todos los oligosacáridos descritos en la presente memoria se describen con el nombre o abreviatura para el sacárido no reductor (p. ej., Gal), seguido por la configuración del enlace glicosídico (.alfa. o. beta.), el enlace del anillo, la posición en el anillo del sacárido reductor implicado en el enlace, y a continuación el nombre o la abreviatura del sacárido reductor (p. ej., GlcNAc). El enlace entre dos azúcares puede expresarse, por ejemplo, como 2,3, 2.fw darw.3, o (2,3). Cada sacárido es una piranosa.

Según se utiliza en la presente memoria, radical azúcar ligado a N se refiere a un oligosacárido unido a una SHASEGP a través del nitrógeno amídico de los residuos de Asn. Los oligosacáridos ligados a N se clasifican en varios tipos principales (oligomanosa, complejos, híbridos, sulfatados), todos los cuales tienen núcleos de (Man) 3-GlcNAc-GlcNAc anclados a través del nitrógeno amídico de los residuos de Asn que caen dentro de las secuencias Asn-Xaa-Thr/Ser- (donde Xaa no es Pro). Los sitios ligados a N a menudo son asignados indirectamente por la aparición de un ciclo "en blanco" durante la secuenciación. La identificación positiva puede realizarse después de la liberación del oligosacárido por la PNGasa F, que convierte la Asn glicosilada en Asp. Después de la liberación por la PNGasa F, los oligosacáridos ligados a N pueden purificarse utilizando cromatografía Bio-Gel P-6, con la reserva de oligosacáridos sometida a cromatografía de intercambio aniónico preparativa a alto pH (HPAEC) (Townsend et al., (1989) Anal. Biochem. 182, 1-8). Ciertos isómeros de oligosacáridos se pueden resolver utilizando HPAEC. Los residuos de fucosa desplazarán las posiciones de elución antes en el cromatograma de HPAEC, mientras que los residuos de ácido siálico adicionales aumentarán el tiempo de retención. El tratamiento concomitante de glicoproteínas cuyas estructuras de oligosacáridos son conocidas (p. ej., fetuina bovina, glicoproteína ácida a-1, ovoalbúmina, ARNasa B, transferrina) puede facilitar la asignación de los picos de oligosacáridos. Los oligosacáridos recogidos pueden caracterizarse por una combinación de análisis de unión composicional y de metilación (Waegheet al., (1983). Carbohydr Res 123, 281-304), con configuraciones anoméricas asignadas por medio de espectroscopía de RMN (Van Halbeek (1993) en Methods Enzymol 230).

Alternativamente, los oligosacáridos pueden ser identificados por fluorescencia asistida por electroforesis en carbohidratos (FACE) Callewaert et al. (2001) Glycobiology 11, 275-281.

G. Detección y caracterización de radicales de azúcares ligados a N en SHASEGP

La determinación de si una proteína es glicosilada de hecho es la etapa inicial en el análisis de glicanos de la glicoproteína. La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) se ha convertido en el método de elección como etapa final antes de la secuenciación de proteínas. Las proteínas glicosiladas a menudo migran como bandas difusas mediante SDS-PAGE. Una marcada disminución en el ancho de banda y el cambio en la posición de migración después del tratamiento con péptido-N4-(N-acetil-D-glucosaminil) asparragina amidasa (PNGasa F) se considera diagnóstico de glicosilación ligada a N. Si los otros tipos de glicosilación son predominantes deben utilizarse otros enfoques. Los métodos de transferencia de lectina proporcionan un enfoque que es independiente de la clase de glicosilación (N frente a O). Las lectinas, proteínas de unión a carbohidratos de diversos tejidos vegetales, tienen una alta afinidad y especificidad limitada para una amplia gama de epítomos de azúcar definidos que se encuentran en glicanos de glicoproteínas (Cummings, RD (1994) Methods in Enzymol. 230, 66-86). Cuando se conjugan con biotina o digoxigenina, pueden ser fácilmente identificadas en transferencias de membrana a través de una reacción colorimétrica que utiliza avidina o anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Haselbeck, et al. (1993) Methods in Mol. Biol. 14, 161-173), análoga a las reacciones de fosfatasa alcalina-anticuerpos secundarios empleadas en la transferencia Western. La detección con un panel de lectinas con especificidad bien definida puede proporcionar información considerable acerca del complemento de los hidratos de carbono de una glicoproteína. Es importante destacar que la amplificación del desarrollo de color es suficientemente alta para que 10-50 ng de una glicoproteína puedan ser observados fácilmente en una transferencia de membrana de una SDS-PAGE. Aunque las lectinas exhiben muy alta afinidad por sus ligandos cognados, algunas revelan avidez significativa por epítomos estructuralmente relacionados. Por lo tanto, es importante señalar cuidadosamente la posibilidad de reactividad cruzada cuando se elige un panel de lectinas y aplicar las que tienen mayor probabilidad de distinguir individualmente glicanos ligados a N complejos, híbridos y con alto contenido de manosa de las estructuras ligadas a O.

El análisis de monosacáridos también se puede utilizar para determinar si la SHASEGP está glicosilada y, como en el caso del análisis con lectinas proporciona información adicional sobre las características estructurales. El análisis de la composición de monosacáridos cuantitativa i) identifica proteínas glicosiladas, ii) proporciona la razón molar de azúcares individuales con respecto a la proteína, iii) sugiere, en algunos casos, la presencia de clases de oligosacáridos, iv) es la primera etapa en el diseño de una estrategia de elucidación estructural y v) proporciona una medida de la consistencia de producción para agentes terapéuticos de glicoproteínas recombinantes. En los últimos años la cromatografía de intercambio aniónico de alto pH con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) se ha utilizado ampliamente para determinar la composición de monosacáridos (Townsend, et al. (1995), en Carbohydrate Analysis: High-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis (Z. El Rassi ed.).

págs. 181-209.). Más recientemente, se han introducido métodos de marcaje basados en fluoróforos y muchos están disponibles en forma de kit. Una clara ventaja de los métodos fluorescentes es un aumento en la sensibilidad (50 veces). Una desventaja potencial es que diferentes monosacáridos pueden demostrar diferente selectividad por el fluoróforo durante la reacción de acoplamiento, ya sea en el producto hidrolizado o en la mezcla de patrón externo.

5 Sin embargo, el aumento en la sensibilidad y la capacidad para identificar qué monosacáridos están presentes a partir de una pequeña porción de la cantidad total de glicoproteína disponible, así como el potencial de una mayor sensibilidad utilizando fluorescencia inducida por láser hace atractivo este enfoque.

10 El análisis de la composición de monosacáridos de pequeñas cantidades de sHASEGP se realiza mejor en membranas PVDF (PSQ), ya sea después de electrotransferencia (Weitzhandler et al., (1993) J. Biol. Chem. 268, 5121-5130) o si se van a analizar alícuotas más pequeñas en transferencias puntuales. PVDF es una matriz ideal para análisis de carbohidratos puesto que no se unen a la membrana ni mono- ni oligosacáridos, una vez liberados mediante cualquiera de hidrólisis ácida o enzimática.

15 El análisis FACE es un medio eficaz para la detección de perfiles de glicosilación de sHASEGP. FACE™ N-Linked Oligosaccharide Profiling (Prozyme) con geles de oligosacáridos al 30% es uno de esos mecanismos. Los oligosacáridos escindidos a partir de 100 µg de glicoproteínas por digestión enzimática con N-Glicanasa (también conocida como PNGasa), marcados utilizando el fluoróforo ANTS, y separados mediante electroforesis se pueden utilizar para la detección de perfiles de glicosilación de sHASEGP. Las posiciones relativas de las bandas de

20 oligosacáridos se determinan ejecutando la muestra y diluciones de la muestra al lado de una escalera convencional de oligosacáridos que designa la distancia de migración en unidades de grado de polimerización (GP).

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

25 Varios tipos de ensayos se ilustran y se describen en la presente memoria. Se entiende que los dominios Hialuronidasa se pueden utilizar en otros ensayos. Se muestra aquí, sin embargo, que los dominios Hialuronidasa exhiben actividad catalítica.

Como tales, son ideales para ensayos de escrutinio in vitro.

30 También se pueden utilizar en ensayos de unión.

Los zimógenos, enzimas activadas y dominios hialuronidasa completos de sHASEGP se contemplan para su uso en cualquier ensayo de escrutinio conocido por los expertos en la técnica, incluyendo los descritos en la presente memoria. Por lo tanto la siguiente descripción, si se dirige a ensayos de Hialuronidasa está destinada a aplicarse al uso de un dominio Hialuronidasa de cadena sencilla o una porción catalíticamente activa del mismo de cualquier Hialuronidasa, incluyendo una sHASEGP. Otros ensayos, tales como ensayos de unión se describen en la presente memoria, particularmente para su uso con una sHASEGP, incluyendo cualquier variante, tales como variantes de empalme de los mismos.

40 1. Ensayos catalíticos para identificación de agentes que modulan la actividad Hialuronidasa de una proteína sHASEGP. Los métodos para identificar un modulador de la actividad catalítica de una sHASEGP, particularmente un dominio Hialuronidasa de cadena sencilla o porción catalíticamente activa del mismo, se describen en la presente memoria. Los métodos se pueden llevar a la práctica: poniendo en contacto la sHASEGP, un zimógeno o forma

45 activada completos y, particularmente, un dominio de cadena sencilla de los mismos, con un sustrato de la sHASEGP en presencia de una sustancia de ensayo, y detectando la proteólisis del sustrato, mediante lo cual se evalúa la actividad de la sHASEGP, y comparando la actividad con un control. Por ejemplo, un control puede ser la actividad de la sHASEGP evaluada poniendo en contacto una sHASEGP, incluyendo un zimógeno completo o forma

50 activada completos y, particularmente, un dominio de cadena sencilla de los mismos, particularmente un dominio de cadena sencilla de los mismos, con un sustrato de la sHASEGP, y detectando la proteólisis del sustrato, con lo cual se evalúa la actividad de la sHASEGP. Los resultados en presencia y ausencia de los compuestos de ensayo se comparan. Una diferencia en la actividad indica que la sustancia de ensayo modula la actividad de la sHASEGP. También se contemplan los activadores de la escisión para la activación de la sHASEGP; dichos ensayos se comentan a continuación.

55 En un ejemplo se escrutan simultáneamente una pluralidad de las sustancias de ensayo en el método de escrutinio anterior. En otra realización, la sHASEGP se aísla de una célula diana como medio para identificar a continuación agentes que son potencialmente específicos para la célula diana.

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

Un método incluye las etapas de (a) poner en contacto el polipéptido sHASEGP o dominio Hialuronidasa del mismo

con uno o una pluralidad de compuestos de ensayo en condiciones que conducen a la interacción entre el ligando y los compuestos; y (b) identificar uno o más compuestos entre la pluralidad que se une específicamente al ligando.

5 Otro método descrito en la presente memoria incluye las etapas de a) poner en contacto un polipéptido sHASEGP o dominio Hialuronidasa del mismo con un sustrato del polipéptido sHASEGP y detectar la degradación del sustrato, con lo cual se evalúa la actividad del polipéptido sHASEGP; b) poner en contacto el polipéptido sHASEGP con un sustrato del polipéptido sHASEGP en presencia de una sustancia de ensayo, y detectar la degradación del sustrato, con lo cual se evalúa la actividad del polipéptido sHASEGP; y c) comparar la actividad del polipéptido sHASEGP evaluado en las etapas a) y b), con lo cual la actividad medida en la etapa a) que difiere de la actividad medida en la etapa b) indica que la sustancia de ensayo modula la actividad del polipéptido sHASEGP.

15 En otro ejemplo, se escruta una pluralidad de sustancias de ensayo de forma simultánea. En la comparación de la actividad de un polipéptido sHASEGP en presencia y ausencia de una sustancia de ensayo para evaluar si la sustancia de ensayo es un modulador del polipéptido sHASEGP, no es necesario someter a ensayo la actividad en paralelo, aunque dicha medición en paralelo es típica. Es posible medir la actividad del polipéptido sHASEGP en un punto temporal y comparar la actividad medida con un valor histórico de la actividad del polipéptido sHASEGP.

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

25 Los métodos para seleccionar sustratos para una sHASEGP concreta, se describen en los EJEMPLOS, y se ilustran los ensayos de hialuronidasa concretos.

30 Se describen combinaciones y kits que contienen las combinaciones que incluyen opcionalmente instrucciones para realizar los ensayos. Las combinaciones incluyen un polipéptido sHASEGP y un sustrato del polipéptido sHASEGP que se va a someter a ensayo; y, opcionalmente, reactivos para detectar la proteólisis del sustrato. Los sustratos, que pueden ser moléculas cromogénicas o fluorogénicas, incluyendo glicosaminoglicanos, sujetos a la proteólisis por un polipéptido sHASEGP concreto, pueden identificarse empíricamente sometiéndolo a ensayo la capacidad del polipéptido sHASEGP para escindir el sustrato de ensayo. Se identifican los sustratos que se escinden con mayor eficacia, es decir, a las concentraciones más bajas y/o velocidad más rápida o en condiciones deseables).

35 Adicionalmente se describe en la presente memoria un kit que contiene la combinación descrita anteriormente. El kit incluye opcionalmente instrucciones para identificar un modulador de la actividad de un polipéptido sHASEGP. Cualquier polipéptido sHASEGP se contempla como diana para identificar moduladores de su actividad.

40 2. Ensayos de unión. También se describen en la presente memoria métodos para la identificación y aislamiento de agentes, particularmente compuestos que se unen a sHASEGP. Los ensayos están diseñados para identificar agentes que se unen al dominio Hialuronidasa aislado (o una proteína, distinta de un polipéptido sHASEGP, que contiene el dominio Hialuronidasa de un polipéptido sHASEGP), y a la forma activada, incluyendo la forma activada derivada del zimógeno completo o de un dominio Hialuronidasa extendido. Los compuestos identificados son candidatos o cabezas de serie para la identificación de compuestos para tratamientos de trastornos y enfermedades que implican actividad Hialuronidasa aberrante. Los polipéptidos sHASEGP utilizados en los métodos incluyen cualquier polipéptido sHASEGP como se define en la presente memoria, incluyendo el dominio Hialuronidasa de cadena sencilla sHASEGP o una porción proteolíticamente activa del mismo.

50 En la presente memoria se describe una variedad de métodos. Estos métodos se pueden realizar en solución o en reacciones en fase sólida en las que el polipéptido o los polipéptidos sHASEGP o dominio o dominios Hialuronidasa de los mismos están unidos, ya sea directamente o indirectamente a través de un conector, a un soporte sólido. Los ensayos de escrutinio se describen en los Ejemplos, y estos ensayos se han utilizado para identificar compuestos candidatos.

55 Para los propósitos de la presente memoria, se proporcionan todos los ensayos de unión descritos anteriormente para sHASEGP.

60 Los métodos para identificar un agente, tal como un compuesto, que se une específicamente a un dominio Hialuronidasa de cadena sencilla de sHASEGP, una sHASEGP activada completa o uno de sus dominios Hialuronidasa de dos cadenas se describen en la presente memoria. El método se puede llevar a la práctica (a) poniendo en contacto la sHASEGP con uno o una pluralidad de agentes de ensayo en condiciones que conducen a la unión entre la sHASEGP y un agente; y (b) identificando uno o más agentes dentro de la pluralidad que se une específicamente a la sHASEGP.

Por ejemplo, en la práctica de dichos métodos el polipéptido sHASEGP se mezcla con un compañero de unión

potencial o un extracto o fracción de una célula en condiciones que permitan la asociación de compañeros de unión potenciales con el polipéptido. Después de mezclar, los péptidos, polipéptidos, proteínas u otras moléculas que se han asociado con una sHASEGP se separan de la mezcla. El compañero de unión que une a la sHASEGP puede ser retirado a continuación y analizado adicionalmente. Para identificar y aislar un compañero de unión, se puede utilizar la proteína completa, por ejemplo la proteína descrita completa del SEQ ID NO: 1. Alternativamente, se puede utilizar un fragmento de la proteína.

Se puede utilizar una variedad de métodos para obtener extractos celulares o fluidos corporales, tales como sangre, suero, orina, sudor, líquido sinovial, CSF y otros de tales fluidos.

Por ejemplo, las células pueden romperse utilizando ya sea métodos de ruptura físicos o químicos. Los ejemplos de los métodos de ruptura físicos incluyen, pero no se limitan a, sonicación y cizallamiento mecánico. Los ejemplos de los métodos de lisis química incluyen, pero no se limitan a, lisis con detergente y lisis enzimática. Un experto puede adaptar fácilmente métodos para preparar extractos celulares con el fin de obtener extractos para su uso en los presentes métodos.

Una vez que se prepara un extracto de una célula, el extracto se mezcla con la sHASEGP en condiciones en que puede ocurrir la asociación de la proteína con el compañero de unión. Se puede utilizar una variedad de condiciones, incluyendo las condiciones que se asemejan a las condiciones encontradas en el citoplasma de una célula humana o en un fluido corporal, tal como la sangre. Características tales como el pH, la osmolaridad, la temperatura, y la concentración del extracto celular utilizado, pueden variarse para optimizar la asociación de la proteína con el compañero de unión. Del mismo modo, son conocidos los métodos para el aislamiento de moléculas de interés a partir de fluidos del organismo.

Después de mezclar en condiciones apropiadas, el complejo unido se separa de la mezcla. Se puede utilizar una variedad de técnicas para separar la mezcla. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para una sHASEGP se pueden utilizar para inmunoprecipitar el complejo del compañero de unión. Alternativamente, se pueden utilizar técnicas de separación química convencionales tales como la cromatografía y la centrifugación de densidad/sedimento.

Después de la eliminación de los constituyentes celulares no asociados en el extracto, el compañero de unión puede disociarse del complejo utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, la disociación se puede llevar a cabo mediante la alteración de la concentración de sal o el pH de la mezcla.

Para ayudar a la separación de pares de compañeros de unión asociados del extracto mixto, la sHASEGP se puede inmovilizar sobre un soporte sólido. Por ejemplo, la proteína se puede unir a una matriz de nitrocelulosa o cuentas acrílicas. La unión de la proteína o un fragmento de la misma a un soporte sólido ayuda a la separación de péptido/pares de compañeros de unión de otros componentes que se encuentran en el extracto. Los compañeros de unión identificados pueden ser una sola proteína o un complejo formado por dos o más proteínas.

Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico que codifican las Hialuronidasas de cadena sencilla se pueden utilizar en un sistema de dos híbridos de levadura. El sistema de dos híbridos de levadura se ha utilizado para identificar otros pares de compañeros de proteínas y se puede adaptar fácilmente para emplear las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria.

Otro ensayo de unión in vitro, particularmente para una sHASEGP, utiliza una mezcla de un polipéptido que contiene al menos el dominio catalítico de una de estas proteínas y una o más dianas o sustratos de unión candidato. Después de incubar la mezcla en condiciones apropiadas, se evalúa la capacidad de la sHASEGP o un fragmento de polipéptido de la misma que contiene el dominio catalítico para unirse o interactuar con el sustrato candidato. Para ensayos de unión sin células, uno de los componentes incluye o se acopla a un marcador detectable. La marca puede proporcionar la detección directa, tal como radiactividad, luminiscencia, densidad óptica o electrónica, etc., o detección indirecta tal como una etiqueta epitópica, una enzima, etc. Se puede emplear una variedad de métodos para detectar el marcador dependiendo de la naturaleza del marcador y otros componentes del ensayo. Por ejemplo, la etiqueta puede detectarse unida al sustrato sólido o una porción del complejo unido que contiene la etiqueta se puede separar del sustrato sólido, y detectar la etiqueta después de eso.

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

Además, la sHASEGP secretada, tal como el dominio soluble de sHASEGP como se describe en SEQ ID NO: 4, puede estar implicada en la transducción de señales directamente por unión a o interacción con un receptor de la superficie celular o indirectamente por proteínas de activación, tales como pro-factores de crecimiento que pueden

iniciar la transducción de señales. Los ensayos para evaluar la transducción de señales son bien conocidos por los expertos en la técnica, y se pueden adaptar para su uso con el polipéptido sHASEGP.

Se describen ensayos para identificar agentes que afectan o alteran la transducción de señales mediada directa o indirectamente, por ejemplo a través de la activación de un pro-factor de crecimiento, por una sHASEGP, particularmente la longitud completa o una porción suficiente para anclar el dominio extracelular o una porción funcional del mismo de una sHASEGP en la superficie de una célula. Tales ensayos, incluyen, por ejemplo, ensayos basados en la transcripción en los que la modulación de una señal transducida se evalúa mediante la detección de un efecto sobre la expresión de un gen indicador (véase, p. ej. la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.436.128).

4. Métodos para identificar agentes que modulan la expresión de un ácido nucleico que codifica una sHASEGP. Otro ejemplo proporciona métodos para identificar agentes que modulan la expresión de un ácido nucleico que codifica una sHASEGP. Dichos ensayos utilizan cualquier medio disponible para controlar los cambios en el nivel de expresión de los ácidos nucleicos que codifican una sHASEGP.

Se pueden utilizar formatos de ensayo para controlar la capacidad del agente para modular la expresión de un ácido nucleico que codifica una sHASEGP. Por ejemplo, la expresión de ARNm se puede controlar directamente mediante hibridación con los ácidos nucleicos. También se pueden utilizar ensayos enzimáticos como los descritos para detectar agentes que modulan la expresión de sHASEGP.

Las líneas celulares se exponen al agente que se va a someter a ensayo en condiciones y tiempo apropiados y el ARN total o ARNm se aíslan por procedimientos convencionales (véase, p. ej. Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Las sondas para detectar diferencias en los niveles de expresión de ARN entre las células expuestas al agente y las células de control se pueden preparar a partir de los ácidos nucleicos. Es típico, pero no necesario, diseñar sondas que hibridan únicamente con ácidos nucleicos diana en condiciones de alta rigurosidad. Solo se forman híbridos de ácido nucleico altamente complementarios bajo condiciones de alta rigurosidad. Por consiguiente, la rigurosidad de las condiciones de ensayo determina la cantidad de complementariedad que debe existir entre dos cadenas de ácidos nucleicos con el fin de formar un híbrido. La rigurosidad debe seleccionarse para maximizar la diferencia de estabilidad entre la sonda:híbrido diana y la sonda potencial:híbridos no diana.

Por ejemplo, los fragmentos N- y C-terminales de la sHASEGP se pueden expresar en bacterias y utilizar para buscar proteínas que se unan a estos fragmentos. Las proteínas de fusión, tales como la fusión de etiqueta de His o GST para las regiones N- o C-terminales de la sHASEGP se pueden preparar para su uso como sustrato. Estas proteínas de fusión se pueden acoplar a, por ejemplo, cuentas de Glutación-Sefarosa y a continuación sondearse con productos lisados celulares o fluidos corporales. Antes de la lisis, las células o fluidos corporales se pueden tratar con un agente candidato que puede modular una sHASEGP o proteínas que interactúan con dominios sobre la misma. Las proteínas del producto lisado que se unen a las proteínas de fusión pueden ser resueltas mediante SDS-PAGE, aisladas e identificadas mediante secuenciación de proteínas o espectroscopía de masas, como se conoce en la técnica.

Se preparan sondas de anticuerpos inmunizando anfitriones mamíferos adecuados en protocolos de inmunización apropiados utilizando los péptidos, polipéptidos o proteínas si tienen suficiente longitud (p. ej., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más aminoácidos consecutivos del polipéptido sHASEGP o si se requiere mejorar la inmunogenicidad, conjugados a vehículos adecuados. Los métodos para preparar productos conjugados inmunogénicos con portadores, tales como albúmina de suero bovino (BSA), proteínas hemocianina de lapa californiana (KLH), u otro soporte son bien conocidos en la técnica. En algunas circunstancias, puede ser eficaz la conjugación directa utilizando, por ejemplo, reactivos de carbodiimida; en otros casos pueden ser deseables reactivos conectores tales como los suministrados por Pierce Chemical Co., Rockford, IL, para proporcionar accesibilidad al hapteno. Los péptidos hapténicos se pueden extender en cualquiera de los extremos amino o carboxi terminales con un residuo de Cys o intercalar con residuos de cisteína, por ejemplo, para facilitar la conexión a un portador.

La administración de los inmunógenos se realiza generalmente por medio de inyección durante un periodo de tiempo adecuado y con el uso de coadyuvantes adecuados, como se entiende generalmente en la técnica. Durante el programa de inmunización, se toman títulos de anticuerpos para determinar la adecuación de la formación de anticuerpos.

Los anticuerpos anti-péptido pueden generarse utilizando péptidos sintéticos correspondientes a, por ejemplo, los aminoácidos carboxi terminales de la sHASEGP.

Los péptidos sintéticos pueden ser tan pequeños como de 1-3 aminoácidos de longitud, generalmente al menos 4 o más residuos de aminoácidos de largo. Los péptidos pueden acoplarse a KLH utilizando métodos convencionales y pueden ser inmunizados en animales, tales como conejos o ungulados. Los anticuerpos policlonales se pueden

purificar a continuación, por ejemplo, utilizando cuentas de Actigel que contienen el péptido unido covalentemente.

Si bien el antisuero policlonal producido de esta forma puede ser satisfactorio para algunas aplicaciones, para las composiciones farmacéuticas, se emplean generalmente preparaciones monoclonales. Las líneas celulares inmortalizadas que secretan los anticuerpos monoclonales deseados se pueden preparar utilizando el método convencional de Kohler et al., (Nature 256: 495-7 (1975.)) o modificaciones que efectúan la inmortalización de linfocitos o células de bazo, como es generalmente conocido. Las líneas celulares inmortalizadas que secretan los anticuerpos deseados se escrutan mediante inmunoensayo en el que el antígeno es el hapteno peptídico, el polipéptido o la proteína.

Cuando se identifica el cultivo celular inmortalizado apropiado que secreta el anticuerpo deseado, las células pueden ser cultivadas in vitro o mediante producción in vivo mediante líquido ascítico. De particular interés, son los anticuerpos monoclonales que reconocen el dominio catalítico o sitio de escisión para la activación (región) de una sHASEGP.

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

Los agentes que se someten a ensayo en el método anterior pueden ser seleccionados aleatoriamente o seleccionados o diseñados racionalmente.

Los agentes pueden ser, como ejemplos, péptidos, moléculas pequeñas y carbohidratos. Un experto en la técnica puede reconocer fácilmente que no existe límite en cuanto a la naturaleza estructural de los agentes.

Los agentes peptídicos se pueden preparar utilizando métodos de síntesis de péptidos en fase sólida (o en fase de solución) convencionales, como es conocido en la técnica. Además, el ADN que codifica estos péptidos se puede sintetizar utilizando instrumentación comercialmente disponible de síntesis de oligonucleótidos y producir de forma recombinante utilizando sistemas de producción recombinantes convencionales. La producción utilizando síntesis de péptidos en fase sólida se hace necesaria si se van a incluir aminoácidos no codificados por genes.

I. Métodos de tratamiento

Las sHASEGP identificadas por medio de los métodos de la presente memoria se utilizan para tratar o prevenir acumulaciones anormales de sustratos de sHASEGP en un animal, particularmente un mamífero, incluyendo un ser humano. En un ejemplo, el método incluye administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una glicoproteína sHASEGP, por medio de lo cual se trata o previene la enfermedad o trastorno.

En otro ejemplo, se puede utilizar un inhibidor de la sHASEGP en el tratamiento de una cantidad excesiva de actividad hialuronidasa a pH neutro. El mamífero tratado puede ser un ser humano. Los inhibidores proporcionados en la presente memoria son los identificados por los ensayos de selección. Además, se contemplan anticuerpos y ácidos nucleicos antisentido o ARN de doble hebra (ARNdh), tal como ARNi.

1. Tratamiento antisentido: En un ejemplo específico, como se ha descrito anteriormente en esta memoria, la función del polipéptido sHASEGP es reducida o inhibida por los ácidos nucleicos antisentido de los polipéptido sHASEGP, para tratar o prevenir la actividad condroitinasa excesiva. Se describe el uso terapéutico o profiláctico de ácidos nucleicos de al menos seis nucleótidos, generalmente hasta aproximadamente 150 nucleótidos, que son antisentido para un gen o ADNc que codifica el polipéptido sHASEGP o una porción del mismo. Un ácido nucleico "antisentido" del polipéptido sHASEGP, según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un ácido nucleico capaz de hibridar con una porción de un ARN de polipéptido sHASEGP (generalmente ARNm) en virtud de alguna complementariedad de secuencia y generalmente en condiciones de alta rigurosidad. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una región codificante y/o no codificante de un ARNm de polipéptido sHASEGP. Tales ácidos nucleicos antisentido tienen utilidad como agentes terapéuticos que reducen o inhiben la función del polipéptido sHASEGP y se pueden utilizar en el tratamiento o prevención de trastornos como se ha descrito anteriormente.

Los ácidos nucleicos antisentido del polipéptido sHASEGP tienen al menos seis nucleótidos y generalmente son oligonucleótidos (que oscilan de 6 a aproximadamente 150 nucleótidos, incluyendo de 6 a 50 nucleótidos). La molécula antisentido puede ser complementaria a todo o una porción del dominio Hialuronidasa. Por ejemplo, el oligonucleótido tiene al menos 10 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, preferiblemente al menos 20, 40, 80 a al menos 100 nucleótidos, o al menos 125 nucleótidos. Los oligonucleótidos pueden ser ADN o ARN o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de hebra sencilla o de doble hebra. El oligonucleótido puede modificarse en el radical de la base, el radical azúcar, o esqueleto de fosfato. El oligonucleótido puede incluir otros grupos anexos tales como péptidos, o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553-6556 (1989); Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 648-652 (1987); Publicación PCT Núm. WO 88/09810, publicada el 15

de diciembre 1988), o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publicación PCT Núm. WO 89/10134, publicada el 25 de abril 1988), agentes de escisión desencadenada por hibridación (véase, por ejemplo, Krol et al., *Biotechniques* 6: 958-976 (1988)) o agentes intercalantes (véase, p. ej., *Zon. Pharm. Res.* 5: 539-549 (1988)).

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

10 El oligonucleótido antisentido de polipéptido sHASEGP puede incluir al menos un radical de la base modificado que se selecciona entre el grupo que incluye, pero no se limita a 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 15 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5-apos-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-n-2-carboxipropil)uracilo, (ACP3) w, y 2,6-diaminopurina.

20 En otro ejemplo, el oligonucleótido incluye al menos un radical azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye pero no se limita a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y hexosa. El oligonucleótido puede incluir al menos un esqueleto modificado de fosfato seleccionado de un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un alquilfosfotriéster y un formacetal o análogo del mismo.

25 El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido a-anomérico. Un oligonucleótido a-anomérico forma híbridos de doble hebra específicos con ARN complementario en el que las cadenas corren paralelas entre sí (Gautier et al., *Nucl. Acids. Res.* 15: 6625-6641 (1987)).

30 El oligonucleótido se puede conjugar con otra molécula, tal como, pero no limitada a, un péptido; agente de entrecruzamiento activado por hibridación, agente de transporte o un agente de escisión activado por hibridación. Los oligonucleótidos pueden ser sintetizados por medio de métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tal como los que están disponibles comercialmente de Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, los oligonucleótidos de fosforotioato 35 pueden ser sintetizados mediante el método de Stein et al., *Nucl. Acids Res.* 16: 3209 (1988)), los oligonucleótidos de metilfosfonato se pueden preparar mediante uso de soportes de polímero de vidrio de poro controlado (Sarin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7448-7451 (1988)), etc. En una ejemplo específico, el oligonucleótido antisentido de polipéptido sHASEGP incluye ARN catalítico o una ribozima (véase, por ejemplo, Publicación Internacional PCT WO 90/11364, publicada el 4 de Octubre de 1990; Sarver et al., *Science* 247: 1222-25 (1990)). En otro ejemplo, el oligonucleótido es un 2'-O-metil-ribonucleótido (Inoue et al., *Nucl. Acids. Res.* 15: 6131-6148 (1987)), o un análogo de ARN-ADN quimérico Inoue et al., *FEBS Lett.* 215: 327-330 (1987)).

40 Alternativamente, el oligonucleótido puede ser ARN de doble hebra (ARNdh), tal como ARNi.

45 En un ejemplo alternativo, el ácido nucleico antisentido del polipéptido sHASEGP se produce intracelularmente mediante la transcripción de una secuencia exógena.

50 Por ejemplo, un vector puede introducirse in vivo de manera que es absorbido por una célula, dentro de cuya célula el vector o una porción del mismo se transcribe, produciendo un ácido nucleico antisentido (ARN). Tal vector contendría una secuencia que codifica el ácido nucleico antisentido del polipéptido sHASEGP. Tal vector puede permanecer episomal o llegar a ser integrado cromosómicamente, siempre y cuando se puede transcribir para producir el ARN antisentido deseado. Tales vectores se pueden construir mediante métodos de tecnología de ADN recombinante convencionales en la técnica. Los vectores pueden ser plasmídicos, virales, u otros conocidos en la técnica, utilizados para su replicación y expresión en células de mamífero. La expresión de la secuencia que codifica el ARN antisentido del polipéptido sHASEGP puede ser mediante cualquier promotor conocido en la técnica para actuar en células de mamífero, incluyendo humanas. Tales promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Tales promotores incluyen, pero no se limitan a: la región del promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, *Nature* 290: 304-310 (1981), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., *Cell* 22: 787-797 (1980), el promotor de timidina quinasa del herpes (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1441-1445 (1981), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster et al., *Nature* 296: 39-42 (1982), etc.

60 Los ácidos nucleicos antisentido incluyen una secuencia complementaria a al menos una porción de un transcrito de

ARN de un gen del polipéptido sHASEGP, incluyendo un gen del polipéptido sHASEGP humano. No se requiere complementariedad absoluta. La cantidad de ácido nucleico antisentido del polipéptido sHASEGP que es eficaz en el tratamiento o la prevención de la enfermedad neoplásica depende de la naturaleza de la enfermedad, y puede determinarse empíricamente mediante técnicas clínicas convencionales.

5 Cuando sea posible, es deseable determinar la citotoxicidad antisentido en células *in vitro*, y a continuación en sistemas de modelos animales útiles antes del ensayo y uso en humanos.

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

20 Los constructos que expresan ARN de doble hebra (ARNdh) se introducen en un anfitrión, tal como un animal o planta que utiliza un vector replicable que permanece en forma episómica o se integra en el genoma. Mediante la selección de secuencias apropiadas, la expresión del ARNdh puede interferir con la acumulación de ARNm endógeno que codifica una sHASEGP. También se puede utilizar RNAi para inhibir la expresión *in vitro*.

25 Se utilizan regiones que incluyen al menos aproximadamente 21 (ó 21) nucleótidos que son selectivos (es decir únicos) para sHASEGP para preparar el ARNi. Los fragmentos más pequeños de aproximadamente 21 nucleótidos pueden transformarse directamente (es decir, *in vitro* o *in vivo*) en células; se introducen generalmente moléculas de ARNdh de RNAi más grandes utilizando vectores que las codifican. Las moléculas de ARNdh tienen al menos aproximadamente 21 pb de longitud o más, tal como 50, 100, 150, 200 y más. Los métodos, reactivos y protocolos para introducir moléculas de ácido nucleico en células *in vitro* e *in vivo* son conocidos por los expertos en la técnica.

30 3. Terapia Génica. En un ejemplo, los ácidos nucleicos que incluyen una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido sHASEGP o dominios funcionales o derivado del mismo, se administran para promover la función del polipéptido sHASEGP, a modo de terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada por medio de la administración de un ácido nucleico a un sujeto. En este ejemplo, el ácido nucleico produce su proteína codificada que media un efecto terapéutico promoviendo la función del polipéptido sHASEGP. Se puede utilizar cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles en la técnica (véanse, Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12: 488-505 (1993); Wu and Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, An. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596 (1993); Mulligan, Science 260: 926-932 (1993); y Morgan y Anderson, An. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); TIBTECH 11 5: 155-215 (1993). Por ejemplo, una composición terapéutica para terapia génica incluye un ácido nucleico que codifica el polipéptido sHASEGP que es parte de un vector de expresión que expresa un polipéptido sHASEGP o dominio, fragmento o proteína quimérica del mismo en un anfitrión adecuado. En particular, un ácido nucleico tiene un promotor conectado operablemente a la región codificante del polipéptido sHASEGP, siendo el promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejido. En otro ejemplo concreto, se utiliza una molécula de ácido nucleico en la que la secuencias codificantes del polipéptido sHASEGP y otras secuencias deseadas cualesquiera están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando de este modo la expresión intracromosómica del ácido nucleico de la proteína sHASEGP (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342: 435-438 (1989)).

50 El suministro del ácido nucleico a un paciente puede ser directo, en cuyo caso el paciente se expone directamente al ácido nucleico o vector portador de ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso, las células se transforman primero con el ácido nucleico *in vitro*, a continuación se trasplantan al paciente. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

55 En un ejemplo específico, el ácido nucleico se administra directamente *in vivo*, donde se expresa para producir el producto codificado. Esto se puede lograr por medio de cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se convierta en intracelular, por ejemplo, por medio de infección utilizando un viral retroviral defectuoso o atenuado u otro vector viral (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.980.286), o mediante inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (p. ej., una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o mediante la administración del mismo ligado a un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrándolo ligado a un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptor (véase,

por ejemplo, Wu y Wu, *J. Biol Chem.*, 262: 4429-4432 (1987)) (que puede ser utilizado para dirigirse a tipos celulares que expresan específicamente los receptores), etc. En otro ejemplo, se puede formar un complejo de ácido nucleico-ligando en el que el ligando es un péptido viral fusogénico para romper endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. En otro ejemplo más, el ácido nucleico puede dirigirse in vivo para la captación y expresión específica de células, eligiendo como diana un receptor específico (véase, por ejemplo, Publicaciones PCT WO 92/06180 con fecha de 16 de Abril, 1992 (Wu et al.); WO 92/22635 con fecha de 23 de Diciembre de 1992 (Wilson et al.); WO 92/20316 con fecha de 26 de Noviembre de 1992 (Findeis et al.); WO 93/14188 con fecha de 22 de Julio de 1993 (Clarke et al.), WO 93/20221 con fecha de 14 de Octubre, 1993 (Young)). Alternativamente, el ácido nucleico puede ser introducido intracelularmente e incorporado dentro del ADN de la célula anfitriona para la expresión, mediante recombinación homóloga (Koller y Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932-8935 (1989); Zijistra et al., *Nature* 342: 435-438 (1989)).

En un ejemplo específico, se utiliza un vector viral que contiene el ácido nucleico del polipéptido sHASEGP. Por ejemplo, se puede utilizar un vector retroviral (véase Miller et al., *Meth. Enzymol.* 217: 581-599 (1993)). Estos vectores retrovirales se han modificado para eliminar las secuencias retrovirales que no son necesarias para el empaquetamiento del genoma viral y la integración en el ADN de la célula anfitriona. El ácido nucleico del polipéptido sHASEGP que se va a utilizar en la terapia génica se clona en el vector, lo que facilita el suministro del gen en un paciente. Más detalles acerca de los vectores retrovirales se puede encontrar en Boesen et al., *Biotherapy* 6: 291-302 (1994), que describe el uso de un vector retroviral para suministrar el gen *mdr1* a las células madre hematopoyéticas con el fin de hacer las células madre más resistentes a la quimioterapia.

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

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

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

Otro enfoque para la terapia génica implica transferir un gen a las células en cultivo de tejido por medio de métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio, o infección viral. Por lo general, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células se colocan a continuación bajo selección para aislar aquellas células que han absorbido y están expresando el gen transferido. Esas células se suministran a un paciente.

En este ejemplo, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración in vivo de la célula recombinante resultante. Tal introducción se puede llevar a cabo por medio de cualquier método conocido en la técnica, incluyendo pero no limitado a transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago que contiene las secuencias de ácidos nucleicos, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen numerosos mecanismos en la técnica para la introducción de genes foráneos en células (véanse, por ejemplo, Loeffler y Behr, *Meth Enzymol.* 217: 599-618 (1993); Cohen et al., *Meth. Enzymol.* 217: 618-644 (1993); Cline, *Pharmac Ther* 29: 69-92 (1985)) y se pueden utilizar, siempre que no se interrumpan las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico sea expresable por la célula y generalmente heredable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes se pueden suministrar a un paciente por medio de varios métodos conocidos en la técnica. En un ejemplo, las células epiteliales se inyectan, p. ej., por vía subcutánea. En otro ejemplo, se pueden aplicar células de la piel recombinantes en forma de un injerto de piel sobre el paciente. Se pueden administrar por vía intravenosa células sanguíneas recombinantes (p. ej., células madre hematopoyéticas o progenitoras). La cantidad de células prevista para su uso depende del efecto deseado, el estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la técnica.

Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico con fines de terapia génica abarcan cualquier tipo de

célula disponible, deseada e incluyen pero no se limitan a células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, p. ej., tales como células madre obtenidas de la médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal y otras fuentes de las mismas.

Por ejemplo, una célula utilizada para terapia génica es autóloga para el paciente. En un ejemplo en el que se utilizan células recombinantes en terapia génica, un ácido nucleico de polipéptido sHASEGP se introduce en las células de manera que es expresable por las células o su progenie, y las células recombinantes se administran a continuación in vivo para su efecto terapéutico. En un ejemplo específico, se utilizan células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que pueda ser aislada y mantenida in vitro pueden ser potencialmente utilizadas de acuerdo con este ejemplo.

Tales células madre incluyen pero no se limitan a las células madre hematopoyéticas (HSC), células madre de tejidos epiteliales tales como la piel y el revestimiento del intestino, células musculares cardíacas embrionarias no humanas, células madre del hígado (Publicación PCT WO 94/08598, con fecha 28 de Abril de 1994), y células madre neurales (Stemple y Anderson, Cell 71: 973-985 (1992)).

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

Con respecto a las células madre hematopoyéticas (HSC), se puede utilizar en esta realización cualquier técnica que proporcione el aislamiento, propagación y mantenimiento in vitro de las HSC. Las técnicas mediante las cuales se puede lograr esto incluyen (a) el aislamiento y establecimiento de cultivos de HSC a partir de células de médula ósea aisladas del futuro anfitrión, o de un donante, o (b) el uso de cultivos de HSC a largo plazo previamente establecidos, que pueden ser alérgicos o xenogénicos.

Las HSC no autólogas generalmente se utilizan con un método para suprimir las reacciones de trasplante inmunitarias del futuro anfitrión/paciente. En una realización concreta, las células de médula ósea humana se pueden obtener de la cresta ilíaca posterior por aspiración con aguja (véase, p. ej., Dodo et al., J. Clin. Invest. 73: 1377-1384 (1984)). Por ejemplo, las HSC se pueden elaborar en forma altamente enriquecida o sustancialmente pura. Este enriquecimiento se puede llevar a cabo antes, durante, o después del cultivo a largo plazo, y se puede realizar por medio de cualquier mecanismo conocido en la técnica. Los cultivos a largo plazo de células de la médula ósea pueden establecerse y mantenerse mediante el uso de, por ejemplo, las técnicas de cultivo de células de Dexter modificadas (Dexter et al., J. Cell Physiol. 91: 335 (1977)) o técnicas de cultivo de Witlock-Witte (Witlock y Witte, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3608-3612 (1982)).

En un ejemplo específico, el ácido nucleico que se introducirá para los fines de la terapia génica incluye un promotor inducible unido operativamente a la región codificante, de tal manera que la expresión del ácido nucleico es controlable controlando la presencia o ausencia del inductor apropiado de la transcripción.

3. Profármacos - Se describe un método para tratar tumores. El método se pone en práctica mediante la administración de un profármaco que es escindido en un sitio específico por una HASEGP para liberar un fármaco activo o un precursor que se puede convertir en el fármaco activo in vivo. Tras el contacto con una célula que expresa actividad de sHASEGP, el profármaco se convierte en un fármaco activo. El profármaco puede ser un producto conjugado que contiene el agente activo, tal como un fármaco antitumoral, tal como un agente citotóxico u otro agente terapéutico (TA), conectado a un sustrato para la sHASEGP diana, de manera que el fármaco o agente es inactivo o incapaz de entrar en una célula, en el producto conjugado, pero se activa tras la escisión. El profármaco, por ejemplo, puede contener una molécula de sulfato de condroitina, típicamente una relativamente corta, menos de aproximadamente 20 unidades de disacárido, que es catalíticamente escindida por la sHASEGP diana. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, agentes antiproliferativos, agentes de unión a tubulina y agentes alquilantes. Otros incluyen, fármacos de vinca, mitomicinas, bleomicinas y taxanos.

J. Composiciones farmacéuticas y modos de administración

1. Componentes de las composiciones. Las composiciones farmacéuticas que contienen una sHASEGP activa se proporcionan en la presente memoria. También se describen combinaciones de compuestos que modulan la

actividad de un polipéptido sHASEGP y otro tratamiento o compuesto para el tratamiento de un trastorno de hialuronidasa, tal como un compuesto de anticuerpo.

El polipéptido sHASEGP y un segundo agente pueden envasarse como composiciones separadas para la administración conjunta o secuencialmente o intermitentemente. Alternativamente, pueden proporcionarse como una sola composición para su administración o como dos composiciones para su administración en forma de una sola composición. Las combinaciones pueden envasarse en forma de kits.

3. Formulaciones y Vía de Administración

Los polipéptidos sHASEGP y el dominio hialuronidasa humano soluble de los mismos descritos en la presente memoria pueden formularse como composiciones farmacéuticas, típicamente para administración de dosificación única. Las concentraciones de los polipéptidos en las formulaciones son eficaces para el suministro de una cantidad, tras la administración, que es eficaz para el tratamiento pretendido. Típicamente, las composiciones se formulan para la administración de dosificación única. Para formular una composición, la fracción en peso de un polipéptido sHASEGP, los dominios hialuronidasa humanos solubles de los mismos o una mezcla de los mismos se disuelven, suspenden, dispersan o mezclan de otro modo en un vehículo seleccionado a una concentración eficaz tal que la afección tratada se alivia o mejora.

Los portadores o vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de la sHASEGP o dominios hialuronidasa humanos solubles de los mismos descritos en la presente memoria incluyen cualquiera de dichos portadores conocidos por los expertos en la técnica por ser adecuados para el modo particular de administración.

Además, los polipéptidos pueden formularse como el único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o pueden ser combinados con otros ingredientes activos. Las suspensiones liposomales, incluyendo liposomas dirigidos a tejidos, también pueden ser adecuados como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar formulaciones de liposomas como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.522.811.

La sHASEGP activa o dominio hialuronidasa humano soluble de la misma se incluye en el portador farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios indeseables sobre el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz puede ser determinada empíricamente sometiendo a ensayo los polipéptidos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos tal como mediante el uso de los ensayos descritos en la presente memoria o véase, *p. ej.*, Taliani et al. (1996) Anal. Biochem. 240: 60-67, Filocamo et al. (1997) J. Virology 71: 1417-27, Sudo et al. (1996) Antiviral Res. 32: 9-18, Buffard et al. (1995) Virology 209: 52-59, Bianchi et al. (1996) Anal. Biochem. 237: 239-244, Hamatake et al. (1996) Intervirology 39: 249-258, Steinkthler et al. (1998) Biochem. 37: 8899-8905, D'Souza et al. (1995) J. Gen. Virol. 76: 1.729-1736, Takeshita et al. (1997) Anal. Biochem. 247: 242-246; véase también, *p. ej.*, Shimizu et al. (1994) J. Virol. 68: 8406-8408; Mizutani et al. (1996) J. Virol. 70: 7219-7223, Mizutani et al. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 227: 822-826, Lu et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 93: 1412-1417, Hahm et al. (1996) Virology 226: 318-326, Ito et al. (1996) J. Gen. Virol. 77: 1043-1054, Mizutani et al. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 212: 906-911, Cho et al. (1997) J. Virol. Meth. 65: 201-207 y a continuación extrapolada de los mismos para determinar las dosificaciones para los seres humanos.

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

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

También se contemplan dosis de concentraciones altas para el suministro de pequeños volúmenes de sHASEGP. La administración de 10-100 μ l de sHASEGP de 5000 Unidades/mL se contempla para inyección en la cámara anterior para disolver sustancias viscoelásticas previamente administradas durante cirugías de cataratas y de implantación de lentes intraoculares fáquicas. También se contemplan inyecciones de pequeño volumen de dosis de 50-200 U/mL para procedimientos intravítreos tales como el tratamiento de la hemorragia vítrea o el desprendimiento vítreo-retinal en la retinopatía diabética.

Se contemplan inyecciones de volúmenes algo más grandes (*p. ej.*, entre aproximadamente uno a varios mL, o más)

para espacios algo más grandes y/o más fácilmente drenados dentro del organismo. Por ejemplo, como se ilustra en la presente memoria, se pueden elaborar inyecciones periorbitarias de uno a varios mL o más en uno o más espacios que rodean el ojo, p. ej., mediante inyección en el espacio sub-Tenon o episcleral, con el fin de promover el suministro transescleral de agentes farmacológicos a los tejidos en la parte posterior del ojo, tal como el plexo coroideo y/o la retina. Como apreciarán los expertos en la técnica, algunos espacios dentro del organismo pueden acomodar fácilmente grandes volúmenes. A modo de ilustración, el espacio epiescleral o sub-Tenon de alrededor del ojo puede acomodar fácilmente de uno a varios mL o incluso volúmenes más grandes (p. ej., hasta o más de 5 a 10 mL, dependiendo por ejemplo de las características del tejido concreto y la velocidad a la que se suministra el volumen).

Además, como se ha descrito e ilustrado en la presente memoria, parece ser que la introducción de una sHASEGP (potencialmente combinada con uno o más agentes farmacológicos o de otro tipo adicionales) en un volumen más grande se puede utilizar para impulsar aún más el suministro de agentes a sitios diana deseados dentro del organismo. Sin estar limitado a un mecanismo de acción concreto, se cree que tales inyecciones de volumen más grandes pueden impulsar más adicionalmente la penetración o la propagación de tanto de la sHASEGP, como del otro u otros agentes presentes en el tejido tratado por medio de un procedimiento de transporte convectivo que es promovido por un aumento del diferencial de presión. Una vez más, sin pretender limitarse a un mecanismo de acción concreto, se cree que se puede llevar a cabo un aumento de tal diferencial de presión en el contexto de la presente invención mediante, entre otras cosas, uno o ambos de los siguientes: (i) una presión de impulsión elevada o "carga de presión" elevada (p. ej., causadas por el aumento de la presión hidrostática asociada a una inyección que llena gran parte o sobrellena algo o distiende un espacio o lugar de la inyección); y (ii) una presión reducida aguas abajo o "impedancia" reducida (p. ej., causadas por la apertura de canales en la matriz intersticial asociada con la actividad hialuronidasa localizada y la consiguiente degradación de hialuronano relativamente hidratado). Las hialuronidasas preferidas para uso en esta y otras aplicaciones de la presente invención (tales como facilitación del suministro de agentes farmacológicos y de otro tipo) son las sHASEGP, particularmente sHASEGP humanas en el contexto del suministro de agentes para uno o más tejidos en el organismo humano. Sin embargo, estos y otros enfoques para el uso y aplicación de hialuronidasas también puede aplicarse utilizando sHASEGP no humanas, tales como sHASEGP de mamíferos, así como otras hialuronidasas humanas o de mamíferos, preferiblemente formas solubles de tales hialuronidasas.

El ingrediente activo puede administrarse de una vez, o puede dividirse en varias dosis más pequeñas para ser administradas a intervalos de tiempo. Se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento está en función de la enfermedad que se está tratando y pueden determinarse empíricamente utilizando protocolos de ensayo conocidos o mediante extrapolación a partir de datos de ensayo in vivo o in vitro. Cabe señalar que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección que se vaya a aliviar. Se debe entender adicionalmente que para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración establecidos en la presente memoria son únicamente ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance o uso de las composiciones y combinaciones reivindicadas que las contienen.

Los derivados farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos, sales, ésteres, hidratos, solvatos y formas de profármacos. El derivado se selecciona típicamente de tal manera que sus propiedades farmacocinéticas son superiores a las de la sHASEGP neutra correspondiente o dominio hialuronidasa humano soluble de la misma.

Por lo tanto, las concentraciones o cantidades de uno o más de los polipéptidos en la presente memoria o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se mezclan con un portador o vehículo farmacéutico adecuado para la administración sistémica, tópica o local eficaz para formar composiciones farmacéuticas. Los polipéptidos sHASEGP o dominios hialuronidasa humanos solubles de los mismos se incluyen en una cantidad eficaz para mejorar o tratar el trastorno para cuyo tratamiento se contempla. La concentración de polipéptido activo en la composición depende de las velocidades de absorción, inactivación, excreción del polipéptido activo, la pauta de dosificación, la cantidad administrada, la formulación concreta así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica.

Los agentes terapéuticos para su uso en los métodos se pueden administrar por medio de cualquier ruta conocida por los expertos en la técnica, tal como, pero no limitada a, tópica, intraarticular, intracisternal, intraocular, periorbital, intraventricular, intratecal, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intratraqueal, así como por medio de cualquier combinación de cualquiera de dos o más de las mismas. También se pueden contemplar formulaciones pulmonares en polvo seco.

La ruta más adecuada para la administración variará dependiendo del uso propuesto, tal como, por ejemplo, el uso como un agente de suministro para facilitar el suministro subcutáneo de líquidos, el uso para reducir la presión intraocular en los ojos de pacientes con glaucoma que reciben productos viscoelásticos o el uso como un "agente de propagación" para mejorar la actividad de los agentes quimioterapéuticos, y la localización de interés, tal como un órgano interno concreto, un crecimiento del tumor, la cavidad intraocular y la epidermis. Los modos de

administración incluyen, pero no se limitan a, tópicamente, localmente, intraarticularmente, intracisternalmente, intraocularmente, peri-orbitalmente, intraventricularmente, intratecalmente, intravenosamente, intramuscularmente, intratraquealmente, intraperitonealmente, intradérmicamente, subcutáneamente, y mediante una combinación cualquiera de dos o .de más de los mismos. Por ejemplo, para el tratamiento de varios tipos de cáncer, tales como el

5 carcinoma de células escamosas, el cáncer de mama, el cáncer de vejiga urinaria y el cáncer gastrointestinal, la administración local, incluyendo la administración al sitio del crecimiento tumoral (p. ej., por vía intratecal, intraventricular o intracisternal) proporciona la ventaja que el agente terapéutico se puede administrar a una alta concentración sin riesgo de las complicaciones que pueden acompañar a la administración sistémica de un agente terapéutico

10 En cuanto a una clase ilustrativa de agentes farmacológicos que se puede combinar con las sHASEGP (u otras glicosaminoglicanasas) (p. ej., combinados mediante co-formulación con una o más sHASEGP o mediante co-administración con una o más sHASEGP (que se pueden administrar antes de, coincidente con o después de la administración del agente)), se han descrito en la técnica varios agentes que tienen efectividad o eficacia potencial

15 en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, y se están desarrollando regularmente agentes anti-cancerosos novedosos que también se pueden combinar con una o más sHASEGP (p. ej., proporcionadas mediante co-formulación o mediante co-administración antes de, coincidente con y/o después de la administración del agente) para mejorar la farmacocinética, la farmacodinámica u otras propiedades útiles del agente.

20 A modo de ilustración (y sin limitación) se han aprobado ahora varios agentes anti-cancerosos o quimioterapéuticos para el tratamiento de varios tipos de cáncer que se pueden combinar con las sHASEGP (u otras glicosaminoglicanasas) mediante co-formulación o co-administración (antes de, coincidente con o después de la administración del agente anti-canceroso). Tales agentes incluyen, por ejemplo, Aldesleuquinas (p. ej., PROLEUKIN™); Alemtuzumab (p. ej., CAMPATH™); Alitretinoínas (p. ej. PANRETIN™); Alopurinoles (p. ej. ZYLOPRIM™); Altretaminas (p. ej., HEXALEN™); Amifostinas (p. ej., ETHYOL™); Anastrozoles (p. ej. ARIMIDEX™); Trióxidos de Arsénico (p. ej. TRISENOX™); Asparraginasas (p. ej. ELSPAR™); BCG Viva (p. ej. BCG TICE™); Bexaroteno (p. ej. TARGRETIN™); Bleomicinas (p. ej. BLENOXANE™); Busulfán intravenoso (p. ej. BUSULFEX™); Busulfán oral (p. ej. MYLERAN™); Calusteronas (p. ej. METHOSARB™); Capecitabinas (p. ej. XELODA™); Carboplatinos (p. ej. PARAPLATIN™); Carmustinas (p. ej., BCNU™, BiCNU™); Carmustinas con Polifeprosanos (p. ej. Oblea de GLIADEL™); Celecoxibs (p. ej., CELEBREX™); Clorambucilos (p. ej. LEUKERAN™); Cisplatinos (p. ej. PLATINOL™); Cladribinas (p. ej. LEUSTATIN™, 2-CdA™); Ciclofosfamidias (p. ej. CYTOXAN™, NEOSAR™); Citarabinas (p. ej. CYTOSAR-U™); Citarabina Liposomal (p. ej. DepoCyt™); Dacarbazinas (p. ej. DTIC-Dome™); Dactinomicinas (p. ej. COSMEGEN™); Darbepoetina Alfa (p. ej. ARANESP™); Daunorrubicina Liposomal (p. ej. DANUOXOME™); Daunorrubicinas/Daunomicinas (p. ej., CERUBIDINE™); Denileuquina Diftitox (p. ej., ONTAK™); Dextrazoxanos (p. ej., ZINECARD™); Docetaxel (p. ej., TAXOTERE™); Doxorubicinas (p. ej., ADRIAMICINA™, RUBEX™); Doxorubicina Liposomal (p. ej. DOXTL™); Propionatos de dromostanolona (p. ej. DROMOSTANOLONA™ e Inyección de MASTERONE™); Soluciones B de Elliott (p. ej., Solución B de Elliott™); Epirubicinas (p. ej., ELLENCE™); Epoetina Alfa (p. ej. EPOGEN™); Estramustinas (p. ej., EMCYT™); Fosfatos de etopósido (p. ej., ETOPOPHOS™); Etopósido VP-16s (p. ej. VEPESID™); Exemestanos (p. ej., EXEMESTANO™); Filgrastim (p. ej. NEUPOGEN™); Floxuridinas (p. ej. FUDR™); Fludarabinas (p. ej. FLUDARA™); Fluorouracilos incl. 5-FU (p. ej. ADRUCIL™); Fulvestrant (p. ej. FASLODEX™); Gemcitabinas (p. ej. GEMZAR™); Gemtuzumab/Ozogamicinas (p. ej., MYLOTARG™); Acetatos de goserelina (p. ej. ZOLADEX™); Hidroxiureas (p. ej., HYDREA™); Ibritumomab/Tiuxetanos (p. ej., ZEVALIN™); Idarrubicinas (p. ej. IDAMICINA™); IfosfamidAs (p. ej. IFEX™); Mesilatos de imatinib (p. ej., GLEEVEC™); Interferón alfa-2aA (p. ej., ROFERON-A™); Interferón alfa-2b (p. ej. INTRON A™); Irinotecan (p. ej. CAMPTOSAR™); Letrozoles (p. ej. FEMARA™); LeucovorinAs (p. ej. WELLCOVORIN™, LEUCOVORIN™); Levamisoles (p. ej. ERGAMISOL™); Lomustinas/CCNU (p. ej. CeeBU™); Mecloretaminas/Mostazas nitrogenadas (p. ej. MUSTARGEN™); Acetatos de megestrol (p. ej. MEGACE™); Melfalán/L-PAM (p. ej. ALKERAN™); Mercaptopurina incl. 6-MP (p. ej. PURINETHOL™); Mesnas (p. ej., MESNEX™); Metotrexatos; Metoxsalenos (p. ej. UVADEX™); Mitomicina C (p. ej. MUTAMYCIN™, MITOZYTREX™); Mitotanos (p. ej. LYSODREN™); Mitoxantronas (p. ej. NOVANTRONE™); Fenpropionatos de nandrolona (p. ej. DURABOLIN-50™); Nofetumomab (p. ej. VERLUMA™); Oprelvequinas (p. ej. NEUMEGA™); Oxaliplatinos (p. ej., ELOXATIN™); Paclitaxeles (p. ej. PAXENE™, TAXOL™); Pamidronatos (p. ej. AREDIA™); Pegademasas (p. ej. ADAGEN™); Pegaspargasas (p. ej., ONCASPAR™); Pegfilgrastim (p. ej. NEULASTA™); Pentostatins (p. ej. NIPENT™); Pipobromanos (p. ej. VERCYTE™); Plicamicina/Mitramicinas (p. ej., MITHRACIN™); Porfímero Sódico (p. ej., PHOTOFRIN™); Procarbazinas (p. ej. MATULANE™); Quinacrinas (p. ej. ATABRINE™); Rasburicinas (p. ej. ELITEK™); Rituximab (p. ej. RITUXAN™); Sargamostim (p. ej. PROKINE™); Estreptozocinas (p. ej., ZANOSAR™); Talcos (p. ej. SCLEROSOL™); Tamoxifenos (p. ej. NOLVADEX™); Temozolomidas (p. ej., TEMODAR™); Tenipósidos/VM-26 (p. ej. VUMON™); Testolactonas (p. ej. TESLAC™); Tioguaninas incl. 6-TG; Tiotepas (p. ej. THIOPLEX™); Topotecanos (p. ej. Hycamtin™); Toremifenos (p. ej. FARESTON™); Tositumomab (p. ej., BEXXAR™); Trastuzumab (p. ej., HERCEPTIN™); Tretinoínas/ATRA (p. ej. VESANOID™); Mostazas de Uracilo; Valrubicinas (p. ej. VALSTAR™); Vinblastinas (p. ej., VELBAN™); Vincristinas (p. ej., ONCOVIN™); Vinorelbinas (p. ej. NAVELBINE™); Zoledronatos (p. ej. ZOMETA™); así como otros agentes descritos en la presente memoria y en la técnica.

60 Al igual que con otras clases de agentes farmacológicos descritos en la presente memoria, una sHASEGP (u otra

glicosaminoglicanasa) se puede utilizar junto con la administración de (o co-formulada con) un agente farmacológico individual (tal como un antineoplásico con fines ilustrativos, o con un miembro de otra clase de agentes como se describe en la presente memoria y/o conocido en la técnica). Alternativamente, una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) se puede utilizar junto con la administración de (o co-formulada con) más de un agente farmacológico de una clase dada (tales como múltiples agentes antineoplásicos con fines ilustrativos, o múltiples miembros de otra clases de agentes como se describe en la presente memoria y/o conocidos en la técnica). En el caso de las combinaciones con dos o más agentes de una clase dada, a menudo se prefiere que los dos o más agentes actúen por medio de dos o más mecanismos de acción diferentes. Una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) también se pueden utilizar junto con la administración de (o co-formulada con) un agente farmacológico de una primera clase dada (tal como un antineoplásico con fines ilustrativos, o un miembro de una de las otras clases de agentes como se describe en la presente memoria y/o conocido en la técnica), y uno o más agentes farmacológicos de una o más clases diferentes que son útiles para el tratamiento de cualquiera de una variedad de afecciones. Si bien ciertos principios son por lo tanto referidos aquí, en el caso de los agentes anticancerosos con fines ilustrativos, estos principios son también aplicables a, por ejemplo, agentes antiinfecciosos y los numerosos miembros de otras clases de agentes que se describen e ilustran en la presente memoria, así como agentes adicionales que ya se conocen en la técnica o recientemente desarrollados.

En el caso de cualquiera de las combinaciones y/o co-formulaciones descritas en la presente memoria (que comprenden al menos una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) y al menos otro agente (tal como un agente farmacológico, p. ej., un miembro de una de las clases de agentes ilustradas en la presente memoria)), se contempla también que tal combinación y/o co-formulación puede comprender adicionalmente uno o más agentes (tales como diversos estabilizadores, excipientes y similares) que no ejercen efectos farmacodinámicos sustanciales pero que promueven la utilidad de la combinación y/o co-formulación (p. ej., mediante la estabilización de uno o más de los componentes o de una formulación entera, ayudando a promover o dirigir la actividad de uno o más de los agentes o de la sHASEGP, y/o reduciendo la toxicidad o de otra manera mejorando el perfil de seguridad de la combinación o co-formulación.

Como apreciarán los expertos en la técnica, se están desarrollando regularmente nuevas versiones y formulaciones de estos y otros agentes anti-cancerosos (así como miembros de otras clases de agentes como se describe en la presente memoria) que se pueden combinar asimismo con las sHASEGP (u otras glicosaminoglicanasas). Además, puesto que tales enzimas se pueden utilizar para mejorar los perfiles farmacocinéticos y/o farmacodinámicos de una gran variedad de agentes, y permitir que los agentes sean suministrado por rutas diferentes (y potencialmente más específicas), por ejemplo, las sHASEGP (u otras glicosaminoglicanasas) pueden ser utilizadas para mejorar los perfiles de PK y/o PD de varios de los agentes que se considerado previamente que tienen perfiles sub-óptimos. Las pruebas de agentes en modelos animales apropiados con y sin sHASEGP concomitante se puede utilizar para evaluar la eficacia relativa y la toxicidad de los agentes concretos.

Como se ilustra y ejemplifica en la presente memoria, varios agentes de molécula grande (tales como los anticuerpos y otras proteínas, particularmente aquellos administrados por inyección parenteral no IV), presentan relativamente malos perfiles farmacocinéticos y puede ser particularmente reforzados por medio de la co-formulación o co-administración con sHASEGP (u otras glicosaminoglicanasas). Sin estar limitado a un mecanismo de acción concreto, en general se considera que los agentes de molécula pequeña que exhiben relativamente bajo carácter hidrófobo son más eficazmente dispersables mediante, p. ej., transporte convectivo dentro de los fluidos intersticiales puesto que puede ser promovido por las sHASEGP (u otras glicosaminoglicanasas). Un método comúnmente utilizado para la predicción de tales atributos es evaluar los coeficientes de reparto (k_{ow}) de octanol:agua calculados y/o estimados que han sido referidos para diversos compuestos. A este respecto, los agentes exhiben $\log K_{ow}$ de <3 , más preferiblemente <2 o <1 , más preferiblemente <0 , aún más preferiblemente $<(-1)$. Como apreciarán los expertos en la técnica, muchos agentes también se pueden modificar de forma covalente y/o no covalente para aumentar su carácter hidrófilo, y/o para incluir tales agentes dentro de vesículas o complejos macromoleculares para facilitar su penetración y/o suministro.

Con fines de ilustración adicional (y sin limitación), los agentes farmacológicos anti-cancerosos o quimioterapéuticos que se pueden combinar con las sHASEGP (u otras glicosaminoglicanasas) están incluidos en la lista siguiente (y otros son conocidos en la técnica): Acivicinas; Aclarrubicinas; Acodazoles; Acroninas; Adozelesinas; Aldesleuquinas; Alitrenoíinas (Ácidos 9-cis-retinoicos); Altretaminas; Alvocidib; Ambazonas; Ambomicinas; Ametantronas; Aminoglutetimidias; Amsacrinas; Anastrozoles; Anaxironas; Ancitabinas; Antramincinas; Apazicuonas; Argimesnas; Asparaginasas; Asperlinas; Atrimustinas; Azacitidinas; Azetepas; Azotomicinas; Banoxantronas; Batabulinas; Batimastat; Benaxibinas; Bendamustinas; Benzodepas; Bexarotenos; Bicalutamidas; Bietaserpinas; Biricodar; Bisantrenos; Bisantrenos; Dimesilatos de Bisnafida; Bizelesinas; Bleomicinas; Bortezomib; Brequinar; Bropiriminas; Budotitanos; Busulfanos; Cactinomicinas; Calusteronas; Canertinib; Capecitabinas; Caracemidas; Carbetímeros; Carboplatinos; Carbocuoanas; Carmofur; Carmustinas; Carrubicinas; Carzelesinas; Cedefingoles; Cemadotinas; Clorambucilos; Cioteronel; Cirolemicinas; Cisplatinos; Cladribinas; Clanfenur; Clofarabinas; Crisnatoles; Ciclofosfamidias; Citarabinas; Dacarbazinas; Dactinomicinas; Daunorrubicinas; Decitabinas; Dexniguldipinas; Dexormaplatinos; Deszaguaninas; Diazicuonas; Dibrospidium; Dienogest; Dinalinas; Disermolidas; Docetaxeles;

Dofequidar; Doxifluridinas; Doxorubicinas; Droloxifenos; Propionatos de Dromostanolona; Duazomicinas; Ecomustinas; Edatrexatos; Edotecarinas; Eflornitinas; Elacridar; Elinafidas; Elsamitrucinas; Emitefur; Enloplatinos; Enpromatos; Enzastaurinas; Epiropidinas; Epirubicinas; Eptalprost; Erbulozoles; Esorubicinas; Estramustinas; Etanidazoles; Etoglucid; Etopósidos; Etoprinas; Exisulind; Fadrozoles; Fazarabinas; Fenretinidas; Floxuridinas; Fludarabinas; Fluorouracilos; Fluoximesterona; Flurocitabinas; Fosquidonas; Fostriecinas; Fostriecinas; Fotretaminas; Galarubicinas; Galocitabinas; Gemcitabinas; Geroquinoles; Gimatecanos; Gimeracilos; Gloxazonas; Glufosfamidas; Hidroxiureas; Idarubicinas; Ifosfamidas; Ilmoquinas; Ilomastat; Imexon; Improsulfan; Indisulam; Inprocuonas; Interferonas; Interferón Alfa; Interferón Betas; Interferón Gamma; Interleuquina-2 y otras interleuquinas (incluyendo interleuquinas recombinantes); Intoplicinas; Iobenguanos [131-I]; Iproplatinos; Irinotecanos; Irsogladinas; Ixabepilonas; Cetotrexatos; L-Alanosinas; Lanreotidas; Lapatinib; Ledoxantronas; Letrozoles; Leuprolidas; Leuprorelinas (Leuprorelidas); Lexacalcitoles; Liarozoles; Lobaplatinos; Lometrexoles; Lomustinas; Lonafarnib; Losoxantronas; Lurtotecanos; Mafosfamidas; Manosulfán; Marimastat; Masoprocoles; Maitansinas; Mecloretaminas; Megestroles; Melengestroles; Melfalán; Menogarilos; Mepitiostanos; Mercaptopurinas; Metesind; Metotrexatos; Metomidatos; Metoprinas; Meturedapa; Miboplatinos; Miprosifenos; Misonidazoles; Mitindomidas; Mitocicinas; Mitocicinas; Mitofloxonas; Mitogillinas; Mitoguazonas; Mitomalcinas; Mitomicinas; Mitonafidas; Mitoquidonas; Mitosper; Mitotanos; Mitoxantronas; Mitozolomidas; Mivobulinas; Mizoribinas; Mofarotenos; Mopidamoles; Mubritinib; Ácidos micofenólicos; Nedaplatinos; Nelzarabinas; Nemorubicinas; Nitracrinas; Nocodazoles; Nogalamincinas; Nolatrexed; Nortopixantronas; Octreotidas; Ormaplatinos; Ortataxel; Oteracilos; Oxisuranos; Oxofenarsinas; Paclitaxeles; Pamidronates; Patubilonas; Pegaspargasas; Peldesinas; Peliomicinas; Pelitrexoles; Pemetrexed; Pentamustinas; Peplomicinas; Perfosfamidas; Perifosinas; Picoplatinos; Pinafidas; Pipobromanos; Pisosulfanos; Pirfenidonas; Piroxantronas; Pioxantronas; Plevitrexed; Plicamicinas; Plomestanos; Plomestanos; Porfímeros; Porfíromicinas; Prednimustinas; Procarbazines; Propamidinas; Prospidios; Pumitepas; Puomicinas; Pirazofurinas; Ranimustinas; Riboprinas; Ritrosulfanos; Rogletimidias; Roquinimex; Rufocromomicinas; Sabarubicinas; Safingoles; Satraplatinos; Sebriplatinos; Semustinas; Simtrazenos; Sizofiranos; Sobuzoxanos; Sorafenib; Sparfosatos; Ácidos esparfósicos; Sparsomicinas; Spirogermanios; Spiromustinas; Spiroplatinos; Spiroplatinos; Scualaminas; Streptonigrinas; Streptovarinas; Streptozocinas; Sufosfamidas; Sulofenur; Tacedinalinas; Talisomicinas; Talimustinas; Tariquidar; Tauromustinas; Tecogalanos; Tegafur; Teloxantronas; Temoporfinas; Tenipósidos; Teroxironas; Testolactonas; Tiamiprinas; Tioguaninas; Tiotepas; Tiamiprinas; Tiazofurinas; Tilomisoles; Tiloronas; Timcodar; Timonacic; Tirapazaminas; Topixantronas; Toremfenos; Trabectedinas (ecteinascidina 743); Trastuzumab; Trestolonas; Triciribinas; Triciribinas; Trilostanos; Trimetrexatos; Tetranitratos Triplatinos; Triptorelinas; Trofosfamidas; Tubulozoles; Ubenimex; Mostazas de Uracilo; Uredapas; Valspodar; Vapreotidas; Verteporfinas; Vinblastinas; Vincristinas; Vindesinas; Vinepidinas; Vinfluninas; Vinformidas; Vinglicinatos; Vinleucinoles; Vinleurosinas; Vinorelbinas; Vinrosidinas; Vintriptoles; Vinzolidinas; Vorozoles; Xantomicina A (Guameciclinas); Zeniplatinos; Zilascorbs [2-H]; Zinostatinas; Zorubicinas; Zosuquidar; y similares.

Los portadores o vehículos farmacéuticos y cosméticos adecuados para la administración de los polipéptidos sHASEGP o dominio Hialuronidasa humano soluble de los mismos descritos en la presente memoria incluyen cualquiera de los portadores conocidos por los expertos en la técnica por ser adecuados para el modo particular de administración. Además, los polipéptidos se pueden formular como el único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o se pueden combinar con otros ingredientes activos que no perjudiquen la acción deseada, o con materiales que complementan la acción deseada conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos sHASEGP descritos en la presente memoria se pueden utilizar como un suministro o agente de "propagación" combinados con un segundo compuesto activo, tal como un agente terapéuticamente eficaz, incluyendo, pero no limitado a un fármaco o un profármaco, para facilitar el suministro o para mejorar la actividad del segundo ingrediente activo. En un ejemplo concreto, se pueden co-formular o co-administrar un polipéptido sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma con un agente anestésico, tal como lignocaina, bupivacaína o una mezcla de los dos, y, opcionalmente, un agente hormonal, tal como la epinefrina, para disminuir o detener la absorción de sangre durante la cirugía oftálmica. En otro ejemplo particular, un polipéptido sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma se pueden co-formular o co-administrar con un agente farmacológico tal como un agente anti-inflamatorio para mejorar el suministro del agente farmacológico a los tejidos del mamífero in vivo (p. ej., a porciones del ojo) donde se desea tal agente para tratar una afección concreta. Mediante la administración conjunta se pretende la administración de sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) junto con o en proximidad temporal a la administración de un agente farmacológico. Típicamente se prefiere que la sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) sea administrada poco antes (p. ej., 5 a 60 minutos antes) o, por conveniencia máxima, junto con el agente farmacológico. Como apreciarán los expertos en la técnica, la proximidad deseada de co-administración depende en una parte significativa de la vida media eficaz de los agentes en la configuración de tejido concreto, y de la enfermedad particular que se vaya a tratar, y se puede optimizar fácilmente sometiendo a ensayo los efectos de la administración de los agentes en distintos momentos en los modelos adecuados, tales como en modelos animales adecuados. En algunas situaciones, el momento óptimo de administración de la sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) superará los 60 minutos. A modo de ilustración, y sin desear estar limitado por la teoría, en algunas situaciones tumorales, por ejemplo, la entrada máxima de agente quimioterapéutico en el tumor se puede producir después de la degradación del hialuronano en el tumor sea sustancialmente completa con el fin de reducir el volumen intersticial del tumor, lo cual está seguido por una fase de regenerativa del hialuronano durante el cual el fluido es arrastrado de nuevo al tumor dando como resultado una

mayor adsorción de un agente quimioterapéutico desde el plasma. En este último caso, la administración óptima de sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) se puede obtener entre aproximadamente una y veinte horas antes de la administración del agente farmacológico. Con el fin de optimizar el tiempo de pre-administración con relación al agente farmacológico para una combinación concreta de condición de la enfermedad y agente farmacológico, un experto en la técnica puede realizar un programa rutinario de pre-administración, comparando típicamente uno o varios puntos de tiempo de una hora o menos con uno o varios puntos de tiempo de más de horas (pero típicamente no superior a un día) con el fin de optimizar el momento de la administración. Un polipéptido sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma también puede ser co-formulados o co-administrados con varios agentes quimioterapéuticos, tales como una toxina y un factor de necrosis tumoral, para aumentar la actividad del agente quimioterápico y/o la accesibilidad de los tumores diana al agente quimioterapéutico. El compuesto activo se incluye en el vehículo en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos tóxicos graves en el individuo tratado. La concentración eficaz puede determinarse empíricamente sometiendo a ensayo los compuestos utilizando sistemas *in vitro* y *in vivo*, incluyendo los modelos animales descritos en la presente memoria.

En el caso de agentes farmacológicos que se suministran mediante administración parenteral (es decir, por rutas diferentes de a través del tracto digestivo, tales como mediante inyección subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa, por ejemplo), las sHASEGP (u otras glicosaminoglicanasas) se pueden co-formular o co-administrar fácilmente con cualquiera de una variedad de tales agentes farmacológicos para mejorar su suministro a los sitios deseados dentro del organismo. Por ejemplo, dependiendo de la combinación concreta del agente farmacológico y de la ruta de administración, el suministro se puede mejorar mediante el aumento del grado (y/o velocidad) al que el agente es difundido a través de un tejido en o cerca del sitio de administración (p. ej., después de su inyección) y/o el grado (y/o velocidad) al que el agente es difundido y/o portado por el transporte convectivo a través de un tejido diana (p. ej., después de su liberación desde el torrente sanguíneo, la linfa, el fluido cefalorraquídeo u otro sistema de fluido). El grado por medio del cual se mejora el suministro se puede evaluar fácilmente, por ejemplo, en sistemas modelo animales en los que la adición de una sHASEGP da como resultado un aumento medible en la biodisponibilidad del agente en los tejidos de interés dentro del organismo.

Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que en el caso de los compuestos parenterales no intravenosas (tales como inyectables subcutáneos, intradérmicos e intramusculares), la presencia de sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) en la proximidad de un sitio de inyección y en sitios "aguas abajo", tales como los que existen entre un sitio de inyección y un lecho vascular distal, puede mejorar la difusión y/o el transporte convectivo del agente en un sistema de suministro tal como la vasculatura. El suministro mejorado en una situación de este tipo puede estar asociado con un aumento en la cantidad del agente que pasa efectivamente a través y fuera del sitio de suministro inicial (potencialmente tanto mediante el aumento de volumen como de la velocidad de flujo de la mayor parte del fluido).

En el caso de muchos agentes farmacológicos, que están sujetos a la degradación, eliminación u otras formas de inactivación en los tejidos, el aumento de la velocidad de su paso a través de un tejido a su vez puede incrementar sustancialmente la cantidad de agente eficaz que transita a través del tejido, aumentando adicionalmente su biodisponibilidad. Para los compuestos parenterales administrados por vía no intravenosa, que posteriormente entran en el torrente sanguíneo u otro conducto, así como para los agentes suministrados directamente a los vasos del conducto (tal como mediante administración intravenosa, IV), la capacidad del agente para difundirse a través de un tejido suministrado por el conducto también puede ser mejorada por la presencia de sHASEGP en el tejido. Ya está presente sHASEGP en el "tejido de suministro" tal como en el primer caso, y/o en el "tejido diana", como en el último caso, la presencia de sHASEGP puede mejorar por lo tanto la propagación eficaz y/o la velocidad de suministro del agente farmacológico para dirigirse a tejidos dentro del organismo. En cualquier caso, la sHASEGP se puede utilizar para aumentar la biodisponibilidad eficaz de un agente farmacológico con el que se ha co-formulado o co-administrado. Como resultado, la sHASEGP se puede utilizar para alcanzar concentraciones elevadas y/o más rápidamente alcanzadas del agente para proporcionar, por ejemplo, una respuesta más potente y/o más rápida para una dosis dada. Alternativamente, la sHASEGP se puede utilizar para permitir que se alcance una respuesta dada con una dosis más baja de agente administrado, por ejemplo. La capacidad de una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) para mejorar el flujo de fluido masivo en y cerca de un sitio de la inyección también puede mejorar otros aspectos del suministro farmacológico asociado. Por ejemplo, el aumento en el flujo de fluido masivo puede ayudar a permitir que el volumen de fluido inyectado se disperse más fácilmente desde la zona de inyección (reduciendo potencialmente las consecuencias adversas dolorosas o de otro tipo de la inyección). De hecho, durante mucho tiempo se ha reconocido que tales sensaciones adversas asociadas con las inyecciones parenterales no IV son una razón clave de que los pacientes puedan resistir o evitar la administración parenteral no IV (que puede requerir efectivamente que un producto sea administrado por vía intravenosa cuando de otro modo se podría administrar más convenientemente y/o seguramente a través de una ruta no IV).

Al utilizar una sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) de la presente invención para mejorar el suministro de uno o más agentes farmacológicos o de otro tipo en el organismo (un uso que se refiere a veces como "propagar"), la propia sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) puede ser administrada por la misma ruta que el agente farmacológico (en cuyo caso puede ser formulada conjuntamente o de otra manera co-administrado junto con el

agente farmacológico o puede ser administrada por separado, preferiblemente antes del agente farmacológico como se discutió anteriormente. Alternativamente, o además, la sHASEGP (u otra glicosaminoglicanasa) se puede administrar mediante una ruta de administración diferente. Por ejemplo, el agente farmacológico puede introducirse localmente mediante inyección parenteral no IV y la sHASEGP se puede introducir por vía intravenosa. Como otro ejemplo ilustrativo y no limitante, la sHASEGP se puede introducir localmente mediante inyección parenteral no IV (en un tejido que se desea que sea elegido como diana por el agente farmacológico) y el propio agente farmacológico puede ser introducido por otra vía, tal como intravenosa, no parenteral (p. ej., oral) u otra ruta. Como apreciarán por lo tanto los expertos en la técnica, la sHASEGP de la presente invención se pueden utilizar para mejorar el suministro y la biodisponibilidad de una variedad de agentes farmacológicos y de otro tipo que incluyen agentes que normalmente son suministrados por rutas parenterales así como no parenterales.

Por ejemplo, las sHASEGP (u otras glicosaminoglicanasas) pueden ser co-formuladas o co-administradas con una variedad de agentes farmacológicos que típicamente se administran mediante suministro parenteral, p. ej., para mejorar su eficacia y/o para mejorar su perfil de riesgo/beneficio en el tratamiento de la enfermedad.

A modo de ilustración de la variedad de agentes farmacológicos que pueden administrarse parenteralmente y su suministro y/o biodisponibilidad mejoradas a través de co-formulación y/o co-administración con sHASEGP (u otras glicosaminoglicanasas) de la presente invención, la siguiente lista es no exhaustiva (y por lo tanto no se pretende que sea limitante) sino simplemente para proporcionar agentes ilustrativos: Adalimumab (p. ej. HUMIRA™), Agalsidasas Beta (p. ej. FABRAZYME™), Aldesleuquinas (PROLEUKIN™ IL-2), Alefacept (p. ej. AMEVIVE™), ampicilinas (p. ej., Inyección de UNASYN™), Anakinras (p. ej. KINERET™), Vacunas Antipoliomielíticas (p. ej., PEDIARIX™), Anti-Timocitos (p. ej., THYMOGLOBULINA™), Azitromicinas (p. ej. ZITHROMAX™ IV), Becaplerminas (p. ej. REGRANEX™), Caspofunginas (p. ej., CANCIDAS™), Cefazolinás (p. ej., ANCEF™ y CEFAZOLINA™), Cefepimas (p. ej. MAXIPIME™), Cefotetanos (p. ej. CEFOTAN™), Ceftazidimes (p. ej. FORTAZ™), Ceftriaxonas (p. ej. ROCEFIM™), Cetuximabs (p. ej., ERBITUX™), Cilastatinas (p. ej. PRIMAXIN™ IV), Ácidos Clavulánicos (p. ej., junto con Amoxicilinas tales como en AUGMENTIN™), Clindamicinas (p. ej. CLEOCIN™), Darbepoetinas Alfa (p. ej. ARANESP™), Deaclizumab (p. ej. ZENAPAX™), Toxoides de Difteria (típicamente combinadas p. ej. DAPTACEL™, INFANRIX™ y PEDIARIX™), Efalizumab (p. ej. RAPTIVA™), Epinefrinas (p. ej. EPIPEN™), Eritropoyetinas Alfa (p. ej. EPOGEN™ y PROCRIT™), Etanercept (p. ej. ENBREL™), Filgrastim (p. ej. NEUPOGEN™), Fluconazoles (p. ej. Inyección de DIFLUCAN™), Hormonas Estimuladoras del Folículo tales como Folitropinas Alfa (p. ej., GONAL-F™) y Folitropinas Beta (p. ej. FOLLISTIM™), Fosfenitoínas (p. ej. CEREBYX™), Fluconazoles (p. ej. DIFLUCAN™), Gadodiamidas (p. ej. OMNISCAN™), Gadopentetatos (p. ej. MAGNEVIST™), Gatifloxacinas (p. ej., TEQUIN™), Glatirámeros (p. ej. COPAXONE™), GM-CSF (p. ej., LEUKINE™), Goserelinas (p. ej. ZOLADEX™), Granisetronas (p. ej. KYTRIL™), Haemophilus Influenza B (p. ej. COMVAX™ y HibTITER™), Haloperidoles (p. ej. HALDOL™), Vacunas de la Hepatitis A (p. ej. HAVRIX™, TWINRIX™ y VAQTA™), Vacunas de la Hepatitis B (p. ej., COMVAX™, ENGERIX™-B, RECOMBIVAX™-HB, TWINRIX™ recombinantes, y BAYHEP™-B y NABI™-HB no recombinantes), Ibritumomab Tiuxetan (p. ej., ZEVALIN™), inmunoglobulinas (incluidas mezclas de inmunoglobulinas tales como GAMMAGARD™ y similares, así como cualquiera de una variedad de inmunoglobulinas purificadas), Vacunas del virus de la gripe (p. ej. FLUMIST™), Infliximab (p. ej., REMICADE™), insulinas (p. ej. productos HUMALOG™, HUMALOG™ MIX 75/25™, HUMULIN™ (incl. 50/50, 70/30, Regular, NPH, Ultra y Ultralente) y NOVOLIN™), Insulina Glargina (p. ej. LANTUS™), interferón Alfa 2a (ROFERAN™-A), Interferón Alfa-2b (p. ej. INTRON-A™), Interferón Alfacon-1 (p. ej. INFERGEN™), Interferón Alfa-N3S (p. ej., de ALFERON N™), Interferón Beta (p. ej. BETASERON™ y BETAFERON™), Interferón Beta-1a (p. ej. AVONEX™ y REBIF™), Interferón Gamma (p. ej., ACTIMMUNE™), Iodixanoles (p. ej. VISIPAQUE™), Iohexoles (OMNIPAQUE™), Iopamidoles, Ioversoles (p. ej. OPTIRAY™), cetorolacos (p. ej. TORADOL™), LaronidasAs (p. ej. ALDURAZYME™), levofloxacinas (p. ej. LEVAQUIN™), Lidocainas, Linezolidas (p. ej. ZYVOX™), Lorazepam (p. ej. ATIVAN™), Vacunas de Sarampión (p. ej. ATTENUVAX™), Vacunas de Virus de Sarampión-Paperas-Rubéola (p. ej., M-M-R™ II), Medroxiprogesteronas (p. ej., DEPO-PROVERA™), Meropenemos (p. ej. MERREM™ IV), Metilprednisolonas (p. ej., SOLU-MEDROL™), Midazolamos (p. ej. VERSED™), Morfinas (p. ej. ASTRAMORPH/PF™), Octreotidas (p. ej., SANDOSTATIN™), Omalizumab (p. ej. XOLAIR™), Ondansetronas (p. ej. ZOFRAN™), Palivizumab (p. ej. SYNAGIS™), Pantoprazoles (p. ej. PROTONIX™), Pegaspargasas (p. ej. ONCASPAR™), Pegfilgrastim (p. ej. NEULASTA™), Peg-Interferón Alfa-2a (p. ej. PEGASYS™), Peg-Interferón alfa-2b (p. ej., PEG-INTRON™), Pegvisomant (p. ej. SOMAVERT™), Vacunas de la Tosferina, Piperacilinas (p. ej. ZOSYN™), Vacunas de Neumococos (p. ej. PNEUMOVAX™ 23) y Vacunas de Productos Conjugados Antineumocócicos (p. ej. PREVENAR™), Prometazinas (p. ej. PHENERGAN™), ReteplasAs (p. ej. RETAVASA™), Somatropinas (p. ej. GENOTROPIN™, HUMATROPE™, NORDITROPIN™, NUTROPIN™, SAIZEN™, SEROSTIM™, ZORBTIVE™), Sulbactamas, Sumatriptanos (p. ej. IMITREX™), Tazobactamas, Tenecteplasas (p. ej. TNKASATM), Toxoides Purificados del Tétanos, Tetracilinas (p. ej. TIMENTINA™), Tositumomab (p. ej., BEXXAR™), Acetónidos de Triamcinolona, Vancomicinas (p. ej. VANCOCIN™), Vacunas contra la Varicela (p. ej. VARIVAX™), así como otras vacunas; y similares.

Como se ha descrito e ilustrado en la presente memoria, los agentes farmacológicos de varias clases y rutas de administración diferentes pueden ser beneficiados por la co-administración y/o co-formulación con las sHASEGP (u otras glicosaminoglicanasas) para mejorar uno o más de sus aspectos de uso. Tales mejoras pueden comprender,

5 por ejemplo, uno o cualquier combinación de los siguientes: (i) mejorando el grado y/o la velocidad de absorción y por lo tanto la biodisponibilidad de un agente (por ejemplo haciendo que más del mismo alcance el torrente sanguíneo después de administración parenteral no IV, y/o menos del mismo sea degradado después de tal administración local mediante penetración más rápida), que puede ser provocada, por ejemplo, mediante la
 10 aceleración de flujo intersticial y el transporte potencialmente convectivo después de la administración parenteral no IV (p. ej., mediante la aplicación de presión hidrostática asociada con el volumen de inyección combinada con una reducción en la impedancia del flujo asociado con la degradación de hialuronano); (ii) proporcionando una ruta más segura o más conveniente de administración (p. ej., permitiendo la administración parenteral no IV en lugar de IV, o administraciones parenterales no IV mejoradas o más conveniente tales como intradérmica o subcutánea en lugar
 15 de intramuscular); (iii) regímenes de dosificación más favorables (p. ej., dosificación menos frecuente, o una ruta no IV con dosis más frecuente pero más baja en comparación con una dosis IV menos frecuente, pero más alta); (iv) reduciendo un efecto secundario o de otro modo disminuyendo la toxicidad (por ejemplo un efecto asociado con la concentración inicialmente alta (C_{max} alta) generada por la dosificación IV, o a partir de una dosis local alta generada mediante absorción lenta y/o incompleta después de la administración parenteral no IV); (v) mejorando de otro modo la farmacocinética y/o la farmacodinámica (p. ej., permitiendo que más de un agente llegue a un sitio
 20 diana (p. ej., por el aumento del flujo de fluido intersticial y el transporte convectivo debido a la presencia de sHASEGP en o cerca de un sitio de suministro tal como un sitio de inyección), y/o mediante la mejora de la penetración dentro de un sitio diana (p. ej., por el aumento de flujo de fluido intersticial y el transporte convectivo debido a la presencia de sHASEGP en el sitio diana), o suministrando un agente preferentemente a un sitio diana (p. ej., administración local a un sitio diana junto con la administración local o sistémica de una sHASEGP para promover la penetración de la diana, o mediante el uso de vehículos o complejos macromoleculares para dirigir preferentemente un agente a un sitio concreto en combinación con la administración local o sistémica de sHASEGP para promover la penetración del sitio diana); Los agentes que han sido suministrados por vía oral también pueden ser beneficiados por reformulaciones para el suministro parenteral para, p. ej., evitar la pérdida de agente en el
 25 tracto gastrointestinal o la degradación o la toxicidad subsiguiente, permitir el direccionamiento más eficaz a un sitio de acción deseado y por lo tanto potencialmente mayor eficacia y/o menos toxicidad, o de otra manera proporcionar perfiles farmacocinéticos y/o farmacodinámicos más favorables. Además, las sHASEGP se pueden utilizar para mejorar la farmacodinámica de los agentes que se administran por vía oral (p. ej., mediante la mejora de la penetración de un agente administrado por vía oral dentro de su sitio diana deseado (por ejemplo, aumentando el flujo de fluido intersticial y el transporte convectivo debido a la presencia de sHASEGP en el sitio diana tras la administración sistémica de sHASEGP y/o después de la administración local de la sHASEGP en el sitio diana).

35 Incluso en situaciones en las que el sitio diana deseado para un agente tal como el agente farmacológico es el propio torrente sanguíneo, tales agentes pueden ser mejorados mediante co-administración y/o co-formulación con las sHASEGP (u otras glicosaminoglicanasas). Por ejemplo, existen una serie de agentes que actúan como modificadores de la sangre, que pueden administrarse por una de varias rutas que incluyen la administración oral así como la administración parenteral (tal como inyección IV). Varios agentes que son o podrían ser administrados por vía oral, sin embargo, exhiben absorción relativamente limitada o lenta y/o están sujetos a la degradación no deseable (y hay otros agentes que son generalmente seguros y eficaces una vez introducidos en el torrente
 40 sanguíneo, pero no se administran por vía oral por esa razón). La administración parenteral de tales agentes (p. ej., rutas intramuscular, subcutánea, intradérmica o transdérmica combinada con la administración de sHASEGP, preferiblemente en o cerca del sitio de administración parenteral) se puede emplear por lo tanto para proporcionar su introducción en el torrente sanguíneo. Además, hay una serie de situaciones médicas de urgencia en las que el suministro rápido de un agente a la circulación sanguínea es esencial, pero la dosificación oral es demasiado lenta y la dosificación intravenosa es inconveniente, no segura o no está disponible. Estas situaciones urgentes incluyen aquellas en las que la sangre es la diana, así como aquellas en las que el torrente sanguíneo es simplemente la ruta del suministro a otro tejido diana. En tales situaciones, la capacidad de combinar la administración con una sHASEGP (o aplicar una co-formulación ya preparada con una sHASEGP) puede permitir un suministro rápido del
 45 agente a través de la administración parenteral no IV. Como también será apreciado por los expertos en la técnica, hay una serie de formulaciones y dispositivos diseñados para administraciones parenterales no IV que pueden proporcionar, p. ej., una liberación programada u otra provocada de los agentes, así como una dosificación variable controlada y similares. Un gran número de tales agentes farmacológicos (que pueden ser co-formulados con o utilizados combinados con una sHASEGP) se aplican regularmente en la práctica médica y los aspectos de su uso bien descrito (véase, p. ej., The Physicians Desk Reference, Thomson 2003, 2004, 2005), y muchos otros de tales
 50 agentes son conocidos en la técnica. A este último respecto, como apreciarán los expertos en la técnica, las sHASEGP se pueden emplear combinadas con agentes utilizados en la actualidad (para, p. ej. mejorar su aplicabilidad como se describe en la presente memoria), con agentes que no se utilizan en la actualidad (para, p. ej. mejorar su farmacocinética y/o farmacodinámica y volverlos útiles de ese modo), o con agentes recientemente desarrollados.

60 Por lo tanto para los agentes farmacológicos (tales como agentes anticancerosos, modificadores de la sangre o miembros de otras clases de agentes como se describe en la presente memoria) que se introducen típicamente por vía parenteral (p. ej., mediante inyección IV), las sHASEGP (u otras glicosaminoglicanasas) se pueden utilizar por ejemplo para permitir que tales agentes sean administrados por otras rutas potencialmente más convenientes y/o

seguras, tal como por la administración parenteral no IV (p. ej., rutas intramuscular, subcutánea, intradérmica o transdérmica). Para los agentes que son suministrables por una ruta parenteral no IV, las sHASEGP se pueden utilizar para mejorar su grado y/o velocidad de absorción y el suministro (p. ej., promoviendo su dispersión y posterior entrada en el torrente sanguíneo, lo que probablemente puede ser ayudado por transporte convectivo como se describe en la presente memoria). Las ventajas de tales efectos incluyen tener una mayor parte del agente de alcanza el torrente sanguíneo, reduciendo la exposición local al agente (en términos de concentración y/o tiempo) (p. ej. en o cerca del sitio de la inyección, lo que a menudo limita la dosificación o da como resultado problemas de toxicidad local), aumentando la velocidad a la que un agente se puede suministrar al torrente sanguíneo, otras propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas mejoradas, y la conveniencia de la administración. En el último aspecto, las administraciones parenterales no IV pueden permitir que muchos agentes sean administrados fuera del hospital lo que de otra manera requeriría hospitalización u otra atención médica normalmente requeridas para las administraciones intravenosas.

Los ejemplos ilustrativos de los modificadores de la sangre incluyen agentes tales como agentes antihemofílicos y agentes con deficiencia de factores sanguíneos (incluyendo, por ejemplo, factores antihemofílicos (p. ej. ADVATE™, HEMOFIL™, KOATE™-DVI, KOGENATE™-FS, RECOMBIMATE™ y REFACTO™), complejo coagulante anti-inhibidor (p. ej. FEIBA™ VH), antitrombina III (p. ej. THROMBATE™ III), Factor VII de coagulación (p. ej. NOVOSEVEN™), Factor VIII de coagulación (p. ej. ADVATE™, KOGENATE™-FS y RECOMBIMATE™), Factor IX de coagulación (p. ej. BEBULIN™, BENEFIX™ y PROPLEX™ T), fracciones de proteínas plasmáticas (p. ej. PLASMANATE™), factores de von Willebrand)); agentes antiplaquetarios (incluyendo, por ejemplo, abciximab (p. ej. REOPRO™), anagrelidAs (p. ej. AGRYLIN™), cilostazolEs (p. ej. PLETAL™), bisulfatos DE clopidogrel (p. ej. PLAVIX™), dipiridamoles (p. ej. AGGRENOX™ y PERSANTINE™), epoprostenoles (p. ej., FLOLAN™), eptifibatidas (p. ej. INTEGRILIN™), tirofibanos (p. ej. AGGRASTAT™)); factores estimuladores de colonias (CSF) (incluyendo, por ejemplo, CSF de Granulocitos (p. ej., NEULASTA™ y NEUPOGEN™) y CSF de granulocitos y macrófagos (p. ej., LEUKINE™)); estimuladores de la eritropoyesis (incluyendo, por ejemplo, eritropoyetinas, tales como darbepoetina alfa (p. ej., ARANESP™) y epotina alfa (p. ej. EPOGEN™ y PROCRI™); hemostáticos y albúminas (incluyendo, por ejemplo, aprotininas (p. ej. TRASYLOL™), combinaciones de factores antihemofílicos y plasma (p. ej. ADVATE™), Acetato de Desmopresina (p. ej. DDAVP™) y albúminas (p. ej. BUMINATE™ y PLASBUMIN™)); Inmunoglobulinas (p. ej. BAYGAM™, CARIMUNE™ NF IV, FLEBOGAMMA™, GAMIMUNE™, GAMMAGARD S/D™, GAMUNEX™, IVEEGAM™, IVEEGAM™ ES IGIV, MICRHOGAM™, RHOGAM™, PANGLOBULIN™ y THYMOGLOBULIN™, así como inmunoglobulinas de la hepatitis B (p. ej. BAYHEP™ B, NABI-HB™ y NOVAPLUS™ NABI-HB); inhibidores de trombina (incluyendo por ejemplo inhibidores directos de trombina (p. ej., ARGATROBAN™) y lepirudina (p. ej. REFLUDAN™), y drotecogina alfa (p. ej. XIGRIS™); anticoagulantes (incluyendo, por ejemplo, dalteparinas, enoxaperinas y otras heparinas (p. ej. FRAGMIN™ y LOVENOX™), warfarinas (p. ej. COUMADIN™ y JANTOVEN™)); y similares.

A modo de ilustración adicional, los ejemplos de distintos tipos de agentes que han sido administrados parenteralmente y que se puede co-administrar y/o co-formular con las sHASEGP (u otras glicosaminoglicanas) están incluidos en la siguiente lista: Acetazolamidas; Aciclovir; Adipidonas; Alatrofloxacinas; Aldesleuquinas; Alemtuzumab; Alfentanilos; Extractos alérgicos; Alopurinoles; Inhibidores de Proteinasa Alfa-1; Alprostadios; Amifostinas; Amicacinas; Aminoácidos; Ácidos aminocaproicos; Aminofilinas; Amitriptilinas; Amobarbitales; Amrinonas; Anakinras; Analgésicos; Vacunas Antipoliomielíticas; Sueros anti-Rábicos; Inmunoglobulinas anti-tétanos; Antitrombinas III; Sueros antiveneno; Argatrobanos; Argininas; Arsénicos; Ácidos ascórbicos; Asparraginas; Atenololes; Atracurium; Atropinas; Aurotioglucosos; Azatioprinas; Azitromicinas; Aztreonamos; Vacunas de Bacillus Calmette-Guerin (BCG); Bacitracinas; Baclofenos; Basiliximab; Ácidos benzoicos; Benzotropinas; Betametasonas; Biotinas; Bivalirudinas; Bleomicinas; Antitoxinas de botulismo; Bretilium; Bumetanidas; Bupivacainas; Buprenorfinas; Busulfanos; Butorfanoles; Calcitoninas; Calcitrioles; Calcios; Capreomicinas; Carboprost; Carmustinas; Carnitinas; Caspofunginas; Cefamandoles; Cefazolinás; Cefoperazonas; Cefotaximas; Cefotetan; Cefoxitinas; Ceftazidimas; Ceftizoximas; Cefuroximas; Cloranfenicoles; Cloroprocainas; Cloroquinas; Clorotiazidas; Clorpromazinas; Ácidos condroitinsulfúricos; Coriogonadotropinas Alfa; Cromos; Cidofovir; Cimetidina; Ciprofloxacinas; Cisatracurios; Cisplatinos; Cladribinas; Ácidos clavulánicos; Clindamicinas; Clonidinas; Codeínas; Colchicinas; Colistinas; Colágenos; Triflutatos de corticorelina ovina; Corticotrofinas; Cosintropinas; Cianocobalaminas; Ciclofosfamidas; Ciclosporinas; Cisteínas; Citarabinas; Dacarbazinas; Dacliximab; Dactinomycinas; Dalfopristinas; Dalteparinas; Danaparoides; Dantrolenos; Daunorrubicinas; Deferoxaminas; Denileuquina Diffitox; Desmopresinas; Dexametasonas; Dexmedetomidinas; Dexpantenoles; Dexrazoxanos; Dextranos; Ácidos diatrizoicos; Diazepam; Diazóxidos; Dicclominas; Digibind; Digoxinas; Dihidroergotaminas; Diltiazemos; Difenhidraminas; Vacunas de difteria, tétanos y tosferina; Antitoxinas de difteria; Dipiridamoles; Dobutaminas; Dopaminas; Doxacurios; Doxapram; Doxercalciferoles; Doxiciclinas; Droperidoles; Drotrecoginas Alfa; Difilinas; Ácidos edéticos; Edrofonios; Enalaprilat; Efedrinas; Epoprostenoles; Ergocalciferoles; Ergonovinas; Ertapenemos; Eritromicinas; Esmololes; Estradioles; Estrogénicos; Ácidos etacrínicos; Etanolaminas; Etanoles; Aceites etiodizados; Ácidos etidrónicos; Etomidatos; Etopósidos; Factores VIII; Famotidinas; Fenoldopam; Fentanilos; Floxuridinas; Fludarabinas; Flumazenilos; Fluoresceínas; Fluorouracilos; Flufenazinas; Ácidos fólicos; Hormonas estimuladoras del Folículo; Fomepizoles; Fomivirsen; Fondaparinux; Foscarnet; Fosfenitoínas; Fulvestrant; Furosemidas; Gadoteridoles; Gadoversetamidás; Ganciclovir; Gatifloxacinas; Gemtuzumab

ozogamicina; Gentamicinas; Glucagón; Glucosas; Glicinas; Glicopirrolatos; Gonadorelinas; Gonadotropina coriónica; Polisacáridos de Haemophilus B; Haloperidoles; Heminas; Vacunas contra Hemophilus influenza; Vacunas contra la hepatitis; Compuestos Herbales; Histaminas; Hidralazinas; Hidrocortisonas; Hidromorfonas; Hidroxocobalaminas; Hidroxizinas; Hosciaminas; Ibutilidas; Idarrubicinas; Ifosfamidás; Imiglucerasas; Inmunoglobulinas; Carmines índigo; 5 Indometacinas; Interferón alfa-con1; Interferón alfa-2A; Interferón alfa-N3; Interferón beta-1a; Yoduros; Iopromidas; Ácidos iotalámicos; Ácidos loxáglicos; Ioxilanos; Inyecciones de hierro dextrano; Isoniazidas; Isoproterenoles; Vacunas contra la encefalitis japonesa; Kanamicinas; Cetaminas; Cetorolacos; Labetaloles; Lepirudinas; Leucovorinas; Leuprolidas; Levobupivacaínas; Levotiroxinas; Lidocainas; Lincomicinas; Linezolidas; Liotironinas; Lorazepam; Hormona Luteinizante; Vacunas para la enfermedad de Lyme; Mangafodipir; Manitoles; Virus del 10 sarampión; Mecloretaminas; Melfalán; Vacunas meningocócicas de polisacáridos; Meperidinas; Mepivacainas; Meropenemos; Mesnas; Mesoridazinas; Metaraminóles; Metadonas; Metocarbamóles; Metohexital; Metotrexatos; Metildopatos; Metilergonovinas; Metoclopramidás; Metoprolóles; Metronidazóles; Midazolam; Minociclínas; Mitramicinas; Mitomicinas; Mitoxantronas; Mivacurio; Ácido morruico; Moxifloxacinás; Virus de las paperas; Muromonab-CD3; Micofenolato de Mofetilo; Nafcilinas; Nalbufinas; Nalmefenos; Naloxonas; Nandrolonas; Neostigminas; Niacinamidás; Nicardipinas; Nitroglicerinas; Nitroprusído; Norepinefrinas; Oprelvequinas; 15 Orfenadrinas; Oxacilinas; Oxaliplatinos; Oximorfonas; Oxitetraclínas; Oxitócos; Pancuronios; Pantenóles; Ácidos pantoténicos; Papaverinas; Pegaspargasas; Peginterferón alfa 2A; Penicilina G; Pentamidinas; Pentazocinas; Pentobarbitales; Pentostatinas; Perflutrenos; Perfenazinas; Vacunas contra la tosferina; Fenobarbitales; Fentolaminas; Fenilefrinas; Fenitoínas; Fisostigminas; Fitonadionas; Vacunas neumocócicas; Polimixina B; Porfímeros; Pralidoximas; Prilocainas; Procainamidás; Procaínas; Proclorperazinas; Progesteronas; Prometazinas; 20 Propranolóles; Piridostigmina hidróxidos; Piridoxinas; Quinidinas; Quinupristinas; Inmunoglobulinas antirrábicas; Vacunas contra la rabia; Ranitidinas; Rasburicasas; Remifentanilos; Riboflavinas; Rifampinas; Ropivacaínas; Rubéola; Samarios; Escopolaminas; Selenios; Sermorelinas; Sincalidas; Somatrem; Espectinomycinás; Estreptoquinásas; Estreptomycinás; Estreptozocinas; Succinilcolinas; Sufentanilos; Sulbactamas; Sulfametoxazóles; Sumatriptán; Tacrolimus; Teniposidos; Terbutalinas; Teriparatidas; Testosteronas; Antitoxinas contra el tétanos; 25 Tetracainas; Sulfatos de tetradecilo; Teofilinas; Tiaminas; Tietilperazinas; Tiopental; Hormona estimuladora de la tiroides; Ticarcilinas; Tinzaparinás; Tirofiban; Tobramicinas; Tolazolinás; Tolbutamidás; Topotecan; Torsemidas; Ácido tranexámico; Treprostinil; Acetónidos de triamcinolona; Hexacetónidos de triamcinolona; Triamcinolonas; Trietilfosforamida (tiotepa); Trifluoperazinas; Trimetobenzamidás; Trimetoprimas; Trimetrexatos; Triptorelinas; 30 Trometaminas; Tuberculinas; Vacuna tifoidea; Urofollitropinas; Urokinasas; Ácido valproico; Valrubicina; Inmunoglobulinas de Varicela zoster; Vasopresinas; Vecuroniuo; Verapamilo; Vinblastinas; Vincristinas; Voriconazóles; Warfarinas; Vacunas contra la fiebre amarilla; Zidovudinas; Zinc; Hidrocloruro de ziprasidona; y agentes relacionados con los anteriores o en las mismas o similares clases que los anteriores.

35 Las soluciones o suspensiones utilizadas para la administración parenteral (incluyendo por las rutas intramuscular, intradérmica, subcutánea, de aplicación tópica y otras rutas no orales) pueden incluir cualquiera de los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyectables, solución salina, aceite fijado, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol u otro disolvente sintético; agentes antimicrobianos, tales como alcohol bencílico y metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico y bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido 40 etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones, tales como acetatos, citratos y fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad, incluyendo, pero no limitados a, cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, dextrosa, glicerol o ácido bórico. Las preparaciones parenterales pueden encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis únicas o múltiples elaboradas de vidrio, plástico u otro material adecuado.

45 Los polipéptidos sHASEGP o dominios hialuronidasa humanos solubles de los mismos pueden suspenderse en forma micronizada u otra adecuada o pueden derivatizarse para producir un producto activo más soluble o para producir un profármaco. La forma de la mezcla resultante depende de varios factores, incluyendo el modo de administración deseado y la solubilidad del polipéptido en el portador o vehículo seleccionados. La concentración 50 eficaz es suficiente para mejorar la afección objetivo y se puede determinar empíricamente utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Para formular una composición, se disuelve, suspende, dispersa o mezcla de otro modo la fracción en peso de polipéptido en un vehículo seleccionado a una concentración eficaz de manera que la afección objetivo es aliviada o mejorada.

55 En los casos en los que los polipéptidos sHASEGP o dominio hialuronidasa humanos solubles de los mismos exhiben una solubilidad insuficiente, se pueden utilizar métodos para solubilizar polipéptidos. Tales métodos son conocidos por los expertos en esta técnica, e incluyen, pero no se limitan a, el uso de codisolventes, tales como dimetilsulfóxido (DMSO), el uso de tensioactivos, tales como TWEEN™ y Pluronic™ F68; o disolución en bicarbonato de sodio acuoso. Los derivados de los polipéptidos, tales como profármacos de los polipéptidos también se pueden utilizar en la formulación de composiciones farmacéuticas eficaces. Para indicaciones oftálmicas, las 60 composiciones se formulan en un portador oftálmicamente aceptable. Para los usos oftálmicos de la presente memoria, se contempla la administración local, ya sea mediante administración tópica o mediante inyección. También son deseables las formulaciones de liberación prolongada. Típicamente, las composiciones se formulan para una administración de dosis única, de modo que una sola dosis administre una cantidad eficaz. Tras la mezcla con el vehículo o la adición del polipéptido al mismo, la mezcla resultante puede ser una solución,

suspensión, emulsión u otra composición y se puede formular en forma de una mezcla acuosa, cremas, geles, pomadas, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, apósitos o cualquier otra formulación adecuada para administración sistémica, tópica o local.

5 La forma de la mezcla resultante depende de varios factores, incluyendo el modo de administración deseado y la solubilidad del compuesto en el portador o vehículo seleccionados. Si fuera necesario, se preparan sales farmacéuticamente aceptables u otros derivados de los compuestos. Para la administración local interna, tal como administración, intramuscular, parenteral o intra-articular, los compuestos se formulan preferiblemente como una
10 solución o suspensión en un medio de base acuosa, tal como solución salina isotónica tamponada o se combinan con un soporte biocompatible o bioadherente destinado para uso en administración interna.

15 El polipéptido sHASEGP o dominio hialuronidasa humano soluble del mismo se incluye en el portador farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios no deseables sobre el paciente tratado. Se entiende que el número y grado de efectos secundarios depende de la afección para la que se administran los compuestos. Por ejemplo, ciertos efectos secundarios tóxicos y no deseables son tolerados en el tratamiento de enfermedades potencialmente mortales que no se tolerarían cuando se tratan trastornos de menor importancia. Las cantidades eficaces para uso terapéutico, por supuesto, dependerán de la gravedad de la enfermedad y del peso y estado general del sujeto, así como de la
20 ruta de administración. La administración local del agente terapéutico requerirá típicamente una dosificación menor que cualquier modo de administración sistémica, aunque la concentración local del agente terapéutico puede, en algunos casos, ser más alta después de la administración local que se puede lograr con seguridad tras la administración sistémica.

25 Puesto que los sujetos individuales pueden presentar una amplia variación en la gravedad de los síntomas y cada agente terapéutico tiene sus características terapéuticas únicas, corresponde al médico determinar la respuesta de un sujeto al tratamiento y variar las dosificaciones por consiguiente. Las dosificaciones utilizadas *in vitro* pueden proporcionar una guía útil en las cantidades útiles para la administración *in situ* de la composición farmacéutica, y se pueden utilizar modelos animales en algunos casos para determinar las dosis eficaces para el tratamiento de trastornos concretos. En general, sin embargo, para la administración local, se contempla que una cantidad eficaz del agente terapéutico será una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,1 picogramos (pg) a aproximadamente 1 ng por kg de peso corporal. Varias consideraciones para llegar a una cantidad eficaz son conocidas por los expertos en la técnica y están descritas (véase, p. ej. Goodman And Gilman: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8^a ed., Pergamon Press, 1990; Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack
30 Publishing Co., Easton, Pa., 1990; y Mantyh et al., (Science, 278: 275-79, 1997) que implican la inyección intratecal de un ligando-toxina específica neuronal).

35 Las formulaciones de los polipéptidos sHASEGP o dominios hialuronidasa humanos solubles de los mismos para uso en esta invención incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, tópica, por inhalación, bucal, sublingual, otra administración parenteral (p. ej., subcutánea, intramuscular, intradérmica, transdérmica o intravenosa), o cualquier ruta. La vía más adecuada en cualquier caso dado depende de la naturaleza y gravedad de la afección que se esté tratando y de la naturaleza del compuesto activo concreto que se está utilizando. Las formulaciones se proporcionan para administración a seres humanos y animales en formas de dosificación unitarias, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles, y
40 soluciones o suspensiones orales, y emulsiones aceite-agua que contienen cantidades adecuadas de los polipéptidos y/u otros agentes o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los polipéptidos y/u otros agentes farmacéuticos terapéuticamente activos y derivados de los mismos se formulan y administran típicamente en formas de dosificación unitaria o formas de dosificación múltiple. Una forma de dosis unitaria según se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y envasadas individualmente como es conocido en la técnica.
50

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan para la administración a seres humanos y animales en formas de dosificación unitarias, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles, y soluciones o suspensiones orales, y emulsiones de aceite-agua que contienen cantidades
55 adecuadas del polipéptido sHASEGP o dominio hialuronidasa humano soluble del mismo y, opcionalmente, otro agente o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos farmacéuticamente terapéuticamente activos y derivados de los mismos se formulan y se administran típicamente en formas de dosificación unitarias o formas de dosificación múltiples. Una forma de dosis unitaria como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y envasadas individualmente como es conocido en la técnica. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada del compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Los ejemplos de la formas de dosis unitarias incluyen, pero no se limitan a, ampollas, jeringas y comprimidos o cápsulas envasados individualmente. Por ejemplo, se puede pre-
60 envasar una formulación de pequeño volumen que contiene una solución estabilizada con 1 a 5000 Unidades de

sHASEGP en un pequeño volumen, tal como 5 a 50 µl, en una jeringa para su uso, como por ejemplo después de la inyección de compuesto viscoelástico. Las formas de dosis unitaria se pueden administrar en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitarias idénticas envasadas en un único contenedor que se van a administrar en un forma de dosis unitaria segregada. Los ejemplos de las formas de dosis múltiples incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas o frascos de centilitros o litros. Por lo tanto, la forma de dosis múltiple es un múltiplo de dosis unitarias que no están segregadas en el envasado.

La composición puede contener junto con el ingrediente activo, tal como un polipéptido sHASEGP: un diluyente, tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico, o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales, tales como goma de acacia, gelatina, glucosa, melaza, polivinilpirrolidina, celulosa y derivados de los mismos, povidona, crospovidonas y otros de tales aglutinantes tales conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones líquidas farmacéuticamente administrables pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo, dispersando, o mezclando de otra manera un compuesto activo como se ha definido anteriormente y coadyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol, y similares, para formar así una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica a administrar también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, o agentes solubilizante, agentes de tamponamiento del pH y similares, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, sal de sodio de acetato de trietanolamina, oleato de trietanolamina, y otros de tales agentes. Los métodos de preparación de tales formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica (véase p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15ª Edition, 1975). La composición o formulación que se va a administrar contiene una cantidad del compuesto activo en una cantidad suficiente para aliviar los síntomas del sujeto tratado. Por ejemplo, una formulación estabilizada patrón de sHASEGP o un dominio Hialuronidasa humano soluble de la misma según se proporciona en la presente memoria incluye 150 unidades/mL de la glicoproteína soluble formulada en EDTA, NaCl y CaCl₂. Además, pueden estar presentes en la formulación un agente anti-bacteriano o anti-fúngico, incluyendo, pero no limitado a tiomersal. Otra formulación descrita en la presente memoria es una solución estabilizada o forma liofilizada de sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma en EDTA, NaCl y CaCl₂, que contiene una cantidad eficaz activa de la glicoproteína soluble, tal como 150 unidades/mL, con la adición de lactosa, tal como 13 mg/mL. También se describe en la presente memoria una formulación que contiene una solución estabilizada o forma liofilizada de sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma en EDTA, NaCl y CaCl₂ que contiene una cantidad activa eficaz de la glicoproteína soluble, tal como 150 Unidades/mL, con la adición de lactosa, tal como 13 mg/mL, y Albúmina, Pluronic™ F68, Tween™ y/u otro detergente. Otra formulación descrita en la presente memoria, ya sea liofilizada o en forma de una solución estabilizada, contiene una cantidad eficaz de sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma, tal como de 1 a 300 unidades/mL, en EDTA, NaCl y CaCl₂.

Se pueden preparar formas de dosificación o composiciones que contienen ingrediente activo en el intervalo de 0,005% a 100% con el resto elaborado a partir de un vehículo no tóxico. Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa.); cargas (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina o hidrógenofosfato de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (p. ej., almidón de patata o sal de sodio de glicolato de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse por medio de métodos bien conocidos en la técnica.

Las sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma o derivados farmacéuticamente aceptables se pueden preparar con portadores que protegen la glicoproteína soluble de la rápida eliminación del organismo, tales como formulaciones de liberación controlada o revestimientos. Las composiciones pueden incluir otros agentes farmacéuticamente eficaces conocidos en la técnica general que tendrán valor en el tratamiento de una o más de las enfermedades o condiciones médicas, incluyendo, pero no limitados a, un agente quimioterapéutico, un agente analgésico, un agente anti-inflamatorio, un agente antimicrobiano, un agente amebicida, un agente tricomocida, un agente antiparkinsoniano, un agente antimalárico, un agente anticonvulsivo, un agente antidepresivo, y un agente antiartrítico, un agente antifúngico, un agente antihipertensivo, un agente antipirético, un agente antiparasitario, un agente antihistamínico, un agente agonista alfa-adrenérgico, un agente bloqueador alfa, un agente anestésico, un agente dilatador de bronquios, un agente biocida, un agente bactericida, un agente bacteriostático, un agente bloqueador betadrenérgico, una agente bloqueador del canal de calcio, un agente farmacológico cardiovascular, un agente anticonceptivo, un agente descongestivo, un agente diurético, un agente depresor, un agente de diagnóstico, un agente electrolítico, un agente hipnótico, un agente hormonal, un agente hiperglucémico, un agente relajante muscular, un agente de contracción muscular, un agente oftálmico, un agente parasimpaticomimético, un agente energizante psíquico, agente oftálmico, un agente parasimpaticomimético, un agente energizante psíquico, un agente sedante, un agente simpaticomimético, un agente calmante, un agente urinario, un agente vaginal, un agente viricida, un agente vitamínico, un agente anti-inflamatorio no esteroideo, un agente inhibidor de la enzima conversora de angiotensina, un polipéptido, una proteína, un ácido nucleico, un fármaco, un profármaco, una molécula orgánica

y un inductor del sueño, para obtener combinaciones deseadas de propiedades. Se debe entender que dicha terapia combinada constituye un aspecto adicional de las composiciones y métodos de tratamiento descritos en la presente memoria.

5 1. Composiciones para administración oral

10 Las formas de dosificación farmacéuticas orales son sólidas, en gel o líquidas. Las formas de dosificación sólidas son comprimidos, cápsulas, gránulos y polvos a granel. Los tipos de comprimidos orales incluyen grageas y pastillas comprimidas, masticables, que pueden tener un recubrimiento entérico, un recubrimiento de azúcar o un recubrimiento de película. Las cápsulas pueden ser cápsulas de gelatina duras o blandas, mientras que los gránulos y polvos pueden ser proporcionados en forma no efervescente o efervescente con la combinación de otros ingredientes conocidos por los expertos en la técnica.

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

20 En ciertos ejemplos, las formulaciones son formas de dosificación sólidas, preferiblemente cápsulas o comprimidos. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante; un diluyente; un agente disgregante; un lubricante; un antiapelmazante; un agente edulcorante; y un agente aromatizante.

30 Los ejemplos de los aglutinantes incluyen celulosa microcristalina, goma de tragacanto, solución de glucosa, mucílago de acacia, solución de gelatina, sacarosa y pasta de almidón. Los lubricantes incluyen talco, almidón, estearato de magnesio o calcio, licopodio y ácido esteárico. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, sacarosa, almidón, caolín, sal, manitol y fosfato dicálcico. Los antiapelmazantes incluyen, pero no se limitan a, dióxido de silicio coloidal. Los agentes disgregantes incluyen croscarmelosa sódica, sal de sodio de glicolato de almidón, ácido alginico, almidón de maíz, almidón de patata, bentonita, metilcelulosa, agar y carboximetilcelulosa. Los agentes colorantes incluyen, por ejemplo, cualquiera de los colorantes FD y C solubles agua certificados aprobados, mezclas de los mismos; y colorantes FD y C insolubles en agua suspendidos en hidrato de alúmina. Los agentes edulcorantes incluyen sacarosa, lactosa, manitol y agentes edulcorantes artificiales tales como sacarina, y cualquier número de sabores secados por pulverización. Los agentes aromatizantes incluyen aromas naturales extraídos de plantas tales como frutas y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación agradable, tales como, pero no limitados a menta y salicilato de metilo. Los agentes humectantes incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y polioxietilenaureter. Los recubrimientos eméticos incluyen ácidos grasos, grasas, ceras, goma laca, goma laca amoniacal y ftalatos de acetato de celulosa. Los recubrimientos de película incluyen hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polietilenglicol 4000 y ftalato acetato de celulosa.

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

50 Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, ésta puede contener, además del material del tipo anterior, un portador líquido tal como un aceite graso. Además, las formas unitarias de dosificación pueden contener otros diversos materiales que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar y otros agentes entéricos. Los compuestos también se pueden administrar como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, espolvoreable, goma de mascar o similares. Un jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa como agente edulcorante y ciertos conservantes, tintes y colorantes y sabores.

60 La sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma también se pueden mezclar con otros materiales activos que no perjudiquen la acción deseada, o con materiales que complementan la acción deseada, tales como antiácidos, bloqueadores H₂, y diuréticos. El ingrediente activo es un derivado o compuesto farmacéuticamente aceptable del mismo como se describe en la presente memoria. Se pueden incluir concentraciones más altas, de hasta aproximadamente 98% en peso del ingrediente activo.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluidos en los comprimidos son aglutinantes, lubricantes, diluyentes,

agentes disgregantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, y agentes humectantes. Los comprimidos con recubrimiento entérico, debido al recubrimiento entérico, resisten la acción del ácido del estómago y se disuelven o disgregan en los intestinos neutros o alcalinos. Los comprimidos recubiertos con azúcar son comprimidos a los que se aplican diferentes capas de sustancias farmacéuticamente aceptables. Los comprimidos recubiertos con película son comprimidos que se han recubierto con un polímero u otro recubrimiento adecuado. Los comprimidos de varias capas son comprimidos elaborados por más de un ciclo de compresión utilizando las sustancias farmacéuticamente aceptables mencionadas previamente. Los agentes colorantes también se pueden utilizar en las formas de dosificación anteriores. Los agentes aromatizantes y edulcorantes se utilizan en comprimidos, comprimidos de varias capas recubiertos de azúcar y masticables. Los agentes aromatizantes y edulcorantes son especialmente útiles en la formación de comprimidos masticables y grageas.

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

Los elixires son preparaciones hidroalcohólicas claras, endulzadas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables utilizados en elixires incluyen disolventes. Los jarabes son disoluciones acuosas concentradas de un azúcar, por ejemplo, sacarosa, y pueden contener un conservante. Una emulsión es un sistema de dos fases en el que un líquido se dispersa en forma de pequeños glóbulos a través de otro líquido. Los portadores farmacéuticamente aceptables utilizados en las emulsiones son líquidos no acuosos, agentes emulsionantes y conservantes. Las suspensiones utilizan agentes de suspensión y conservantes farmacéuticamente aceptable. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en gránulos no efervescentes, para ser reconstituidos en una forma de dosificación oral líquida, incluyen diluyentes, edulcorantes y agentes humectantes. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en los gránulos efervescentes, para ser reconstituidos en una forma de dosificación oral líquida, incluyen ácidos orgánicos y una fuente de dióxido de carbono. Los agentes colorantes y aromatizantes se utilizan en todas las formas de dosificación anteriores.

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

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

Alternativamente, las formulaciones orales líquidas o semi-sólidas se pueden preparar disolviendo o dispersando la sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma en aceites vegetales, glicoles, triglicéridos, ésteres de propilenglicol (p. ej.: carbonato de propileno) y otros de tales portadores, y encapsulando estas soluciones o suspensiones en cápsulas de gelatina duras o blandas. Otras formulaciones útiles incluyen las expuestas en las Patentes de los Estados Unidos Núms. Re 28.819 y 4.358.603.

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

En todos los ejemplos, las formulaciones en comprimidos y cápsulas se pueden recubrir como es conocido por los expertos en la técnica con el fin de modificar o mantener la disolución del ingrediente activo. Así, por ejemplo, pueden estar recubiertos con un recubrimiento entérico digerible convencional, tal como de salicilato de fenilo, ceras y ftalato acetato de celulosa.

2. Inyectables, soluciones y emulsiones

La administración parenteral de la sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma, caracterizado generalmente por inyección, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa también se contempla en la presente memoria. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas a administrar también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, estabilizantes, potenciadores de la solubilidad, y otros agentes, tales como, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. La implantación de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de tal manera que se mantenga un nivel constante de dosificación (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 3.710.795) también se contempla en la presente memoria. El porcentaje de la sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma contenido en dichas composiciones parenterales depende de la naturaleza específica de los mismos, así como de la actividad del compuesto y las necesidades del sujeto.

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

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

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

Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa Isotónica, Inyección de Agua Estéril, Inyección de Dextrosa y Lactato de Ringer. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijados de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Se deben añadir agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a preparaciones parenterales envasadas en recipientes de dosis múltiples que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres de ácido metil y propil p-hidroxibenzoico, tiomersal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Los tampones incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen hidrocloreto de procaína. Los agentes de suspensión y dispersantes incluyen carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen Polisorbato 80 (Tween™ 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los vehículos farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para el ajuste de pH.

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

Las preparaciones parenterales de dosis unitaria se envasan en una ampolla, un vial o una jeringa con una aguja. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles, como es conocido y practicado en la técnica.

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

Los inyectables se diseñan para administración local y sistémica. Típicamente una dosificación terapéuticamente eficaz se formula para que contenga una concentración de al menos aproximadamente 0,1% p/p hasta aproximadamente 90% p/p o más, preferiblemente más de 1% p/p del compuesto activo para el tejido o tejidos tratados. El ingrediente activo, tal como una sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma, se puede administrar a la vez, o se puede dividir en un número de dosis más pequeñas para ser administradas a intervalos de tiempo. Se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento es una función del tejido que está siendo tratado y puede ser determinada empíricamente utilizando protocolos de ensayo conocidos o

mediante extrapolación a partir de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Cabe señalar que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la edad del individuo tratado. Se debe entender adicionalmente que para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración establecidos en la presente memoria son solamente ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance o la práctica de las formulaciones reivindicadas.

Los compuestos descritos en la presente memoria pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, p. ej., mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril libre de pirógenos u otros disolventes, antes de su uso. Por ejemplo, se describen en la presente memoria formulaciones parenterales que contienen una cantidad eficaz de sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma, tal como 500 a 500.000 Unidades, en una solución estabilizada o una forma liofilizada.

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

3. Polvos liofilizados

También se describen en la presente memoria polvos liofilizados que contienen sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma, que se puede reconstituir para su administración en forma de soluciones, emulsiones y otras mezclas. Estas formulaciones también pueden reconstituirse y formularse en forma de sólidos o geles.

El polvo estéril, liofilizado se prepara disolviendo una porción sólida o mezclando una alícuota de una solución que contiene una sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma en un disolvente adecuado. El disolvente puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituida, preparada a partir del polvo. Los excipientes que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa, lactosa u otro agente adecuado. El disolvente también puede contener un tampón, tal como citrato, fosfato de sodio o potásico u otro tampón conocido por los expertos en la técnica, típicamente, a un pH aproximadamente neutro. La posterior filtración en condiciones estériles de la solución seguida por la liofilización bajo condiciones convencionales conocidas por los expertos en la técnica proporciona la formulación liofilizada. Generalmente, la solución resultante de la filtración estéril se reparte en viales para liofilización. Cada vial puede contener una sola dosificación, tal como de 10 a 1000 mg o 100-500 mg, o múltiples dosificaciones del compuesto.

Brevemente, el polvo liofilizado se prepara disolviendo dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa, lactosa u otro agente adecuado, aproximadamente 1-20%, en un tampón adecuado, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro de tales tampones conocidos por los expertos en la técnica a un pH aproximadamente neutro. A continuación, se añade a la mezcla resultante una sal seleccionada, tal como, por ejemplo, la sal de sodio de la sHASEGP (aproximadamente 1 g de la sal por 10-100 gramos de la solución tampón, típicamente aproximadamente 1 g/30 g), por encima de la temperatura ambiente, tal como a aproximadamente 30-35°C, y se agita hasta que se disuelva. La mezcla resultante se diluye añadiendo más tampón, para disminuir la concentración resultante de la sal en aproximadamente 10-50%, típicamente aproximadamente 15-25%). La mezcla resultante se filtra de manera estéril o se trata para eliminar las partículas y asegurar la esterilidad, y se reparte en viales para liofilización. El polvo liofilizado puede almacenarse en condiciones apropiadas, tal como de aproximadamente 4°C a temperatura ambiente.

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

4. Administración tópica

Las mezclas tópicas se preparan como se describe para la administración local y sistémica. La administración tópica,

que es referida a veces en la técnica como administración percutánea, típicamente implica aplicaciones diseñadas para absorción a través de la piel, membranas mucosas u otras superficies del organismo (p. ej., aplicaciones aplicadas directamente sobre la piel, debajo de la lengua (sublingual), contra la mejilla (bucal), a los ojos, la nariz o los oídos, o los pulmones (inhalación)). La mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsiones o similares y se formulan como cremas, geles, pomadas, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, vendajes, parches dérmicos u otras formulaciones cualesquiera adecuadas para administración tópica.

Las composiciones de sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos pueden formularse como aerosoles para aplicación tópica, tal como mediante inhalación (véase, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núms. 4.044.126, 4.414.209, y 4.364.923, que describen aerosoles para el suministro de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma). Estas formulaciones para administración al tracto respiratorio pueden estar en forma de un aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, solo o combinado con un vehículo inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de la formulación tendrán típicamente diámetros de menos de 50 micras, tal como menos de 10 micras.

Para la administración por inhalación, las composiciones para uso en esta invención pueden ser suministradas en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde envases presurizados o nebulizadores, con el uso de un propelente adecuado, incluyendo, pero no limitado a, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono y otros gases adecuados. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina, para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

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

Por ejemplo, las formulaciones adecuadas para la aplicación tópica a la piel o al ojo generalmente se formulan en forma de un ungüento, crema, loción, pasta, gel, pulverización, aerosol y aceite. Los portadores que se pueden utilizar incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes y combinaciones de dos o más de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden contener adicionalmente ventajosamente de 0,05 a 15 por ciento en peso de espesantes, incluyendo, pero no limitados a, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), poli(alquilen-glicoles), (met)acrilatos de poli/hidroxi-alquilo, o poli (met)acrilamidas. Una formulación tópica se aplica con frecuencia mediante instilación o como una pomada en el saco conjuntival. También se puede utilizar para irrigación o lubricación del ojo, senos faciales y meato auditivo externo. Las formulaciones tópicas en estado líquido puede ser también presentes en una matriz polimérica tridimensional hidrófila en forma de una tira, lente de contacto, y similares a partir de la cual se liberan los componentes activos. También se puede inyectar en la cámara anterior del ojo, en el espacio episcleral, y otros lugares. Por ejemplo, se describe en la presente memoria una formulación para uso intraocular después de inyectar un compuesto viscoelástico que contiene una solución estabilizada de una cantidad eficaz de una sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma, tal como de 1 a 5000 Unidades de la glicoproteína soluble con 30 a 150.000 unidades/mg de actividad específica, en un volumen pequeño, tal como de 5 a 50 μ l. Como otro ejemplo, se describe en la presente memoria una formulación para uso intraocular para mejorar el suministro de uno o más agentes farmacológicos a los tejidos dentro del ojo después de la inyección por rutas de administración tales como una inyección sub-Tenon en el espacio episcleral que rodea la esclerótica, que comprende una solución estabilizada de una cantidad eficaz de una sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma, tal como de 50 a 5000 Unidades de la glicoproteína soluble con de 30 a 150.000 Unidades/mg de actividad específica, en un volumen tal como de 0,05 a 10 mL.

Estas soluciones, particularmente las destinadas a uso oftálmico, se pueden formular en forma de soluciones isotónicas al 0,01% - 10%, pH de aproximadamente 5-7, con sales apropiadas.

Co-aplicaciones con iontoforesis

En el caso de las administraciones tópicas y otras aplicaciones a los tejidos que son susceptibles de iontoforesis, el uso de una o más sHASEGP (potencialmente co-formuladas o co-administradas con otro agente farmacológico o de otro tipo) se puede combinar con técnicas iontoforéticas con el fin de impulsar adicionalmente la penetración de un tejido. En estos aspectos, la iontoforesis y las sHASEGP pueden funcionar cooperativamente ya que la iontoforesis puede promover el suministro de la sHASEGP a un tejido o en otro lugar dentro del organismo, y la sHASEGP así suministrada puede impulsar adicionalmente la penetración de la enzima, así como de otras moléculas co-formuladas o co-administradas presentes en el tejido, es decir, mediante la apertura de canales enzimáticamente que facilitan la

difusión, así como promoviendo el flujo de fluido masivo y por lo tanto el transporte convectivo de solutos tales como medicamentos.

5. Composiciones para otras rutas de administración

Otras rutas de administración, tales como aplicación tópica, los parches transdérmicos, y la administración rectal también se contemplan en la presente memoria.

Por ejemplo, las formas de dosificación farmacéuticas para administración rectal son supositorios rectales, cápsulas y comprimidos para efecto sistémico. Los supositorios rectales que se utilizan en la presente memoria significan cuerpos sólidos para la inserción en el recto que se funden o ablandan a temperatura corporal liberando uno o más ingredientes farmacológicamente o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en los supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para elevar el punto de fusión. Los ejemplos de las bases incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, Carbowax (polioxietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Se pueden utilizar combinaciones de las diversas bases. Los agentes para elevar el punto de fusión de los supositorios incluyen espermaceti y cera. Los supositorios rectales se pueden preparar mediante el método de compresión o mediante moldeo. El peso típico de un supositorio rectal es aproximadamente 2 a 3 gm.

Los comprimidos y cápsulas para administración rectal se fabrican utilizando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y mediante los mismos métodos que para las formulaciones para administración oral.

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

Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse a través de medios de liberación controlada y/o dispositivos de suministro (véanse por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Núms. 3.536.809; 3.598.123; 3.630.200; 3.845.770; 3.847.770; 3.916.899; 4.008.719; 4.687.610; 4.769.027; 5.059.595; 5.073.543; 5.120.548; 5.354.566; 5.591.767; 5.639.476; 5.674.533 y 5.733.566). Los compuestos activos o derivados farmacéuticamente aceptables se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del organismo, tales como formulaciones de liberación retardada o recubrimientos.

En un ejemplo de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, el agente terapéutico se administra localmente en un vehículo de suministro de liberación lenta, por ejemplo, encapsulado en un sistema de dispersión coloidal, o en cristales estabilizados con polímero. Los sistemas de dispersión coloidal útiles incluyen nanocápsulas, microesferas, cuentas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite-en-agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Por ejemplo, el sistema de dispersión coloidal puede ser un liposoma o una microesfera. Los liposomas son vesículas de membranas artificiales que son útiles como vehículos de suministro de liberación lenta cuando se inyectan o implantan. Algunos ejemplos de productos conjugados de lípido-polímero y liposomas se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.631.018. Otros ejemplos de vehículos de suministro de liberación lenta son la matrices de hidrogel biodegradables (Patente de Estados Unidos número 5041, 292), productos conjugados de polímeros dendríticos (Patente de Estados Unidos Núm. 5.714.166), y liposomas multivesiculares (DepoFoam™ Depotech, San Diego, CA) (Patentes de Estados Unidos Núms. 5.723.147 y 5.766.627). Un tipo de microesferas adecuado para encapsular agentes terapéuticos para inyección local (p. ej., en el tejido subdérmico) son las microesferas de poli (D,L)lactida, como describe D. Fletcher, en *Anesth. Analg.* 84: 90-94, (1997). Por ejemplo, una formulación de liberación lenta que contiene una cantidad eficaz de sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma, tal como de 1 a 5.000 unidades/mL, se puede emplear para diversos usos o para tratar diversas afecciones, incluyendo, pero no limitada a, formulaciones cosméticas, tratamiento de lesiones de la médula espinal y otros trastornos del sistema nervioso, ciertos trastornos oftálmicos, enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias, cánceres, y otras enfermedades crónicas, en las que el suministro prolongado de la sHASEGP es beneficioso.

Los niveles en sangre deseables pueden mantenerse mediante una infusión continua del agente activo según se determina mediante los niveles en plasma. Cabe señalar que el médico encargado sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia para disminuir la dosis debido a la toxicidad, o a disfunciones en médula ósea, el hígado o el riñón. A la inversa, el médico que atiende también sabría cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no fuera adecuada (evitando los efectos secundarios tóxicos).

La eficacia y/o toxicidad del polipéptido sHASEGP y/o su inhibidor o inhibidores, solo o combinado con otros

agentes, tales como agentes terapéuticamente eficaces, también puede evaluarse mediante los métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, O & Apos; Reilly, *Investigational New Drugs* 15: 5-13(1997)).

6. Artículos de fabricación

Los polipéptidos sHASEGP o dominios hialuronidasa humanos solubles de los mismos o composiciones que contienen cualquiera de los agentes anteriores pueden envasarse como artículos de fabricación que contienen material de envasado, un compuesto o derivado adecuado del mismo descrito en la presente memoria, que es eficaz para el tratamiento de enfermedades o trastornos contemplados en la presente memoria, dentro del material de envasado, y una etiqueta que indica que el compuesto o un derivado adecuado del mismo es para el tratamiento de las enfermedades o trastornos contemplados en la presente memoria. La etiqueta puede incluir opcionalmente los trastornos para los que se justifique la terapia.

Los artículos de fabricación descritos en la presente memoria contienen materiales de envasado. Los materiales de envasado para uso en productos de envases farmacéuticos son bien conocidos para los expertos en la técnica (véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núms. 5.323.907, 5,052,558 y 5,033,352). Los ejemplos de materiales de envasado farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, envases blíster, frascos, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, contenedores, jeringas, botellas, y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y modo de administración y el tratamiento deseados. Se contempla una amplia gama de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionados en la presente memoria, al igual que diversos tratamientos para cualquier trastorno en el que la infección por VHC está implicado como un mediador o contribuyente a los síntomas o causa.

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

K. Modelos animales

Los modelos transgénicos de origen animal y los animales, como roedores, incluyendo ratones y ratas, vacas, gallinas, cerdos, cabras, ovejas, monos, incluyendo gorilas y otros primates, se proporcionan en la presente memoria. En particular, se describen animales no humanos, transgénicos que contienen el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido sHASEGP o un animal transgénico en el que la expresión del polipéptido ha sido alterada, tal como mediante la sustitución o modificación de la región promotora u otra región reguladora del gen endógeno. Tal animal puede ser producido promoviendo la recombinación entre el ácido nucleico endógeno y un gen de sHASEGP exógeno que podría ser expresado en exceso o expresado erróneamente, tal como mediante expresión bajo un promotor fuerte, a través de un evento homólogo u otro evento de recombinación.

Los animales transgénicos se pueden producir mediante la introducción del ácido nucleico utilizando cualquier método de suministro conocido, incluyendo, pero no limitado a, microinyección, lipofección y otros modos de suministro de genes en una línea germinal o células somáticas, tal como una célula madre embrionaria no humana. Típicamente el ácido nucleico se introduce en una célula, tal como una célula madre embrionaria no humana (ES), seguido de la inyección de las células ES en un blastocisto, e implantación del blastocisto en una madre adoptiva, lo que está seguido por el nacimiento de un animal transgénico. Generalmente, la introducción de una molécula de ácido nucleico heteróloga en un cromosoma del animal se produce por una recombinación entre el ácido nucleico heterólogo que codifica sHASEGP y el ácido nucleico endógeno. El ácido nucleico heterólogo puede dirigirse a un cromosoma específico. En algunos casos, se pueden producir animales con genes desactivados "knockout". Tal animal puede ser producido inicialmente promoviendo la recombinación homóloga entre un gen del polipéptido sHASEGP en su cromosoma y un gen de polipéptido sHASEGP exógeno que se ha vuelto inactivo biológicamente (típicamente por medio de inserción de una secuencia heteróloga, p. ej., un gen de resistencia a antibióticos). En un ejemplo, esta recombinación homóloga se lleva a cabo mediante la transformación de células madre no humanas derivadas de embriones (ES) con un vector que contiene el gen de polipéptido sHASEGP inactivado mediante inserción, de tal manera que se produce la recombinación homóloga, seguido de la inyección de las células ES en un blastocisto, y la implantación del blastocisto en una madre adoptiva, seguido por el nacimiento del animal quimérico ("animal con genes desactivados") en el que se ha inactivado un gen del polipéptido sHASEGP (véase Capecchi, *Science* 244: 1288-1292 (1989)). El animal quimérico puede ser criados para producir animales

homocigóticos con genes desactivados, que a continuación se pueden utilizar para producir animales con genes desactivados adicionales. Los animales con genes desactivados incluyen, pero no se limitan a, ratones, hámsteres, ovejas, cerdos, ganado y otros mamíferos no humanos. Por ejemplo, se produce un ratón knockout. Los animales resultantes pueden servir como modelos de enfermedades específicas, tales como el cáncer, que muestran

5 disminución de la expresión de un polipéptido sHASEGP. Tales animales con genes desactivados pueden ser utilizados como modelos animales de dichas enfermedades, por ejemplo, para escrutar o someter a ensayo moléculas para la determinar la capacidad para tratar o prevenir tales enfermedades o trastornos.

También se pueden producir otros tipos de animales transgénicos, incluyendo los que expresan en exceso el polipéptido sHASEGP. Tales animales incluyen animales "knock-in" que son animales en los que el gen normal se sustituye por una variante, tal como un mutante, una forma de expresada en exceso, u otra forma. Por ejemplo, una especie, tal como gen endógeno de un roedor pueden ser sustituidos por el gen de otra especie, tal como de un ser humano. Los animales también pueden ser producidas por medio de recombinación no homóloga en otros sitios en un cromosoma; incluyendo animales que tienen una pluralidad de eventos de integración.

10

15

Después de la producción del animal transgénico de primera generación, se puede criar un animal quimérico para producir animales adicionales con polipéptidos sHASEGP expresados en exceso o expresados erróneamente. Tales animales incluyen, pero no se limitan a, ratones, hámsters, ovejas, cerdos, ganado y otros mamíferos no humanos. Los animales resultantes pueden servir como modelos de enfermedades específicas, tales como el cáncer, que son exposiciones expresión en exceso o expresión errónea de un polipéptido sHASEGP. Tales animales se pueden utilizar como modelos animales de dichas enfermedades, por ejemplo, para escrutar o para someter a ensayo moléculas o para determinar la capacidad para tratar o prevenir tales enfermedades o trastornos. En un ejemplo específico, se produce un ratón con el polipéptido sHASEGP expresado en exceso o expresado erróneamente.

20

Se incluyen los siguientes ejemplos solamente con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

25

L. Usos terapéuticos de sHASEGP

Las enzimas hialuronidasas de origen natural procedentes de mataderos han sido la fuente principal de preparaciones enzimáticas clínicas durante más de cuarenta años. Los testículos de Bóvidos y Óvidos son la principal fuente de este material. Estas preparaciones enzimáticas clínicas sin embargo están en estado muy bruto, comercializándose en preparaciones que oscilan de 0,5 a 5% de pureza en base a actividades específicas conocidas entre 30-100.000 Unidades/mg. Por lo tanto su falta de pureza combinada con su origen en mataderos, los hace inmunogénicos para los seres humanos y como fuente potencial de la enfermedad de Creutzfeld Jacob y otros patógenos bovinos y ovinos. Se sabe que se producen reacciones anafilácticas a las preparaciones de hialuronidasa bovina y ovina.

30

35

La hialuronidasa derivada de ganado o de bacterias ha sido utilizada en el tratamiento de enfermedades asociadas con ácido hialurónico en exceso y para mejorar la circulación de fluidos fisiológicos y/o agentes terapéuticos. Por ejemplo, la hialuronidasa bovina puede ser co-inyectada mediante anestesia en bloqueo peribulbar, retrobulbar y sub-Tenon para procedimientos quirúrgicos oftálmicos. Por otra parte, el aumento de las complicaciones quirúrgicas se producen en su ausencia (Brown SM et al. J Cataract Refract Surg. Septiembre de 1999; 25(9): 1245-9). La hialuronidasa bovina también se utiliza como un antídoto para la necrosis local a partir de la inyección paravenosa de sustancias necróticas tales como alcaloides de Vinka (Few, B. J. (1987) Amer. J. Matern. Child Nurs. 12, 23-26). La hialuronidasa de testículo bovino también es útil para el tratamiento de quistes ganglionares (Paul et al. J Hand Surg Abril de 1997; 22 (2): 219-21). La hialuronidasa también se puede utilizar para facilitar el suministro subcutáneo de líquidos en la hipodermoclastia (Berger EY, Am Geriatr Soc Marzo de 1984; 32 (3): 199-203). La hialuronidasa también se ha utilizado para reducir la presión intraocular en los ojos de pacientes con glaucoma y pacientes con cataratas que reciben los productos viscoelásticos (Patente de Estados Unidos. Núm. 4.820.516 expedida el 11 de Abril de 1989).

40

45

50

Las hialuronidasas derivadas de ganado o de bacterias también se han utilizado como un "agente de propagación" para mejorar la actividad de los agentes quimioterapéuticos y/o la accesibilidad de los tumores a los agentes quimioterápicos (Schuller et al., 1991, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 32:173, resumen núm. 1034; Czejka et al., 1990, Pharmazie 45:H.9). La quimioterapia combinada con hialuronidasa es eficaz en el tratamiento de una variedad de cánceres incluyendo el cáncer de vejiga urinaria (Horn et al., 1985, J. Surg. Oncol. 28:304-307), carcinoma de células escamosas (Kohn et al., 94, J. Cancer Res. Oncol. 120:293-297), cáncer de mama (Beckenlehner et al., 1992, J. Cancer Res. Oncol. 118:591-596), y el cáncer gastrointestinal (Scheithauer et al., 1988, Anticancer. Res. 8:391-396). La hialuronidasa es eficaz como único agente terapéutico en el tratamiento del cáncer de cerebro (gliomas) (Solicitud PCT publicada Núm. WO88/02261, publicada el 07 de Abril 1988). La administración de hialuronidasa también induce sensibilidad de tumores anteriormente resistentes a la quimioterapia del páncreas, estómago, colon, ovarios y mama (Baumgartner et al., 1988, Reg. Cáncer Treat. 1:55 a 58; Zanker et al., 1986, Proc. Amer. Assoc. Cancer. Res. 27:390). Por desgracia, los contaminantes y la naturaleza no humana de tales

55

60

hialuronidasas dan lugar a reacciones anafilácticas.

Además de sus efectos anticancerosos indirectos, la hialuronidasa derivada de ganado tiene efectos anticancerígenos directos. La hialuronidasa impide el crecimiento de los tumores trasplantados a ratones (DeMaeyer et al., 1992, *Int. J. Cancer* 51:657-660) e inhibe la formación de tumores tras la exposición a carcinógenos (Pawlowski et al., 1979, *Int. J. Cancer* 23:105-109; Haberman et al., 1981, *Proceedings of the 17th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology*, Washington, D.C., 22:105, resumen núm. 415).

Dado el valor de las hialuronidasas derivadas de ganado como agente terapéutico, particularmente en quimioterapia junto con agentes quimioterápicos convencionales o como agente quimioterapéutico por sí mismo, existe una necesidad en la técnica de preparaciones sustancialmente puras de hialuronidasa de origen humano. También existe una necesidad de métodos eficientes y rentables para preparar hialuronidasa para proporcionar cantidades comercialmente significativas de la enzima. La presente invención aborda estos problemas.

El ácido hialurónico es un componente esencial de la matriz extracelular. El ácido hialurónico se encuentra en el tejido conectivo de mamíferos y es el principal constituyente del vítreo del ojo. En el tejido conectivo, el agua de hidratación asociada con el ácido hialurónico genera espacios entre tejidos, creando así un ambiente propicio para el movimiento y la proliferación celulares. El ácido hialurónico desempeña un papel clave en los fenómenos biológicos asociados con la motilidad celular incluyendo el desarrollo rápido, la regeneración, la reparación, la embriogénesis, el desarrollo embriológico, la curación de heridas, la angiogénesis y la tumorigénesis (Toole, 1991 *Cell Biol. Extracell. Matrix*, Hay (ed), Plenum Press, Nueva York, 1384-1386; Bertrand et al., 1992, *Int. J. Cancer* 52:1-6; Knudson et al., 1993, *FASEB J.* 7:1233-1.241). Además, los niveles de ácido hialurónico se correlacionan con la agresividad tumoral (Ozello et al., 1960, *Cancer Res.* 20: 600-604; Takeuchi et al., 1976, *Cancer Res.* 36: 2133-2139; Kimata et al., 1983, *Cancer Res.* 43: 1347-1354).

Después de una lesión de la médula espinal, las cicatrices gliales son producidas por los astrocitos y contienen proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG). Los CSPG desempeñan un papel crucial en la inhibición del crecimiento de los axones (Levine, 1994; Powell et al., 1997). Por ejemplo, durante el desarrollo fetal, CSPG repelen axones e inhiben la adhesión celular neural. Los CSPG también desempeñan un papel importante en la formación de límites (Snow et al., 1990, 1992; Powell y Geller, 1999). Además, la expresión de CSPG aumenta después de una lesión del SNC (Mckeon et al., 1991; Davies et al., 1997).

Los estudios indican que los efectos inhibidores de los CSPG se deben principalmente a la cadena de azúcar del glicosaminoglicano (GAG) del sulfato de condroitina (SC) (Snow et al., 1990; Cole y McCable, 1991; Geisert y Bidanset, 1993). Esto es apoyado por el hallazgo de que la administración de condroitinasa bacteriana, de hecho, promueve la regeneración de axones cuando se administra por vía intratecal. Por otra parte, los experimentos electrofisiológicos determinaron que los axones CTS regenerados establecieron conexiones funcionales (Bradbury, et al. 2002). Además de sus efectos inhibidores directos, los CSPG también podrían interactuar con moléculas de adherencia celular o factores neurotróficos para influir en el crecimiento de las neuritas (Roberts et al., 1988; Ruoslahti y Yamaguchi, 1991; Milev et al., 1994). Las hialuronidasas de mamífero recombinantes son útiles para invertir la inhibición de los CSPG en la cicatriz glial y para promover la regeneración axonal después de una lesión.

La cantidad de sHASEGP necesaria para degradar suficientemente los CSPG en la cicatriz glial variará. En algunos casos será necesaria la administración repetida de 10-5000 unidades de sHASEGP por medio de suministro intratecal para eliminar los CSPG de la cicatriz. En otros casos, se puede preferir la liberación sostenida de sHASEGP a través del uso de una formulación de liberación lenta. Alternativamente, la administración de vectores de terapia génica que codifican sHASEGP puede ser eficaz para mejorar el aclaramiento de los CSPG.

Las sHASEGP también pueden ser utilizadas para el tratamiento de discos herniados en un procedimiento conocido como quimionucleólisis. La condroitinasa ABC, y la enzima que escinde sustratos similares a sHASEGP pueden inducir la reducción de la presión intradiscal en la columna vertebral lumbar. (Sasaki et al., 2001, Ishikawa et al., 1999). Existen tres tipos de lesiones de discos. Un disco protuberante es uno que está intacto pero abultado. En un disco extruido, la envoltura fibrosa ha roto y el NP ha rebosado, pero todavía está conectado al disco. En un disco secuestrado, un fragmento del NP se ha soltado desde el disco y queda libre en el canal espinal. La quimionucleólisis es eficaz en discos protuberantes y extruidos, pero no en lesiones de disco secuestrado. En los Estados Unidos, la quimionucleólisis está aprobada solo para su uso en la columna lumbar (inferior). En otros países, también ha sido utilizada con éxito para tratar hernias cervicales (columna vertebral superior). La quimionucleólisis es, pues, una alternativa a la cirugía conservadora de disco cuando es preferible reducir la presión del disco.

La composición exacta y la estructura de la cadena o cadenas de hidratos de carbono en una glicoproteína pueden influir directamente en su vida útil de suero, ya que las células en el hígado y el sistema reticuloendotelial pueden unirse e internalizar glicoproteínas circulantes con carbohidratos específicos. Los hepatocitos tienen receptores en sus superficies que reconocen cadenas de oligosacáridos con residuos de Gal terminales (es decir, en el extremo o

los extremos más externos de glicanos en relación con el polipéptido), los macrófagos contienen receptores para residuos de Man o GlcNAc, y los hepatocitos y linfocitos tienen receptores para residuos de fucosa expuestos. Sin embargo, no se han encontrado receptores específicos de ácido siálico. Aunque algo dependiente de la disposición espacial de los oligosacáridos, como norma general, cuanto mayor el número de residuos de azúcar expuestos reconocidos por receptores de superficie celular en el hígado y el sistema reticuloendotelial, más rápidamente se aclarará una glicoproteína del suero. Debido a la ausencia de receptores específicos de ácido siálico, sin embargo, los oligosacáridos con todas las ramificaciones terminadas, o "protegidas terminalmente", con ácido siálico no promoverán el aclaramiento de la proteína a la que están anclados.

La presencia y naturaleza de la cadena o cadenas de oligosacáridos en una glicoproteína también pueden afectar a propiedades bioquímicas importantes además de su reconocimiento por receptores específicos de azúcar en las células del hígado y retículo-endotelial. La eliminación del carbohidrato de una glicoproteína disminuirá usualmente su solubilidad y también puede aumentar su susceptibilidad a la degradación proteolítica por medio de desestabilización del patrón de plegamiento correcto del polipéptido y/o desenmascaramiento de sitios sensibles a la proteasa. Por razones similares, el estado de glicosilación de una proteína puede afectar a su reconocimiento por el sistema inmunológico.

Las sHASEGP se pueden utilizar para eliminar las células del cumulus que rodean un huevo antes de la crioconservación y otras técnicas de fertilización in vitro tales como una inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). La hialuronidasa se puede añadir a los ovocitos cosechados entre 10-200 U/mL en soluciones salinas tamponadas. Los ovocitos se separan de las células del cumulus liberadas por aspiración y se lavan a través de varios lavados con medios que carecen de hialuronidasa. Los huevos pueden ser procesados para técnicas de crioconservación o IVF.

Las sHASEGP también son útiles para la penetración más eficaz de agentes quimioterapéuticos en tumores sólidos. Las sHASEGP pueden inyectarse por vía intratumoral con agentes anticancerosos o intravenosamente para los cánceres diseminados o tumores de difícil acceso. El agente anticanceroso puede ser un agente quimioterápico, un anticuerpo, un péptido, o un vector, virus o ADN de terapia génica. Además, las sHASEGP se pueden utilizar para reclutar células tumorales en la reserva de ciclación para la sensibilización en los tumores previamente quimiorrefractarios que han adquirido resistencia a los medicamentos en múltiples cultivos, St Croix et al. *Cáncer Lett* 1998 11 de Septiembre; 131(1): 35-44). Las sHASEGP también son útiles para mejorar el suministro de productos biológicos tales como anticuerpos monoclonales, citoquinas y otros fármacos a tumores que acumulan glicosaminoglicanos. Muchos tumores eliminan los genes que intervienen en el catabolismo de los glicosaminoglicanos de manera que la acumulación localizada puede evitar que los agentes antineoplásicos y el sistema inmunológico alcancen la masa tumoral.

Las sHASEGP también se puede utilizar para aumentar la sensibilidad de tumores que son resistentes a la quimioterapia convencional. En una realización, la sHASEGP se administra a un paciente que tiene un tumor asociado con un defecto LuCa-1 en una cantidad eficaz para aumentar la difusión alrededor del sitio del tumor (p. ej., para aumentar la circulación de factores quimioterápicos (p. ej., para facilitar la circulación y/o concentraciones de agentes quimioterápicos en y alrededor del sitio del tumor), inhibir la motilidad de la célula o células tumorales (p. ej., mediante la degradación de HA) y/o para reducir el umbral de apoptosis de las células tumorales (es decir, llevar la célula o células tumorales a un estado de anoikis), un estado que vuelve la célula o células tumorales más susceptibles a la acción de agentes quimioterapéuticos u otros agentes que pueden facilitar la muerte celular, preferiblemente facilitar preferentemente la muerte celular programada de células en anoikis. Se entiende que los agentes quimioterápicos según se utiliza en la presente memoria, abarcan todas las moléculas, sintéticas (p. ej., cisplatino) así como de origen natural (p. ej., factor de necrosis tumoral IF)), que facilitan la inhibición del crecimiento de células tumorales, y preferiblemente facilitan, más preferiblemente facilitan preferentemente la muerte de células tumorales.

Es de particular interés el uso de sHASEGP para el tratamiento de cánceres metastásicos y no metastásicos, particularmente cánceres metastásicos, con actividad hialuronidasa reducida a indetectable con respecto a células no cancerosas (normales). La sHASEGP se puede utilizar como un agente quimioterapéutico (solo o combinado con otros agentes quimioterápicos) en el tratamiento de cualquiera de una variedad de cánceres, particularmente tumores invasivos. Por ejemplo, la sHASEGP se puede utilizar en el tratamiento del carcinoma de células pequeñas de pulmón, carcinoma de pulmón de células escamosas, así como cánceres de mama, ovarios, cabeza y cuello, o cualquier otro cáncer asociado con niveles deprimidos de hialuronidasa o con un gen LuCa-1 (hpHAsa) defectuoso (p. ej., un gen LuCa-1 que no proporciona la expresión de los niveles de hpHAsa adecuados o codifica una hpHAsa defectuosa que no proporciona un nivel adecuado de actividad hialuronidasa) u otro defecto asociado con una disminución del catabolismo de ácido hialurónico. La sHASEGP es preferible para el tratamiento de tumores malignos asociados con la deficiencia de catabolismo de HA, ya que no requiere participación celular para que se produzca la degradación.

La dosificación específica apropiada para la administración puede ser determinada fácilmente por un experto normal

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

En un ejemplo, una sHASEGP se formula en una solución salina 0,15 M que contiene sHASEGP a una concentración de aproximadamente 150.000 TRU/cc. La formulación se inyecta por vía intravenosa a 15.000 TRU/kg de peso corporal del paciente. Alternativamente, la formulación enzimática también puede inyectarse por vía subcutánea para permitir que la hialuronidasa perfunda alrededor del sitio del tumor. En un ejemplo preferido, la sHASEGP se inyecta peritumoralmente o en la masa tumoral. En otro ejemplo preferido, la sHASEGP se formula como un liposoma y se suministra mediante inyección por vía intravenosa o cerca del sitio de las células cancerosas asociadas con un defecto en el gen LuCa-1 (hpHAsa). La inyección de sHASEGP por vía intravenosa da como resultado sHASEGP en el sitio del tumor. Por otra parte, la sHASEGP Super Sialada es preferiblemente para la administración parenteral ya que los ácidos siálicos terminales en la sHASEGP impiden el aclaramiento de la enzima de la circulación por el sistema reticuloendotelial. Las comparaciones de la sHASEGP súper sialada con hialuronidasas bovinas y ovinas no sialadas revelan que se logra una farmacocinética sustancialmente más favorable.

Facilitación de la terapia génica

La eficacia de la mayoría de los vehículos de suministro de genes *in vivo* no se corresponde con la eficacia encontrada *in vitro*. Los glicosaminoglicanos pueden obstaculizar la transferencia y difusión de ADN y vectores virales a muchos tipos de células. Los niveles de dicho material de matriz extracelular pueden obstaculizar el proceso considerablemente. Dubensky et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA Dic. de 1984; 81 (23): 7529-33.) demostraron que la hialuronidasa cuando se combina con colagenasa podría facilitar la transducción de ADN *in vivo*. Se ha demostrado que el virus adenoasociado también es susceptible de terapia génica mediada por hialuronidasa Favre et al., (Gene Ther Agosto de 2000; 7(16):1417-1420).

Los autores de la presente invención determinado en la presente memoria que se abren con sHASEGP canales de tamaño definido en la matriz extracelular. Estos poros generalmente no aumentan la difusión de sustancias mayores de aproximadamente de 200-500 nm de diámetro. Sin embargo, moléculas más pequeñas tales como retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados y complejos de ADN son susceptibles a difusión mediada por sHASEGP. El hecho de que las sHASEGP generalmente actúen abriendo canales que son sustancialmente lo suficientemente grandes como para permitir el movimiento de la mayoría de los agentes terapéuticos y otros agentes farmacológicos de interés (incluyendo macromoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos, así como complejos macromoleculares tales como vectores de terapia génica) y sin embargo no son generalmente tan grandes como para promover el desplazamiento y el movimiento de las células, proporciona por ejemplo aplicaciones particularmente ventajosas en el tratamiento, prevención y/o el diagnóstico de una variedad de enfermedades.

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

Alternativamente, el ácido nucleico de interés y una sHASEGP se pueden utilizar simultáneamente o de forma consecutiva o de manera que se escalonen en el tiempo. Simultáneamente se refiere a una co-administración. En este caso, estos dos componentes esenciales se pueden mezclar para formar una composición antes de ser administrada, o se pueden administrar al mismo tiempo a la célula o al organismo anfitrión. También es posible administrarlos consecutivamente, es decir uno después del otro, independientemente de qué componente del producto combinado de acuerdo con la invención se administre primero. Por último, es posible usar un modo de administración que se escalona en el tiempo o es intermitente y que se detiene y se reinicia a intervalos que pueden o no puede ser regulares. Se señala que las vías y sitios de administración de los dos componentes pueden ser diferentes. De acuerdo con una realización particularmente preferida, la sHASEGP se administra antes del ácido nucleico, siendo preferiblemente similar la ruta de administración de los dos componentes. El intervalo de tiempo entre las inyecciones no es crítico y puede ser definido por el experto en la técnica. Es posible recomendar un intervalo de 10 min a partir de 72 h, ventajosamente de desde 30 min a 48 h, preferiblemente de 1 a 24 h y, muy preferiblemente, de 1 a 6 h.

Además, el producto combinado de acuerdo con la invención también se puede combinar con una o más moléculas que están destinadas a mejorar la administración del ácido nucleico. Las moléculas pueden ser moléculas que tienen un efecto protector sobre el ácido nucleico (protección respecto a la degradación en la célula), que mejoran su penetración o su expresión en la célula anfitriona (péptido fusogénico, señal de localización nuclear, etc.), que permiten que un tipo de célula concreto, sea dirigido (ligando o anticuerpo que reconoce una proteína de la superficie celular, etc.), o que prolongan el efecto terapéutico (agente inmunosupresor, etc.). El producto combinado también se puede combinar con agentes que faciliten la transfección (proteínas, etc.).

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

Hipodermocclisis

La hipodermocclisis, la infusión subcutánea de fluidos, es una técnica de hidratación útil y fácil adecuada para pacientes adultos ligera a moderadamente deshidratados, especialmente los ancianos. El método se considera seguro y no plantea ningún tipo de complicaciones graves. El efecto adverso más frecuente es un edema subcutáneo leve que puede ser tratado mediante masaje local o diuréticos sistémicos. Aproximadamente se proporcionan 3 L en un período de 24 horas en dos sitios separados. Los sitios de infusión más comunes son el pecho, el abdomen, los muslos y los brazos. La solución preferida es solución salina normal, pero también se pueden utilizar otras soluciones, como solución salina al medio normal, glucosa con solución salina o 5 por ciento de glucosa. Se puede añadir cloruro de potasio a la bolsa de solución si fuera necesario. Además, se pueden suministrar otros fármacos a través de rutas similares. Se puede añadir sHASEGP humana para mejorar la absorción de líquido y aumentar la tasa general de la administración. La sHASEGP humana es preferible para hipodermocclisis repetida sobre las enzimas derivadas de matadero ya que no es probable que sea inmunogénica como la enzima bovina se sabe que lo es. Puede ser administrada en el hogar por miembros de la familia o por una enfermera; la técnica debe ser familiar para todos los médicos de familia.

En pacientes ambulatorios, los sitios de hipodermocclisis incluyen el abdomen, el tórax superior, por encima de la mama, sobre un espacio intercostal y el área escapular. En pacientes postrados en cama, los sitios preferidos son los muslos, el abdomen y la cara externa del brazo superior. Después de uno a cuatro días, la aguja y los tubos se deben cambiar, aunque los equipos de infusión se hayan quedado en el lugar durante períodos mucho más largos sin complicaciones. También se puede proporcionar administración de bolos de 500 mL a lo largo de más de una o dos horas, tres veces al día, proporcionando 150 U de sHASEGP en el sitio subcutáneo antes de la primera infusión matutina.

Facilitación de inyecciones terapéuticas.

Muchas moléculas inyectadas por vía percutánea (p. ej., mediante el uso de una aguja u otro dispositivo que penetra la piel y se utiliza para depositar las moléculas en una capa sub-dérmica) alcanzan la circulación lentamente o con muy baja eficacia. Hay varios factores que regulan la farmacocinética y la farmacodinámica de las moléculas inyectadas por vía subcutánea (SC) o intramuscular (IM). Generalmente, las moléculas de mayor tamaño alcanzan la circulación más lentamente y menos eficazmente sin transporte activo a la circulación. La biodisponibilidad subcutánea se determina calculando la razón del área bajo las curvas para la administración SC versus intravenosa ($AUC_{SC}/AUC_{intravenosa}$). Un segundo factor es la carga y afinidad por moléculas de la matriz que pueden desempeñar un papel en el secuestro de moléculas por vía subcutánea. Si se degradan estos materiales localmente nunca pueden alcanzar sus dianas deseadas y de ese modo se demuestra un descenso de la biodisponibilidad sistémica global para los órganos diana.

Las proteínas grandes normalmente se administran por vía intravenosa de manera que el medicamento está directamente disponible en el torrente sanguíneo. Sin embargo, sería ventajoso que un medicamento pudiera

administrarse por vía subcutánea, intramuscular o intradérmica (ID) ya que estas formas de administración son mucho más fáciles de manejar para el paciente. Especialmente, si el medicamento debe tomarse regularmente durante toda la vida y el tratamiento se debe empezar temprano, ya que el paciente es un niño. Sin embargo, un medicamento con una molécula lábil muy grande, tal como el factor VIII de la coagulación de 170 y 300 kDa, tiene normalmente una biodisponibilidad muy baja si se administra por vía subcutánea, intramuscular o intradérmica, puesto que la captación no es suficiente y la degradación es severa.

Además de la necesidad de aumentar la biodisponibilidad de muchos productos biológicos administrados por vía subcutánea, la farmacocinética más rápida también es críticamente importante en casos de medicina de emergencia. El tiempo requerido para alcanzar el acceso intravenoso en muchos pacientes puede impedir que un medicamento de acción rápida por otra parte sea utilizado cuando se administra sistémicamente. En algunos casos el fracaso para alcanzar el acceso intravenoso está seguido a continuación por inyección subcutánea, lo que conduce a un retraso adicional en la llegada a los órganos diana. Por lo tanto, la disponibilidad más rápida de fármacos subcutáneos sería beneficiosa como una primera línea de tratamiento en lugar de arriesgarse al tiempo necesario para alcanzar el acceso intravenoso. Los ejemplos de moléculas que pueden suministrarse por vía subcutánea así como por vía intravenosa incluyen epinefrina, atropina, narcán, lignocaína y dextrosa.

Un beneficio adicional de la invención reside en la capacidad de suministrar volúmenes equivalentes o mayores de soluciones ID, SC o IM sin el dolor y la morbilidad asociadas con la presión y el volumen de la solución en el sitio de inyección.

A modo de ilustración (y sin limitación), existe una serie de productos biológicos que pueden ser mejorados mediante la combinación con una o más sHASEGP (p. ej., por co-formulación o co-administración de sHASEGP antes, coincidente con o después de la administración del compuesto biológico), incluyendo por ejemplo: Abciximab (p. ej. REOPRO™), Adalimumab (p. ej. HUMIRA™), Agalsidasas beta (p. ej. FABRAZYME™), Aldesleuquinas (p. ej., PROLEUKIN™), Alefacept (p. ej. AMEVIVE™), Alemtuzumab (p. ej., CAMPATH™), Alteplásas (p. e., ACTIVASE™), Alteplásas (p. ej. CATHFO ACTIVASE™), Anakinras (p. ej. KINERET™), Arcitumomab (p. ej., CEA-Scan™), Asparraginasas (p. ej. ELSPAR™), Basiliximab (p. ej. SIMULECT™), Becaplerminas (p. ej. REGRANEX™), Bevacizumab (p. ej. AVASTIN™), Toxina Botulínica Tipo A (p. ej. BOTOX™), Toxina Botulínica Tipo B (p. ej. MYOBLOC™), Pendétidos Capromab (p. ej. PROSTASCINT™), Cetuximab B (p. ej. ERBITUX™), Daclizumab (p. ej. ZENAPAX™), Darbepoetina alfa (p. ej. ARANESP™), Denileuquina diftitox (p. ej. ONTAK™), Dornasas alfa (p. ej. PULMOZYME™), Drotrecoginas alfa (p. ej. XIGRIS™), Efalizumab (p. ej. RAPTIVA™), Epoetinas alfa (p. ej. EPOGEN™), Etanercept (p. ej. ENBREL™), Filgrastim (p. ej. NEUPOGEN™), Ibritumomab/Tiuxetano (p. ej. ZEVALIN™), Imciromab Pentetato (p. ej. MYOSCINT™), Infliximab (p. ej., REMICADE™), interferón alfa-2a (p. ej., ROFERON-A™), Interferón alfacon-1 (p. ej. INFERGEN™), Interferón alfa-N3S (p. ej., ALFERON N™), Interferón beta-1a (p. ej. AVONEX™, BETASERON™), Interferón beta-la (p. ej. REBIF™), Interferón gamma-1b (p. ej. ACTIMMUNE™), Laronidasas (p. ej. ALDURAZYME™), Nofetumomab (p. ej. VERLUMA™), Omalizumab (p. ej. XOLAIR™), Oprelvequinas (p. ej. NEUMEGA™), Palivizumab (p. ej. SYNAGIS™), Pegfilgrastim (p. ej. NEULASTA™), Peg-interferón alfa-2a (p. ej., PEGASYS™), Peg-interferón alfa-2b (p. ej., PEG-INTRON™), Rasburicasas (p. ej. ELITEK™), Reteplásas (p. ej. RETAVASE™), Rituximab (p. ej. RITUXAN™), Tenecteplásas (p. ej. TNKase™), Tositumomab y yodo I-131 (p. ej., BEXXAR™), Trastuzumab (p. ej., HERCEPTIN™), Uroquinasas (p. ej. ABBOKINASE™).

Hemorragia vítrea

En un esfuerzo por minimizar el potencial para causar un desprendimiento o desgarro de la retina durante la realización de la vitrectomía, se ha propuesto previamente en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.292.509 (Hageman), inyectar ciertas enzimas glicosaminoglicanasas sin proteasa en el cuerpo vítreo, para provocar que el cuerpo vítreo se desacople o "desinserte" de la retina, antes de la eliminación del cuerpo vítreo. Tal desinserción o desacoplamiento del cuerpo vítreo pretende reducir al mínimo la probabilidad de que se produzcan más desgarros o desprendimiento de retina a medida que se retira el cuerpo vítreo. Los ejemplos de las enzimas glicosaminoglicanasas sin proteasa específicas que se pueden utilizar para llevar a cabo esta pretendida desinserción vítrea incluyen: condroitinasa ABC, condroitinasa AC, condroitinasa B, condroitina 4-sulfatasa, condroitín 6-sulfatasa, hialuronidasa y beta-glucuronidasa.

Aunque la enzima hialuronidasa era conocida por ser utilizable para varias aplicaciones oftálmicas, incluida la aplicación adjunta de vitrectomía descrita en el Patente de Estados Unidos Núm. 5.292.509 (Hageman), los estudios publicados han indicado que la propia enzima hialuronidasa puede ser tóxica para la retina y/u otras estructuras anatómicas del ojo. Véase, The Safety of Intravitreal Hyaluronidase; Gottleib, J. L.; Antoszyk, A. N., Hatchell, D. L. y Soloupis, P., Invest Ophthalmol Vis Sci 31:11, 2345-52 (1990). Por otra parte, el uso de las preparaciones de matadero impuras de hialuronidasa puede causar uveítis o inflamación del ojo. El uso de sHASEGP humana es por lo tanto preferible por su aumento de potencia, pureza y ausencia de origen animal que puede dar lugar a reacciones inmunogénicas y neutralización mediada por anticuerpos después de la administración repetida. En otro ejemplo, puede inyectarse en el ojo una forma pegilada de una sHASEGP. Tal sHASEGP pegilada no se elimina del vítreo de

forma tan rápida y mantiene su actividad en el humor vítreo durante un período de tiempo más largo.

La toxicidad oftálmica de algunas preparaciones de hialuronidasa ha sido confirmada por otros investigadores, que han propuesto que las preparaciones de tales hialuronidasa puedan ser utilizadas como un irritante tóxico para causar una neovascularización inducida experimentalmente del ojo, en modelos de toxicidad animal, (véase An Experimental Model of Preretinal Neovascularization in the Rabbit; Antoszyk, A. N., Gottlieb, J. L., Casey, R. C., Hatchell, D. L. y Machemer, R., Invest Ophthalmol Vis Sci 32:1, 46-51 (1991). El uso de una sHASEGP altamente purificada desprovista de contaminantes basados en mercurio y derivados de ganado o bacterianos es preferible para los procedimientos intraoculares. Por otra parte, una sHASEGP humana recombinante es preferible a las preparaciones derivadas de mataderos tanto por la falta de pureza de patógenos bovinos y un menor riesgo de inmunogenicidad. Lo más preferiblemente, se contempla una sHASEGP pegilada.

Por tanto, se describe un método enzimático que utiliza una sHASEGP humana para el tratamiento de trastornos oftálmicos del ojo de mamíferos. En una realización de la invención, dicha sHASEGP está pegilada para prolongar su permanencia dentro del humor vítreo e impedir la absorción localizada. La prevención de la neovascularización, y el aumento de la tasa de aclaramiento del humor vítreo de materiales tóxicos a la retina, se llevan a cabo mediante la administración de una cantidad de hialuronidasa eficaz para licuar el humor vítreo del ojo tratado sin causar daños tóxicos en el ojo. La licuefacción del humor vítreo aumenta la tasa de cambio de líquido de la cámara vítrea. Este aumento en el intercambio elimina esos materiales y condiciones cuya presencia causa daños oftalmológicos y de la retina.

Usos cosméticos de la sHASEGP

Se sabe que la hialuronidasa tiene el efecto de despolimerizar las cadenas largas de mucopolisacáridos de la sustancia fundamental, responsable de la retención de agua unida y de la ralentización, por compresión capilar, de la difusión de líquidos orgánicos que eliminan desechos metabólicos. Tal retención de agua y desechos asociados con sobrecarga de lipocitos, constituye el clásico edema de "piel de cerdo" o edema de "piel de naranja". Por tanto, esta despolimerización cortará las cadenas largas de mucopolisacáridos a cadenas más cortas, dando como consecuencia la eliminación del agua unida, de desechos, la restauración de la circulación venosa y linfática y la desaparición de edema local.

El uso de sHASEGP a modo de administración subcutánea se prefiere por lo tanto para la eliminación de glicosaminoglicanos implicados en la acumulación de la llamada celulitis y para promover el flujo linfático. Se prefiere la sHASEGP humana para el tratamiento de la celulitis ya que es susceptible de eliminación de dichos glicosaminoglicanos sin los componentes inflamatorios de proteínas derivadas de matadero y tiene alta pureza y no es probable que sea inmunogénica. La sHASEGP se puede administrar a través de inyecciones subcutáneas repetidas, a través de la 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 prevenir su regreso.

Trasplante de órganos

El hialuronano tiene varios efectos biológicos, que están, en parte, relacionados con su tamaño molecular (West, D.C., Kumar, S. Exp. Cell. Res. 183, 179-196, 1989). El contenido de hialuronano en un órgano aumenta en diferentes condiciones de inflamación de ese órgano. Por lo tanto, se ha demostrado un aumento de la concentración de hialuronano en el tejido de diferentes órganos caracterizados por una lesión inflamatoria inmunológica tal como la alveolitis (Nettelblatt O et al., Am Rev Resp Dis 1989; 139: 759-762) y el infarto de miocardio (Waldenstrom et al., J Clin Invest 1991; 88 (5): 1622-1628). Otros ejemplos son el rechazo de aloinjerto después de un trasplante renal (Ha'llgren et al., J Exp Med 1990a; 171: 2063-2076; Wells et al., Transplantation 1990; 50: 240-243), de intestino delgado (Wallander et al., Transplant Int 1,993; 6: 133-137) o cardiaco (Hallgren et al., J Clin Invest 1990b; 85: 668-673); o una inflamación del miocardio de origen viral (Waldenstrdm et al., Eur J Clin Invest 1993; 23: 277-282).

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

La sHASEGP se puede 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 de la función del órgano. Se pueden administrar dosis que oscilan de 500-10.000 Unidades/kg para reducir la presión intersticial como tal.

Acumulaciones patológicas de glicosaminoglicanos en el cerebro

Los niveles de hialuronano son elevados en diversas afecciones patológicas cerebroespinales. Los niveles de hialuronano cerebroespinal son normalmente inferiores a 200 ug/L en adultos (Laurent et al., Acta Neurol Scand 1996 septiembre; 94(3):194-206). Estos niveles pueden elevarse a más de 8.000 ug/L en enfermedades tales como meningitis, estenosis espinal, traumatismo craneal e infarto cerebral. Por lo tanto la administración de sHASEGP (p. ej., mediante el suministro intratecal o inyección sistémica de una sHASEGP, sHASEGP PEGilada o sHASEGP super-sialada) puede utilizarse para degradar niveles críticamente elevados de sustrato.

La carencia de vasos linfáticos eficaces en el cerebro también puede conducir a edema potencialmente mortal después de un traumatismo craneal. La acumulación de hialuronano es un resultado del aumento de la síntesis por HA sintasas, y disminución de la degradación. La acumulación de hialuronano 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 sHASEGP humana a un paciente que sufre de traumatismo craneal puede eliminar de ese modo la acumulación de hialuronano tisular y el agua asociada con el mismo. La sHASEGP humana puede administrarse por vía intratecal a través de una derivación o, alternativamente, la sHASEGP, la sHASEGP PEGilada o la sHASEGP Super-Sialada (versiones preferiblemente humanas de las mismas) se pueden administrar por vía intravenosa para alcanzar el tejido cerebral.

Después de la isquemia y reperfusión del cerebro como ocurre en el accidente cerebrovascular, el contenido de hialuronano típicamente aumenta drásticamente debido al aumento de expresión de las HA sintasas y la disminución del catabolismo. El fallo de las bombas de iones y la filtración de plasma a los intersticios dan como resultado la retención de líquidos que si no son correctamente aclarados por los vasos linfáticos, dan lugar a necrosis de los tejidos. Algunos grupos han intentado prevenir la acumulación de líquido intersticial después de la reperfusión de la isquemia mediante el bloqueo de la permeabilidad vascular. Sin embargo, una vez que el líquido se ha extravasado, la prevención de la permeabilidad vascular puede evitar la resolución del edema y exacerbar las afecciones. Como se señaló anteriormente, la sHASEGP humana se puede administrar por vía intratecal (p. ej., a través de una derivación), o la sHASEGP, la sHASEGP PEGilada o la sHASEGP Super-Sialada (versiones preferiblemente humanas de las mismas) se pueden administrar por vía intravenosa para alcanzar el tejido cerebral.

La sHASEGP humana también se puede utilizar en el tratamiento de edema asociado con tumores cerebrales, particularmente el asociado con glioblastoma multiforme. El edema asociado con tumores cerebrales resulta de la acumulación de hialuronano en las porciones no cancerosas del cerebro adyacente al tumor. La administración de hialuronidasa a los sitios de acumulación de hialuronano (p. ej., por inyección intravenosa o a través de una derivación) puede aliviar el edema asociado con dichos tumores malignos por medio de la degradación del exceso de hialuronano en estos sitios. Por lo tanto, la hialuronidasa tiene éxito en el tratamiento de tumores cerebrales no solo al reducir la masa tumoral e inhibir el crecimiento y/o la metástasis del tumor, sino también es útil al aliviar el edema asociado con el tumor maligno. La sHASEGP humana puede administrarse para el tratamiento del edema de una manera similar a la de la administración de hialuronidasa testicular bovina para tratar el edema (véase, p. ej., Sa Earp Arq. Braz. Med. 44:217 a 20).

Sin vincularse a una aplicación o mecanismo de acción concreto, las sHASEGP pueden mejorar potencialmente el accidente cerebrovascular isquémico o hemorrágico y/u otras afecciones perjudiciales del SNC por medio de uno o más de los siguientes: (i) aumentando la oxigenación del tejido dañado mediante la reducción de la presión intracraneal; (ii) facilitando la disolución de los coágulos y la reabsorción de metabolitos tóxicos; (iii) suprimiendo la extravasación de leucocitos en regiones infartadas o con hemorragia (p. ej., por eliminación de hialuronano que es un receptor para CD44); (iv) promoviendo la regeneración neuronal del tejido dañado; o (v) aumentando la vasculogénesis cerebral.

Tratamiento de la acumulación de glicosaminoglicanos en la enfermedad cardiovascular

Se ha demostrado que la administración de hialuronidasa en modelos animales después de infarto de miocardio experimental puede reducir el tamaño del infarto (Maclean, et al. Science, 8 de Octubre de 1976; 194(4261): 199-200). El mecanismo propuesto por el que la hialuronidasa bovina reduce el tamaño del infarto en animales es reduciendo la acumulación de hialuronano que se produce después de la reperfusión de la isquemia. Se cree que la reducción del tamaño del infarto se produce a partir de un aumento del drenaje linfático y un aumento de la oxigenación del tejido y la reducción del contenido de agua del miocardio. Si bien se pudo obtener una reducción del tamaño del infarto en modelos animales, no se lograron beneficios en los estudios clínicos más amplios en seres humanos. La hialuronidasa de testículos de bóvidos posee una vida media en suero extraordinariamente corta de aproximadamente 3 minutos en los animales y en el hombre, Wolf, et. al., J Pharmacol Exp Ther 1982 Aug; 222(2): 331-7. Esta corta vida media es debido a los residuos de manosa terminales que se reconocen fácilmente por los receptores basurero del sistema reticuloendotelial. Mientras que los animales pequeños pueden beneficiarse de la hialuronidasa debido a un lecho vascular más pequeño, es necesaria una enzima con una mayor vida media. La sHASEGP super-sialada posee una farmacocinética más favorable debido a sialación para la que no hay receptor basurero. La sHASEGP en dosis que oscilan de 100-200.000 Unidades/kg puede utilizarse para facilitar la resolución

de un exceso de hialuronano después de la reperusión de la isquemia y para reducir el tamaño del infarto.

La sHASEGP Super-sialada también se puede utilizar para limitar las placas coronarias de la arterioesclerosis. Estas placas acumulan glicosaminoglicanos y median la adherencia de los macrófagos y células espumosas, Kolodgie et al., *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 1 de Octubre de 2002; 22(10):1642-8. La administración de sHASEGP Super-sialada se puede utilizar para reducir la formación de placa. Puesto que la administración repetida de hialuronidasa se contempla a dosis de 100-100.000 U/kg, la necesidad de utilizar una proteína recombinante humana con bajo riesgo de inmunogenicidad y aumento de la vida media dará como resultado la reducción de las placas superiores.

10 Tratamiento de la necrosis de tejidos periféricos

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

Suministro mejorado de anestésicos y otros agentes farmacológicos a tejidos de mamífero

20 La hialuronidasa derivada de matadero se utiliza comúnmente para el bloqueo peribulbar en la anestesia local previa a cirugía oftalmológica. La presencia de la enzima evita la necesidad de bloqueos adicionales y acelera el tiempo para la aparición de acinesia (pérdida de movimiento ocular). El boqueo peribulbar y sub-Tenon son las aplicaciones más comunes de la hialuronidasa para procedimientos oftálmicos. Desde el abandono del tratamiento con Wydase™, han aparecido informes de aumentos de diplopia y ptosis con bloqueo peribulbar (Brown et al. *J Cataract Refract Surg* 1999; 25: 1245-9).

30 Con el abandono del tratamiento con Wydase™ de Wyeth, el material de hialuronidasa derivada de testículos de bóvido se suministra ahora por farmacias con experiencia en la preparación de compuestos. Sin embargo, existen varias preocupaciones con el uso de un compuesto estéril preparado extemporáneamente <http://www.ashp.org/shortage/hyaluronidase.cfm?cfid=11944667&CFToken=9426953-ref#ref>. Las preparaciones de compuestos no son productos aprobados por la FDA. Como tal, la FDA no tiene control sobre la calidad o la compatibilidad del proceso de fabricación.

35 La sHASEGP de 10-500 Unidades puede mezclarse directamente con 5 mL de lidocaína al 2% (Xylocaine), 5 mL de bupivacaína (Marcaína) al 0,5% (bupivacaína) y opcionalmente con epinefrina 1:200.000. La sHASEGP se puede utilizar para aumentar la aparición de acinesia y para eliminar la necesidad de bloques adicionales. La sHASEGP también es ideal para la acinesia para la cirugía estética en blefaroplastias y estiramientos faciales. La sHASEGP también se puede utilizar después de tales procedimientos quirúrgicos para difundir antiinflamatorios y para reducir la hinchazón del tejido.

40 La sHASEGP también se puede mezclar con una solución tamponadora tal como bicarbonato para prevenir molestias durante el procedimiento de inyección. La sHASEGP también se puede mezclar con la anestesia para laceraciones tanto para reducir el volumen total de material necesario para la inyección como para reducir el dolor de la hinchazón de los tejidos.

45 Uso de la sHASEGP para promover la dispersión de agentes farmacológicos y de otro tipo

50 Como se describe en la presente memoria, las composiciones y métodos de la presente invención pueden ser utilizados para promover o mejorar el suministro de anestésicos y otros agentes farmacológicos (tales como los miembros de las diversas clases de agentes farmacéuticamente eficaces referidos en la presente memoria) a cualquiera de una variedad de tejidos de mamífero in vivo. A este respecto, se pueden utilizar la sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma para facilitar la difusión y por lo tanto promover el suministro de agentes farmacológicos de molécula pequeña, tales como anestésicos, antiinfecciosos y antiinflamatorios, por ejemplo, así como de agentes farmacológicos de molécula grande, tales como proteínas (incluyendo, por ejemplo, enzimas, anticuerpos monoclonales, y similares), ácidos nucleicos (incluyendo ácidos desoxirribonucleicos (p. ej., genes y moléculas antisentido) y ácidos ribonucleicos (incluyendo moléculas de ARN de interferencia (ARNi), y similares), y composiciones macromoleculares que pueden comprender una combinación de tales componentes (incluyendo combinaciones de ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos, lípidos y moléculas basadas en lípidos, y similares). A modo de ilustración y sin limitación, es probable que moléculas y complejos macromoleculares que oscilan de menos de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 500 nm de diámetro, particularmente de aproximadamente 20 a 200 nm, exhiban mejoras drásticas en el suministro a través de espacios intersticiales cuando el espacio intersticial ha sido expuesto previamente, o es expuesto coincidentemente, a una sHASEGP como se ha descrito e ilustrado en la presente memoria .

Sin limitarse a una teoría concreta de mecanismo de acción, se cree que la sHASEGP de la presente invención

funciona principalmente hidrolizando los glicosaminoglicanos dentro de la matriz extracelular que rodea las células de mamífero para crear pasajes o canales similares a poros que facilitan la difusión u otro movimiento de las moléculas dentro de la matriz extracelular expuesta; y, además, que la permeabilización de tales porciones de la matriz extracelular tiene el mayor efecto sobre la difusión o "propagación" de moléculas que no son tan grandes como para ser también obstaculizada por otros componentes macromoleculares de la matriz extracelular, tal como una red global de colágeno. El grado del efecto de difusión obtenible con una sHASEGP dada o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma en un entorno de tejido concreto se puede determinar fácilmente como se ilustra en la presente memoria mediante la evaluación del efecto de la sHASEGP o dominio de la misma sobre la difusión de moléculas de ensayo detectables de diversos tamaños (tales como cuentas de marcadas con fluoresceína o marcadas de otro modo) dentro del tejido de ensayo, ya sea con o sin pretratamiento o tratamiento concomitante con sHASEGP o dominio de la misma a un rango de tiempos y concentraciones. A modo de ilustración, en el caso de rHuPH20 recombinante inyectada por vía subcutánea en la piel lateral de los ratones, los ensayos de difusión con cuentas marcadas con fluoresceína (como se ejemplifica en la presente memoria) indicaron que los efectos sobre la difusión fueron mayores con partículas de menos de aproximadamente 500 nm de diámetro.

Se cree adicionalmente que las macromoléculas grandes (ilustradas por cuentas de 500 nm o más grande) pueden verse limitadas en su difusión no solo por su mayor tamaño, sino por su posible interacción con otras redes relativamente más abiertas dentro de la matriz extracelular, tal como una red formada a partir de hebras de colágeno intersticial. Además, y a diferencia de las hialuronidasas de origen animal descritas, las sHASEGP actualmente preferidas de la presente invención no contienen agentes que promueven la extravasación de agentes o contaminantes tales como las colagenasas (que pueden abrir canales más grandes) u otros contaminantes que pueden provocar reacciones inmunitarias. En aplicaciones concretas en las que se desean poros o canales más grandes, la sHASEGP o un dominio hialuronidasa humano soluble de la misma se pueden combinar preferiblemente con formas relativamente puras de otras enzimas que degradan la matriz tales como colagenasas para facilitar adicionalmente la propagación de complejos macromoleculares de mayor tamaño o células. Para la mayoría de las aplicaciones, el uso de un agente que promueve la permeabilidad de macromoléculas que tienen un tamaño de menos de aproximadamente 500 nm, y más preferiblemente menos de aproximadamente 200 nm, es muy ventajoso ya que el agente no promueve sustancialmente el movimiento de las células dentro de un tejido tratado, sino que promueve el paso de los complejos y agentes más pequeños.

Como se ha descrito e ilustrado en la presente memoria, las sHASEGP se pueden utilizar para mejorar el suministro de una variedad de otros agentes farmacológico y/o otros agentes a los tejidos dentro del organismo humano (incluyendo tejidos, tales como los que están en la parte posterior del ojo que son típicamente relativamente difíciles de alcanzar). Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que las sHASEGP pueden mejorar los perfiles farmacocinéticos y/o farmacodinámicos de varios de tales agentes mediante la posibilidad de aumentar su difusión o penetración dentro de un tejido, y/o mediante la mejora de su transporte convectivo por el aumento del flujo de fluido masivo dentro del espacio intersticial de un tejido. Para fines de ilustración (y sin limitación), los ejemplos de los agentes farmacológicos que se pueden combinar con las sHASEGP de la presente invención (p. ej., combinados mediante co-formulación con una o más sHASEGP o mediante co-administración con una o más sHASEGP (que puede ser administradas antes de, coincidente con o después de la administración del agente) para el tratamiento de diversas afecciones que afectan al ojo incluyen, por ejemplo, Inhibidores de la angiogénesis (tales como angiostatina, acetatos de anecortave (por ejemplo RETAANE™), endostatina, trombospondina (p. ej., trombospondina-1 y trombospondina-2), anticuerpos anti-angiogénicos y otros anti-angiogénicos o agentes dirigidos a la vasculatura (VTA) (p. ej. anticuerpos anti-VEGF tales como bevacizumab (p. ej., AVASTIN™), carboxiamido triazol (CAI), interleucina-12 (IL-12), OLTIPRAZ™ (5-[2-pirazinil]-4-metil-1,2,3-tiona), SU-5416, TNP-470, talidomida), y similares); sustancias anti-catarata y anti-retinopatía diabética (tales como los inhibidores de la aldosa reductasa (IAR) por ejemplo tolrestat (p. ej. ALREDASE™) y zopolrestat (p. ej. ALOND™), lisinopril, enalapril, statil y sustancias de entrecruzamiento con tioles y similares); Agentes anti-inflamatorios (incluyendo agentes anti-inflamatorios esteroideos y no esteroideos, descritos en la presente memoria y en la técnica); Antiinfecciosos (incluyendo los compuestos descritos a continuación, así como diversas de preparaciones oftálmicas de los mismos tales como BLEPHAIDE™, CILOXAN™, POLYTRIM™, QUININ™, TOBRADEX™, VIGAMOX™, ZYMAR™); Agentes bloqueantes beta-adrenérgicos (tales como betaxolol (p. ej. BETOPTIC S™), timolol (p. ej. Betimol™ y TIMOPTIC™) y combinaciones de los mismos (p. ej., timolol y un inhibidor de la anhidrasa carbónica tal como dorzolamida (p. ej. COSOPT™); Inhibidores de la anhidrasa carbónica (tales como acetazolamidas, brinzolamidas (p. ej. AZOPT™), diclorofenamidas, dorzolamidas (p. ej. TRUSOPT™, y en combinaciones con otros agentes tales como p. ej. COSOPT™), metazolamidas y similares); Midriáticos (tales como sulfatos de atropina, ciclopentolatos, homotropinas, escopolaminas, tropicamidas, eucatropinas, e hidroxianfetaminas y similares); Agentes de terapia fotodinámica (tales como verteporfina (p. ej. VISUDYNE™); Análogos de prostaglandinas (tales como bimatoprost (p. ej. LUMIGAN™), latanoprost (p. ej., XALATAN™), y travoprost (p. ej. TRAVATAN™); Simpaticomiméticos (tales como brimonidinas (p. ej., ALPHAGAN™ P); así como combinaciones de los mismos (tales como combinaciones de un agente bloqueador beta-adrenérgico y un inhibidor de la anhidrasa carbónica tal como COSOPT™), y numerosas otras clases de agentes tales como anti-infecciosos y varios otros moduladores fisiológicos como se describe a continuación o en otra parte en la presente memoria, y/o como se conoce en la técnica, o de nuevo desarrollo. Otros diversos agentes farmacológicos que se pueden combinar con las sHASEGP de la presente invención (p. ej.,

combinar por medio de co-formulación con una o más sHASEGP o por medio de co-administración con una o más sHASEGP (que se pueden administrar antes de, coincidente con o después de la administración del agente) se pueden utilizar para el tratamiento de diversas afecciones que afectan al ojo o que afectan a otros varios tejidos del organismo Para fines de ilustración (y sin limitación), tales agentes incluyen, por ejemplo: Anestésicos; Anti-metabolitos, anti-neoplásicos y otros agentes anticancerosos; Antivirales; Antiinfecciosos, incluyendo Antibacterianos y otros antibióticos, Antifúngicos y otros antiinfecciosos; Agentes inmunomoduladores; Antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos; Betabloqueantes; Simpaticomiméticos; Ducosanoides, prostaglandinas y análogos de prostaglandinas; Mióticos, colinérgicos y anti-colinesterasas; Anti-alérgicos y Descongestivos, Agentes hormonales; Factores de crecimiento; otros agentes sintéticos y de origen biológico; y sus combinaciones. Algunos ejemplos ilustrativos de agentes que tienen tales propiedades que se pueden combinar con las sHASEGP en la formulación de nuevos medicamentos y/o reformulaciones de medicamentos existentes incluyen las diversas categorías de agentes descritas anteriormente y a continuación (así como otros agentes conocidos y novedosos que se están siendo identificados regularmente para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de diversas enfermedades):

Anestésicos, particularmente anestésicos locales no administrados mediante inhalación (tales como ambucaínas; amoxecaínas; amilocaínas; aptocaínas; articaínas; benoxinatos; alcoholes de bencilo; benzocaínas; betoxicaínas; bifenamínas; bucricaínas; bumecaínas; bupivacaínas; butacaínas; butambenos; butanilicaínas; carbizocaínas; cloroprocaína; clibucaínas; clodacaínas; cocínas; dexivacaínas; diamocaínas; dibucaínas; dicloninas; elucaínas; etidocaínas; euprocinas; fexicaínas; fomocaínas; heptacaínas; hexilcaínas; hidroxiprocaínas; hidroxitetraicaínas; isobutambenos; cetocaínas; leucinocaínas; lidocaínas; mepivacaínas; mepirilcaínas; octocaínas; ortocaínas; oxetacaínas; oxibuprocaínas; fenacaínas; pinolcaínas; piperocaínas; piridocaínas; polidocanoles; pramocaínas; prilocaínas; procaínas; propanocaínas; propipocaínas; propoxicaínas; proximetacaínas; pirrocaínas; cuatacaínas; quinisocaínas; risocaínas; rodocaínas; ropivacaínas, alcoholes salicílicos; suicaínas; tetraicaínas; trapencaínas; trimecaínas) y similares; así como diversos otros anestésicos no de inhalación (tales como alfaxalona; amolanona; etoxadrola; fentanilo; cetamina; levoxadrola; metiturala; metohexitala; midazolam; minaxolona; propanidida; propoxato; pramoxina; propofol; remifentanilo; sufentanilo; tiletamina; zolamina y similares);

Anti-metabolitos (tales como análogos de ácido fólico (p. ej., denopterina, edatrexato, metotrexato, piritrexima, pteropterina, Tomudex, trimetrexato), análogos de purina (p. ej., cladribina, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tiaguanina), y análogos de pirimidina (p. ej., ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, doxifluridina, emitefur, encitabina, floxuridina, fluorouracilo, gemcitabina, tegafur) y similares;

Antineoplásicos (tales como aclacinomicina, actinomicina, adriamicina, ancitabina, antramcina, azacitidina, azaserina, 6-azauridina, bisantreno, bleomicina, cactinomicina, carmofur, carmustina, carrubicina, carzinofilina, cromomicina, cisplatino, cladribina, citarabina, dactinomicina, daunorubicina, denopterina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxifluridina, doxorubicina, edatrexato, emitefur, encitabina, fepirubicina, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, idarubicina, loxuridina, menogarilo, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina, ácidos micofenólicos, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, pirarubicina, piritrexima, plicamicina, porfiromicina, pteropterina, puromicina, ácidos retinoico, estreptonigrina, estreptozocina, tagafur, tamoxifeno, tiamiprina, tioguanina, triamcinolona, trimetrexato, tubercidina, vinblastina, vincristina, zinostatina, zorrubicina y similares) (véanse también los agentes anticancerosos ilustrativos descritos en la presente memoria);

Antivirales (como abacavir (p. ej., ZIAGEN™), aciclovir (p. ej. ZOVIRAX™), amantadina y rimantadina (p. ej. SYMMETREL™), amprenavir (p. ej. AGENERASE™), cidofovir (p. ej. VISTIDE™), delavirdina (p. ej. RESCRIPTOR™), didanosina (p. ej., VIDEX™), efavirenz (p. ej. SUSTIVA™), famciclovir (p. ej. FAMVIR™), fomivirsen (p. ej., VITRAVENE™), foscarnet (p. ej. FOSCAVIR™), ganciclovir (p. ej. CYTOVENE™) y valganciclovir (p. ej. VALIXA™), idoxuridina (p. ej. HERPLEX™), indinavir (p. ej. CRIXIVAN™), interferones (p. ej., de ALFERON N™, INTRON™ A, PEGASYS™, PEG-INTRON™, Roferon-A™, y combinaciones de los interferones Y OTROS antivirales tales como ROBETRON™ y PEGASYS/COPEGUS™), lamivudina (p. ej., 3TC™ y EPIVIR™) y combinaciones de lamivudina y zidovudina (p. ej., COMBIVIR™), anticuerpos monoclonales tales como palivizumab (p. ej., SYNAGIS™), nelfinavir (p. ej. VIRACEPT™), nevirapina (p. ej., de VIRAMUNE™), oseltamivir (TAMIFLU™), penciclovir (p. ej. DENAVIR™), pleconaril, ribavirina (p. ej. COPEGUS™ y REBETOL™), rimantadina (p. ej. FLUMADINE™), ritonavir (NOVIR™), saquinavir (p. ej. INVERASE™), Estavudina (d4T, por ejemplo, ZERIT™), valaciclovir (p. ej. VALTREX™), vidarabina (p. ej. VIRA-A™), zalcitabina (p. ej., HIVID™), zanamivir (RELENZA™), zidovudina (p. ej., AZT, RETROVIR™), y similares);

Antibacterianos y otros antibióticos, incluyendo, por ejemplo, Aminoglucósidos; Anfencoles; Ansamícinas; Carbacefemos; Carbapenemos; Cefalosporinas o Cefemos; Cefamicinas; Clavam; Lipopéptidos cíclicos; Diaminopirimidinas; Cetólidos; Lincosamidas; Macrólidos; Monobactamas; Nitrofuranos; Oxacefemos; Oxazolidinonas; Penemos, Tienamicinas y betalactamas diversas; Penicilinas; Polipéptidos antibióticos; Quinolonas; Sulfonamidas; Sulfonas; Tetraciclinas; y otros antibióticos, de los cuales se proporcionan miembros ilustrativos a continuación (y otros conocidos en la técnica o de nuevo desarrollo):

- 5 Aminoglucósidos (p. ej., amikacinas, apramicinas, arbecacinas, bambermicinas, butirosinas, dibecacinas, dihidroestreptomocinas, fortimicinas, gentamicinas, isepamicinas, kanamicinas, micronomicinas, neomicinas, undecilenatos neomicina, netilmicinas, paromomicinas, ribostamicinas, sisomicinas, espectinomocinas, estreptomocinas, tobramicinas, trospectomocinas y similares);
- Anfenicoles (p. ej., azidamfenicoles, cloranfenicoles, florfenicoles, tiamfenicoles y similares);
- 10 Ansamicinas (p. ej., rifamidas, rifampinas o rifampicinas (p. ej. RIFADIN™, RIFADINIV™, así como combinaciones que comprenden rifampinAs tales como rifampicina/isoniazida (p. ej., RIFAMATE™) y rifampicina/isoniazida/pirazinamida (p. ej., RIFATER™), rifamicinas, rifapentinas, rifaximins (p. ej. XIFAXAM™), y similares);
- 15 Carbacefemos (p. ej. loracarbef, 3-cloro-1-carbacefemos, 3-tio-sustituido-carbacefemos, carbacefemos descritos en Solicitud de Patente de Estados Unidos Publicada Núm. 20050004095, y similares);
- Carbapenemos (p. ej., biapenemos, imipenemos, meropenemos, panipenemos y similares);
- 20 Cefalosporinas o cefemos (p. ej., cefaclor (p. ej. CECLOR™), cefadroxil, cefamandoles, cefatrizinas, cefazedonas, cefazolinAs (p. ej. ANCEF™), cefcapeno pivoxilo, cefclidinas, cefdinir, cefditoren, cefepima (p. ej. MAXIPIME™), cefetamet, cefiximas, cefmenoximas, cefmetazoles, cefodizimas, cefonicid, cefoperazonas, ceforanidas, cefotaximas, cefotiam, cefotetan, cefoxitinas, cefozopranos, cefpimizoles, cefpiramidas, cefpiromas, cefpodoxima proxetil, cefprozil, cefroxadinas, cefsulodinas, ceftazidimas (p. ej. FORTAZ™), cefteram, ceftezoles, ceftibutenos, ceftizoximas, ceftriaxonas (p. ej. ROCEFIM™), cefuroximas (p. ej. ZINADEF™), cefuzonams, cefacetril, cefalexinas, cefaloglicinas, cefaloridinas, cefalosporinas, cefalotinas, cefapirinas, cefradinas, pivcefalexinas y similares);
- 25 Cefamicinas (p. ej., cefbuperazonas, cefinetazoles, cefininox, cefotetan, cefoxitinas (p. ej. MEFOXIN™), y similares);
- 30 Clavam (p. ej., ácido clavulánico o clavulanatos, 2- y 3-fenil clavam, y combinaciones que comprenden agentes tales como la amoxicilina/clavulanatos (p. ej. AUGMENTIN™) y ticarcilina/clavulanatos (p. ej. TIMENTIN™), y similares);
- Lipopéptidos cíclicos (p. ej. daptomicinas (p. ej. CUBICIN™));
- 35 Diaminopirimidinas tales como 2,4-diaminopirimidinas (p. ej., brodimoprima, tetroxoprima, trimetoprima y similares);
- Cetólidos (p. ej. telitromocinas (p. ej. KETEK™), y cetólidos puenteados bicíclicos (p. ej., Enanta EP-013420 y cetólidos 6-11 Bicíclicos como se describe en la Solicitud de Patente Publicada Núm. 20040157787), y similares);
- 40 Lincosamidas (p. ej., clindamicinas, lincomocinas y similares);
- 45 Macrólidos (p. ej., azitromocinas (p. ej. ZITHROMAX™), carbomicinas, claritromocinas, diritromocinas, eritromocinas, acistratos de eritromocina, estolatos de eritromocina, glucoheptonatos de eritromocina, lactobionatos de eritromocina, propionatos de eritromocina, estearatos de eritromocina, josamicinas, leucomocinas, midecamocinas, miocamicinas, oleandomocinas, primocinas, roquitamicinas, rosaramocinas, roxitromocinas, espiramicinas, troleandomocinas y similares);
- Monobactamas (p. ej., aztreonam (p. ej., AZACTAM™), carumonam, tigemonam, y similares);
- 50 Nitrofuranos (p. ej., furaltadonas, cloruros de furazolio, nifuradenos, nifuratel, nifurfolinas, nifurpirinoles, nifurprazinas, nifurtoinoles, nitrofurantoinas y similares);
- Oxacefemos (p. ej., flomoxef, latamoxef o moxalactamas (p. ej. MOXAM™), y similares);
- 55 Oxazolidinonas (p. ej. linezolidas (p. ej. ZYVOX™), eperezolidas, y similares);
- Penemos, tienamicinas y beta-lactamas diversas (p. ej. ertapenemos (p. ej. INVANZ™), imipenemos (p. ej., con cilastatina como en PRIMAXIM™), meropenemos (p. ej. MERREM™), y similares);
- 60 Penicilinas (p. ej., amdinocilinas, amdinocilina pivoxil, amoxicilinas, ampicilinas (incluyendo combinaciones de las mismas (p. ej., con sublactamas como en UNASYN™)), apalcilinas, aspoxicilinas, azidocilinas, azlocilinas, bacampicilinas, ácidos bencilpenicilínicos, bencilpenicilina sódica, carbenicilinas, carindacilinas, clometocilinas, cloxacilinas, coamoxiclav, ciclacilinas, dicloxacilinas, epicilinas, fenbenicilinas, floxacilinas, hetacilinas, lenampicilinas, metampicilinas, meticilina sódica, mezlocilinas, nafcilinas, oxacilinas, penamecilinas, hidroyoduros de penetamato, benetaminas penicilina G, penicilina G benzatina (p. ej. BICILLIN™ LA), penicilina G benzhidrilamina,

- penicilina G cálcica, penicilina G hidrabamina, penicilina G potásica, penicilina G procaína, penicilina N, penicilina O, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepicilinas, feneticilina potásica, piperacilinas (incluyendo combinaciones de las mismas (p. ej., con inhibidores de beta-lactamasa tales como tazobactama, como en Zosyn™)), pivampicilinas, propicilinas, quinacilinas, sulbenicilinas, sultamicilinas, talampicilinas, tazocilinas, temocilinas, ticarcilinas (p. ej., con clavulanatos como en TIMENTIN™), y similares);
- 5 %%%
- Polipéptidos antibióticos (p. ej., amfomicinas, bacitracinas, capreomicinas, colistimetatos (p. ej., COLI-MYCIN™ M), colistinas, enduracidinas, enviomicinas, fusafunginas, gramicidinas, micamicinas, polimixinas, pristinamicinas (y derivados pristinamicina como quinupristinas y dalfopristinas (p. ej. SYNERCID™)), ristocetinas, teicoplaninas, tiostreptonas, tuberactinomicinas, tirocidinas, tirotrincinas, vancomicinas, viomicinas, virginiamicinas, bacitracinas zinc y similares);
- 10
- Quinolonas (incl. fluoroquinolonas y análogos) (p. ej., mesilatos de alatrofloxacina, cinoxacin, ciprofloxacinas (p. ej. CIPRO™), clinafloxacinas, difloxacinas, enoxacin, feroxacin, flumequin, gatifloxacinas (p. ej., TEQUIN™), grepafloxacinas, levofloxacinas (p. ej. LEVAQUIN™), lomefloxacinas, miloxacin, moxifloxacinas (p. ej. AVELOX™), nadifloxacinas, ácido nalidíxico, norfloxacinas, ofloxacinas, ácido oxolínico, pazufloxacinas, pefloxacinas, ácido pipemídico, ácido piromídico, rosoxacin, rufloxacinas, sparfloxacinas, temafloxacinas, tosufloxacinas, mesilatos de trovafloxacina y similares);
- 15
- Sulfonamidas (p. ej., acetil sulfametoxipirazin, bencilsulfamidas, cloramina B, cloramina T, dicloramina T, formilsulfisomidinas, beta-glucosilsulfanilamidas, mafenidas, 4'-(metilsulfamoil)sulfanilamidas, nopriilsulfamidas, ftalilsulfacetamidas, ftalilsulfatiazoles, salazosulfadimidinas, succinilsulfatiazoles, sulfabenzamidas, sulfacetamidas, sulfacrolpiridazinas, sulfacrisoidinas, sulfacitinas, sulfadiazinas, sulfadicramidas, sulfadimetoxinas, sulfadoxinas, sulfaetidoles, sulfaguanidinas, sulfaguanoles, sulfaleno, ácido sulfalóxico, sulfamerazinas, sulfámetro, sulfametazinas, sulfametizoles, sulfametomidinas, sulfametoazoles, sulfametohipiridazinas, sulfametroles, sulfamidocrisoidinas, sulfamoxoles, sulfanilamidas, ácido 4-sulfanilamidosalicílico, sulfanililsulfanilamidas, sulfanililureas, n-sulfanilil-3,4-xilamidas, sulfanitrano, sulfaperinas, sulfafenazoles, sulfaproxilinas, sulfapirazin, sulfapiridinas, sulfasomizoles, sulfasimazinas, sulfatiazoles, sulfatioureas, sulfatolamidas, sulfisomidinas, sulfisoxazoles y similares);
- 20
- 25
- 30 Sulfonas (p. ej., acedapsonas, acediasulfonas, acetosulfona sódica, dapsonas, diatimosulfonas, glucosulfona sódica, solasulfonas, sublactamas, succisulfonas, ácido sulfanílico, p-sulfanililbenzilaminas, sulfoxona sódica, tiazolsulfonas y similares);
- 35
- Tetraciclinas (p. ej., apiciclinas, clortetraciclinas, clomociclinas, demeclociclinas, doxiciclinas, guameciclinas, limeciclinas, meclociclinas, metaciclinas, minociclinas, oxtetraciclinas, penimepiciclinas, pipaciclinas, rolitetraciclinas, sanciclinas, tetraciclina), y otras (p. ej., cicloserinas, mupirocinas, tuberinas y similares);
- 40
- y otros antibióticos (tales como clofocoles, ácido fusídico, hexedinas, metenaminas (incluyendo p. ej., metenamina, anhidrometilen-citrato de metenamina, hipurato de metenamina, mandelatos metenamina, sulfosalicilato de metenamina), nitrofurantoínas (p. ej. FURADANTIN™), nitroxolinas, ritipenemos, taurolidinas, xibomoles y similares);
- 45
- Antifúngicos, incluyendo polienos tales como anfotericina B (p. ej. ABELCET™ y AMBISOME™), candidinas, dermostatinas, filipinas, fungicrominas, hachimicinas, hamicinas, lucensomicinas, mepartricinas, natamicinas (p. ej. Natacina), nistatinas, pecilocinas, perimicinas, y otros (p. ej., azaserinas, griseofulvinas, oligomicinas, undecilenatos neomicina, pirrolnitrinas, sicaninas, tubercidinas, viridinas); así como antifúngicos sintéticos, tales como alilaminas (p. ej., butenafinas, naftifinas, terbinafinas); imidazoles (p. ej., bifonazoles, butoconazoles, clordantoínas, clormidazoles, cloconazoles, clotrimazoles, econazoles, enilconazoles, fenticonazoles, flutrimazoles, isoconazoles, itraconazol, cetoconazoles, lanoconazoles, miconazoles, omoconazoles, nitrato de oxiconazol, sertaconazoles, sulconazoles, tioconazoles, voriconazoles (p. ej. VFEND™)); tiocarbamatos (p. ej., tolclatatos, tolnadatos, tolnaftatos); triazoles (p. ej., fluconazoles (p. ej. DIFLUCAN™), itraconazoles (p. ej. SPORANOX™), saperconazoles, terconazoles); y otros sintéticos (p. ej., acrisorcinas, amorolfinas, bifenamidas, bromosalicilcloranilidas, buclosamidas, propionatos de calcio, clorfenesinas, ciclopirox, cloxiquinas, coparafinatos, dihidrocloruro diamtazol, exalamidas, flucitosinas, haletazoles, hexetidinas, lipopéptidos tales como equinocandina (como en caspofungina CANCIDAS™), loflucarbanos, nifuratel, yoduro de potasio, ácido propiónico, piritonas, salicilanilidas, propionatos de sodio, sulbentinas, tenonitrozoles, triacetinas, ujtiona, ácido undecilénico, propionato de zinc) y similares;
- 50
- 55
- Amebicidas y anti-protozoicos (incluyendo, por ejemplo, atovacuona, hidroclicloruro de cloroquina, fosfato de cloroquina, metronidazol, hidroclicloruro de metronidazol, isetionato de pentamidina y similares); Anti-helmínticos y antiparasitarios (incluyendo, por ejemplo, mebendazol, pamoato de pirantel, tiabendazol y similares); Antimaláricos (incluyendo, por ejemplo, hidroclicloruro de cloroquina, fosfato de cloroquina, doxiciclina, sulfato de hidroxicloroquina, hidroclicloruro de mefloquina, fosfato de primaquina, pirimetamina, pirimetamina con sulfadoxina; Antituberculosícos y anti-lepróticos (incluyendo, por ejemplo, clofazimina, cicloserina, dapsona, hidroclicloruro de etambutol, isoniazida, pirazinamida, rifabutina, rifampicina, rifapentina, sulfato de estreptomocina y similares, así como combinaciones de
- 60

los mismos tales como rifampicina/isoniazida (p. ej., RIFAMATE™) y rifampicina/isoniazida/pirazinamida (p. ej., RIFATER™).

5 Para fines de ilustración adicional (y sin limitación), los ejemplos de agentes inmuno-moduladores que se pueden combinar con las sHASEGP de la presente invención (p. ej., combinados mediante co-formulación con una o más sHASEGP o mediante co-administración con una o más sHASEGP (que se puede administrar antes de, coincidente con o después de la administración del agente) incluyen, por ejemplo, miembros de las siguientes clases de agentes:

10 Inmunosupresores (incluyendo, por ejemplo, azatioprina, basiliximab, ciclosporina, daclizumab, globulina inmune de linfocitos, muromonab-CD3, micofenolato de mofetilo, hidroclicloruro de micofenolato de mofetilo, sirolimus, tacrolimus y similares);

15 Vacunas y toxoides (incluyendo, por ejemplo, la vacuna BCG, vacuna contra el cólera, toxoides de difteria y tétanos (adsorbidos), toxoides de difteria y el tétanos y vacuna de tosferina acelular adsorbida, toxoides de difteria y tétanos y vacuna de tosferina de células enteras, vacunas conjugadas de Haemophilus b, vacuna contra el virus de la hepatitis A (inactivada), vacuna de la hepatitis B (recombinante), vacunas de virus de la influenza (basadas en antígenos de superficie purificados), vacunas de virus de la influenza (basadas en subviriones o subviriones purificados), vacunas de virus de la influenza (basado en viriones enteros), vacuna del virus de la encefalitis Japonesa (inactivada),
20 vacuna contra la enfermedad de Lyme (OspA recombinante), vacuna contra el virus del sarampión y las paperas y la rubéola (vivo), vacuna contra el virus del sarampión y las paperas y la rubéola (vivos atenuados), vacuna contra el virus del sarampión (vivo atenuado), vacuna polisacárida meningocócica, vacuna contra en virus de las paperas (vivo), la vacuna contra la peste, vacuna contra el neumococo (polivalente), vacuna contra el virus de la polio (inactivado), vacuna contra el virus de la polio (vivo, oral, trivalente), vacuna contra la rabia (adsorbida), vacuna
25 contra la rabia (células diploides humanas), vacuna contra el virus de la rubéola y las paperas (vivo), vacuna contra el virus de la rubéola (vivo, atenuado), toxoide del tétanos (adsorbida), toxoide del tétano (líquida), vacuna contra la fiebre tifoidea (oral), vacuna contra la fiebre tifoidea (parenteral), vacuna de polisacárido VI contra la fiebre tifoidea, vacuna contra el virus de la varicela, vacuna contra la fiebre amarilla y similares);

30 Antitoxinas y antivenenos (incluyendo, p. ej., antivenenos de viuda negra y otras arañas, antiveneno de Crotalidae (polivalente), antitoxina diftérica (equina), antiveneno de Micrurus Fulvius y similares);

35 Sueros inmunológicos (incluyendo, p. ej., globulina inmune de citomegalovirus (intravenosa), globulina inmune contra la hepatitis B (humana), globulina inmune intramuscular, globulina inmune intravenosa, globulina inmune antirrábica (humana), globulina inmune (humana) intravenosa contra el virus respiratorio sincitial, globulinas inmunes (humanas), inmunoglobulina antitetánica (humana), globulina inmune contra varicela-zoster y similares);

40 Otros inmunomoduladores (incluyendo, por ejemplo, aldesleuquina, epoetina alfa, filgrastim, acetato de glatirámico para inyección, interferón alfacon-1, interferón alfa-2a (recombinante), interferón alfa-2b (recombinante), interferón alfa-n3, interferón beta-1a, interferón beta-1b (recombinante), interferón gamma-1b, hidroclicloruro de levamisol, oprelvequina, sargramostim y similares).

45 Otros agentes que se pueden combinar con las sHASEGP de la presente invención (p. ej., combinadas mediante co-formulación con una o más sHASEGP o mediante co-administración con una o más sHASEGP (que se pueden administrar antes de, coincidente con o después de la administración del agente) incluyen, por ejemplo, los siguientes:

50 Antiinflamatorios esteroideos (tales como alclometasonas, algestonas, beclometasonas, betametasonas, budesonidas, clobetasoles, clobetasonas, clocortolonas, clocoprednol, corticosteronas, cortisona y hidrocortisonas (p. ej., acetato de hidrocortisona), cortivazoles, deflazacort, desonidas, desoximetasonas, dexametasonas (p. ej., dexametasona 21-fosfato), difluorosonas, diflucortolonas, difluprednatos, enoxolonas, fluazacort, flucoronidas, flumetasonas, flunisolidas, fluocinolonas, fluocinonidas, fluocortinas, fluocortolonas, fluorometolonas, fluperolonas, fluprednidenos, fluprednisolonas, flurandrenolidas, fluticasonas, formocortal, halcinonidas, halobetasoles, halometasonas, halopredonas, hidrocortamatos, hidrocortisonas, etabonato de loteprednol, mazipredonas,
55 medrisonas, meprednisonas, metilprednisolonas, furoato de mometasona, parametasonas, prednicarbatos, prednisolonas (p. ej., 25-dietilamino-acetato de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona), prednisonas, prednivalas, prednilidenos, rimexolonas, tixocortoles, triamcinolonas (p. ej., acetónido de triamcinolona, benetonida de triamcinolona, y hexacetónido de triamcinolona) y similares);

60 Antiinflamatorios no esteroideos (tales como cromoglicatos, diclofenacos, flurbiprofenos, indometacinas, ibuprofenos, ceterolacos (p. ej. ceterolaco de trometamina), lodoxamidas, nedocromilos, piroxicam, salicilatos, y similares);

Bloqueadores beta (tales como betaxololes (p. ej., hidroclicloruro de betaxolol), carteololes, esmololes, levobunololes, metipranaloles, timololes (p. ej. hemihidrato de timolol y diversas formas de maleato de timolol) y similares);

- Simpaticomiméticos (tales como adrenalina, brimonidinas, dipivefrinas, epinefrinas y similares);
- 5 Ducosanoides, prostaglandinas y análogos de prostaglandinas (tales como bimatoprost, latanoprost, travoprost, unoprostonas, y similares), así como antiprostaglandinas y precursores de prostaglandinas;
- Mióticos, colinérgicos y anti-colinesterasas (tales como cloruros de acetilcolina, carbacoles, bromuro de demecario, fluorofosfatos de diisopropilo, eserinas, fisostigminas, pilocarpinas, yoduro de fosfolina, salicilatos, y similares);
- 10 Anti-alérgicos (tales como antazolinás sódicas, cetirizinas, clorfeniraminas, cromoglicatos, cromoglicato de sodio (Crolom), difumarato de emedastina, cetotifinas (p. ej. fumarato de cetotifeno), levocabastinas, metapirilinas, nedocromil sódico, olopatadinas, pirilaminas, profenpiridaminas, y similares);
- 15 Descongestivos (tales como fenilefrinas, nafazolinás, tetrahidrozolinás y similares);
- Agentes hormonales (tales como estrógenos, estradiolos, progestágenos, progesteronas, insulinas, calcitoninas, hormona y péptido paratiroideo y factor de liberación de vasopresina hipotalámica y similares);
- 20 Factores de crecimiento (tales como factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante beta, somatotropina y fibronectina y similares);
- 25 Analgésicos (tales como paracetamol; alfentanilo; aminobenzoato; aminobenzoato; anidoxima; anileridina; anileridina; anilopam; aniolaco; antipirina, aspirina; benoxaprofeno; bencidamina; hidrocloreuro de bicifadina; brifentanilo; bromadolina; bromfenaco; buprenorfina; butacetn; butixirato; butorfanol; butorfanol; carbamazepina; carbaspirina cálcica; carbifeno; carfentanilo; succinato de ciprefadol; ciramadol; ciramadol; clonixeril; clonixina; codeína; fosfato de codeína, sulfato de codeína; conorfona; ciclazocina; dexoadrol; dexpemedolaco; dezocina; diflunisal; dihidrocodeína; dimefadano; dipirona; doxicomina; drinideno; enadolino; epirizol; tartrato de ergotamina; etoxazeno; etofenamato; eugenol; fenoprofeno; fenoprofeno cálcico; citrato de fentanilo; floctafenina; flufenisal; flunixina; flunixin meglumina; flupirtina; fluprocuazona; fluradolina; flurbiprofeno; hidromorfona; ibufenaco; indoprofeno; cetazocina; cetorfanol; cetorolaco; letimida; acetato de levometadilo; hidrocloreuro de acetato de levometadilo; levonantadol; levorfanol; lofemizol; oxalato de lofentanilo; lorcínadol; lomoxicam; salicilato de magnesio; ácido mefenámico; menabitan; meperidina; meptazinol; metadona; acetato metadilo; metofolina; metotrimoprazina; acetato de metquefamida; mimbano; mirfentanilo; molinazona; sulfato de morfina; moxazocina; nabitán; nalbufina; nalmexona; namoxirato; nantradol; naproxeno; naproxeno; naproxol; nefopam; nexeridina; noracimetadol; ocfentanilo; octazamida; olvanilo; oxetorona; oxícodona; oxícodona; tereftalato de oxícodona; oximorfona; pemedolaco; pentamorfona; pentazocina; pentazocina; fenazopiridina; feniramidol; pícenadol; pinadolina; pírfenidona; piroxicam olamina; pravadolina; proilidino; profadol; propiram; propoxifeno; napsilato de propoxifeno; proxazol; proxorfan; pirrolifeno; remifentanilo; salcolex; maleato de saletamida; salicilamida; salicilato de meglumina; salesalato; salicilato; espiradolina; sufentanilo; sufentanilo; sucapsaicina; talmecacina; talniflumato; talosalato; tazadoleno; tebufelona; tetrídamina; tifuraco; tilidina; tiopinaco; tonazocina; tramadol; trefentanilo; trolamina; veradolina; verilopam; volazocina; xorfanol; xilazina; mesilato de zenazocina; zomepiraco; y similares);
- 30
- 35
- 40
- 45 Otros agentes farmacológicos macromoleculares tales como otras proteínas, ácidos nucleicos, y similares; así como complejos de macromoléculas tales como diferentes vehículos para el suministro de fármacos, el suministro de proteínas y/o de suministro de genes (incluyendo vehículos preparados sintéticamente, tales como liposomas y similares, así como los vehículos generados biológicamente tales como vectores virales y similares); y
- 50 Otros agentes utilizados para una variedad de afecciones (e información adicional con respecto al uso, dosificaciones, contraindicaciones, etc. de diversos agentes, incluyendo los identificados en la presente memoria), como se conoce en la técnica, incluyendo, por ejemplo, aquellos agentes adicionales identificados en referencias tales como The Physicians' Desk Reference (PDR) (Thomson 2003, 2004, 2005); the American College of Physicians Complete Home Medical Guide (DK Publishing 2003); y agentes adicionales identificados en las referencias de patentes incluyendo, por ejemplo, las solicitudes Publicadas de Estados Unidos 20040224023, 20040224012 y 20050002865.
- 55
- Las combinaciones de agentes (p. ej., dos o más agentes seleccionados entre uno o más de los grupos de agentes precedentes y/o de otros grupos o clases de agentes farmacológico y de otro tipo especificados en la presente memoria o conocidos en la técnica).
- 60
- Uso de las sHASEGP para la reducción de la presión intraocular y otras indicaciones oftálmicas
- Un efecto secundario común que ocurre en el postoperatorio de los pacientes con cataratas es un aumento significativamente temprano, y ocasionalmente prolongado, de la presión intraocular. Tal afección es a veces grave,

especialmente en pacientes con cambios de disco óptico glaucomatoso. Aunque el aumento de presión tiende a ser más grave cuando se inyectan al ojo agentes viscoelásticos tales como ácido hialurónico durante la cirugía, la presión intraocular puede elevarse en el postoperatorio incluso cuando no se utilizan dichos agentes. Por otra parte, un aumento de dicha presión puede producirse incluso cuando no se utilizan medicamentos adicionales durante el procedimiento quirúrgico. En algunos casos, es ventajoso dejar un agente viscoelástico en el ojo, lo que a menudo requiere proporcionar a los pacientes grandes dosis de inhibidores de anhidrasa carbónica. Estos inhibidores disminuyen la presión intraocular al disminuir la formación de humor acuoso, un líquido que es secretado normalmente en el ojo, por el organismo ciliar. Los métodos actuales para aliviar los aumentos de presión postoperatorios en el ojo incluyen diversos tipos de colirios tales como agentes bloqueadores beta-adrenérgicos, agentes simpaticomiméticos, mióticos, agentes selectivos alfa II, inhibidores de la anhidrasa carbónica y agentes de prostaglandinas.

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

En algunos casos, puede ser aconsejable dejar un agente viscoelástico tal como Healon™, Viscoat™, u otras sustancias que ocupan espacio en la cámara anterior del ojo al final de la cirugía. Esto se verifica especialmente en el aumento de presión positiva cuando el contenido intraocular tienden a presentarse y presionar contra la superficie posterior de la córnea. Si esto se produce en un ojo con una lente intraocular sintética en su sitio, la presión sobre el endotelio corneal puede causar un daño significativo a las células y la posterior inflamación de la córnea y se puede producir opacificación, lo que se asocia con disminución de la visión. Típicamente, si la presión intraocular de un paciente se eleva significativamente a la conclusión del procedimiento operatorio, es necesario proporcionar a un paciente grandes dosis tales de inhibidores de la anhidrasa carbónica, así como gotas oculares tóxicas tales como agonistas de bloqueadores beta y alfa II con el fin de disminuir la formación de humor acuoso y/o para aumentar la salida del humor acuoso. Estos agentes tienen efectos secundarios significativos y, en algunos casos, están contraindicados en pacientes con diversos tipos de afecciones médicas tales como problemas respiratorios, enfermedades del corazón o presión arterial alta. Sin embargo, el uso de sHASEGP en estas situaciones eliminará la necesidad de proporcionar a estos pacientes grandes dosis de tales fármacos.

Además, existe una cantidad significativa de ácido hialurónico en la malla trabecular. La sHASEGP lo descompondrá y por lo tanto mejorará el flujo de salida del humor acuoso a través de la malla trabecular. Por lo tanto, la presión intraocular del paciente disminuirá. La combinación de sHASEGP con otros agentes de la cámara anterior, tales como una metilcelulosa (Ocucoat™ por ejemplo, disponible comercialmente de Storz Instrument Co.), que se utilizan como separadores y/o agentes protectores en la cirugía de cataratas, también será eficaz en la prevención de subidas de presión significativas debido a que, en efecto, abrirá la malla trabecular y permitirá el drenaje del humor acuoso rompiendo una cantidad significativa del ácido hialurónico presente en la malla trabecular.

La eliminación de glicosaminoglicanos a partir de la malla trabecular también es útil para la reducción de la presión intraocular en individuos que sufren de glaucoma en forma de ángulo abierto. La sHASEGP humana se puede administrar mediante inyección subconjuntival o inyección directamente en la cámara anterior. Puesto que la sHASEGP actúa enzimáticamente, incluso cantidades relativamente limitadas de sHASEGP pueden funcionar eficazmente como un antídoto viscoelástico o para otras situaciones que son ayudadas o mejoradas mediante la aplicación de una glicosaminoglicanasa. Al igual que con otras aplicaciones, las unidades de actividad hialuronidasa proporcionadas por la sHASEGP para la aplicación óptima dependerán en parte de la situación particular que esté siendo tratada - en especial la cantidad de degradación de glicosaminoglicanos que se desee - pero se pueden evaluar fácilmente utilizando modelos apropiados y a continuación optimizar según sea apropiado para usos concretos. A modo de ilustración, las unidades de sHASEGP que se aplicarán como antídoto estarán influidas, entre otras cosas, por el procedimiento concreto empleado y la cantidad de compuesto viscoelástico aplicado, y también por si alguno de los compuestos viscoelásticos aplicados debe ser eliminado mediante otros procedimientos tales como irrigación y aspiración. Cuando se utiliza una sHASEGP después de irrigación y aspiración en general pueden ser aplicadas cantidades proporcionadas en el intervalo de 10 a 12.000 unidades, típicamente de 100 a 5.000 unidades, más típicamente de 500 a 2.000 unidades, aunque esto de nuevo dependerá de la aplicación concreta. Cuando se utiliza sHASEGP para obviar la necesidad de irrigación y aspiración, se aplicarán cantidades más grandes con el fin de digerir eficazmente un mayor volumen de compuesto viscoelástico aplicándose cantidades proporcionadas generalmente en el intervalo de 50 a 20.000 unidades, típicamente de 400 a 10.000, más típicamente 1.500 a 5.000 unidades, aunque esto de nuevo dependerá de la aplicación concreta.

En el caso de las sHASEGP que están siendo utilizadas para reducir la presión intraocular asociada con el glaucoma, la aplicación de las sHASEGP también puede ser utilizada como un tratamiento primario para reducir la PIO asociada con el glaucoma y por lo tanto evitar potencialmente la necesidad de procedimientos quirúrgicos tales como la filtración glaucomal, implantes de drenaje glaucomal (derivaciones de tubo), trabeculoplastia láser, ciclofotocoagulación o iridotomía. Por lo tanto las sHASEGP de la presente invención se pueden introducir, por ejemplo, mediante inyección en la cámara anterior del ojo para proporcionar un medio mínimamente invasivo para reducir la presión intraocular asociada con el glaucoma. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que la administración de las sHASEGP en tales entornos puede mejorar la salida de fluido a través de la malla trabecular y por lo tanto disminuir la PIO mediante la reducción de las presiones hidrostática y/u oncótica dentro de la cámara anterior.

En el caso de las sHASEGP que están siendo utilizadas para disolver agregados vítreos o "partículas flotantes", que son generalmente agregados opacos macroscópicos de fibras vítreas, la administración de sHASEGP al cuerpo vítreo se puede utilizar para promover la desagregación.

Del mismo modo, las sHASEGP como se describe en la presente memoria se pueden aplicar al vítreo para promover la resolución de hemorragias vítreas (es decir, extravasación de sangre en el vítreo) que puede ocurrir en relación con afecciones tales como la retinopatía diabética, la neovascularización de la retina, la oclusión venosa de la retina, el desprendimiento vítreo posterior, desgarros retinianos, 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 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. El uso de sHASEGP para promover la resolución de tales hemorragias vítreas por lo tanto se puede utilizar para facilitar el diagnóstico de afecciones de la retina y/o para obviar la necesidad de procedimientos más radicales tales como la vitrectomía.

En el caso de las sHASEGP que están siendo utilizadas para promover el desprendimiento vítreo-retinal en el tratamiento de afecciones tales como la retinopatía diabética, la administración de sHASEGP al vítreo se puede utilizar para promover la separación o desacoplamiento del cuerpo vítreo de la retina. En este contexto, la sHASEGP no solo puede promover el desprendimiento sino ayudar a que se produzca de una manera que reduzca el potencial de distorsión o desgarro de la retina.

Las sHASEGP de la presente invención también se pueden utilizar para el tratamiento de opacidades corneales. En ese sentido, una variedad de distorsiones o deformidades puede afectar a la estructura normalmente organizada de la córnea y causar interrupciones en el paso de la luz a través de la córnea y alteraciones concomitantes en la visión. Por lo tanto, una serie de condiciones y causas conducen a distorsiones corneales que pueden aparecer como cicatrices, veladura u opacificación. En la aplicación de las sHASEGP a la mejora o tratamiento de tales afecciones de la córnea, la sHASEGP (en una solución farmacéuticamente aceptable que puede comprender uno o más agentes farmacológicos) puede ser introducida en la córnea por medio de cualquiera de varias rutas de administración, dependiendo en parte del grado y la localización de la lesión en la córnea. A modo de ilustración, las sHASEGP pueden ser introducidas sobre la superficie exterior del ojo (utilizando gotas u otra aplicación tópica, por ejemplo), potencialmente encapsuladas dentro de portadores tales como liposomas y similares que se pueden utilizar para facilitar la transferencia a través del epitelio corneal, mediante inyección o microinyección sobre o dentro de la misma córnea, o mediante otros enfoques en el tejido de la córnea. Además de ayudas bioquímicas o mecánicas para la promoción del suministro, se pueden aplicar del mismo modo otros medios para promover la penetración tales como la iontoforesis.

Las sHASEGP de la presente invención también se pueden utilizar, por ejemplo, para mejorar la permeabilidad de agentes empleados en la terapia fotodinámica (TFD). La TFD es un tratamiento para membranas neovasculares coroideas (CNVM), que son generalmente estructuras vasculares con fugas debajo de la retina en la forma "húmeda" de degeneración macular asociada a la edad (DMAE). En la TFD, un colorante fotosensible tal como VISUDYNE™ (verteporfina) se administra típicamente por vía intravenosa (IV) y se permite que perfunda el CNVM, así como el resto del cuerpo. Un oftalmólogo generalmente trata el CNVM con un láser rojo de una longitud de onda específica (p. ej. 689 nm) durante unos 90 segundos. La luz del láser no térmico activa el colorante (tal como VISUDYNE™) produciendo una forma activa de oxígeno que coagula y reduce el crecimiento de vasos sanguíneos anormales, lo que a su vez inhibe la fuga de fluido desde las CNVM. Las sHASEGP de la presente invención se pueden utilizar, por ejemplo, para promover la administración más localizada de un colorante (tal como VISUDYNE™) directamente en el ojo; y/o para facilitar el suministro de otros agentes que se administran útilmente al ojo en relación con procedimientos tales como TFD.

Quistes ganglionares

El quiste ganglionar (también conocido como un quiste de muñeca, quiste Biblia, o quiste del tendón dorsal) es la masa de tejido blando más común de la mano. Es un saco lleno de líquido que se puede sentir por debajo de la piel. Por lo general, está unido a una vaina tendinosa (revestimiento que lubrica el tendón) en la mano o muñeca o

conectado a una articulación subyacente; sin embargo, algunos no tienen ninguna conexión obvia a cualquier estructura. También se pueden producir en el pie. A menudo se producen cuando hay un desgarro en los ligamentos que recubren el revestimiento de los tendones o articulaciones y el revestimiento se hernia del defecto ligamentoso causando una protuberancia bajo la piel. Debido a que a menudo hay inflamación asociada, el tejido inflamado produce un líquido gelatinoso que llena el saco que sobresale. Pueden ser muy duras debido a una alta presión del fluido de tipo mucoso contenido dentro del quiste, y son a menudo confundidas con una prominencia ósea.

La sHASEGP se puede utilizar para mejorar los quistes ganglionares. La inyección intralesional de sHASEGP de 5-1000 Unidades seguida de aspiración con aguja fina eliminará el quiste sin necesidad de cirugía. Se pueden inyectar opcionalmente corticosteroides también con la sHASEGP. Pueden ser necesarias inyecciones adicionales para algunos pacientes.

Mixedema

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

Usos pulmonares de la sHASEGP

Los niveles de hialuronano en lavados bronqueoalveolares (LBA) de individuos normales están generalmente por debajo de 15 ng/mL. Sin embargo, los niveles de LBA se elevan dramáticamente en condiciones de dificultad respiratoria (Bjerner Br Med J (Clin Res Ed) 1987 3 Oct; 295 (6602):803-6). En el SDRA por ejemplo, los niveles de ácido hialurónico pueden aumentar a 500 ng/mL, mientras que en los pulmones de agricultores, los niveles de LBA pueden superar 1000 ng/mL (Hallgren et al. Am Rev Respir Dis. Mar 1989; 139(3):682-7), (Larrson et al. Chest 1992 Ene; 101(1):109-14). El aumento de hialuronano 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 bovinas de hialuronidasa no son preferibles para el tratamiento de tales afecciones por diversas razones. En primer lugar, se sabe que las preparaciones de hialuronidasa derivadas de testículos de mataderos están contaminados con proteasas de serina tales como acrosina. En segundo lugar, la naturaleza externa de las enzimas de la especie bovina aumentan la probabilidad de una reacción anafiláctica, lo que podría ocasionar la muerte del paciente. De este modo, se puede suministrar una preparación altamente purificada de sHASEGP humana recombinante mediante suministro pulmonar o intravenoso. La sHASEGP humana también puede ser administrada a pacientes que sufren de otras complicaciones pulmonares que están asociadas con el aumento de glicosaminoglicanos o para aumentar el suministro de otras moléculas co-suministradas al pulmón.

La invención se describirá ahora con mayor detalle mediante la referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Ensayo de hialuronidasa basado en microtitulación

El siguiente ejemplo proporciona un ensayo rápido para la medición de la actividad hialuronidasa de sHASEGP. Este ensayo se puede relacionar con TRU, IU o NFU a través del uso de una preparación convencional de hialuronidasa de la OMS.

Ensayo de microtitulación de hialuronano biotinilado

Los grupos carboxilo libres en los residuos de ácido glucurónico de Hialuronano se someten a biotinilación en una reacción de una etapa utilizando biotina-hidrazida (Pierce), Sulfo NHS (Pierce) y 1-Etil-dimetilaminopropil carbodiimida (Sigma). Este sustrato de HA biotinilado se acopla covalentemente a una placa de microtitulación de 96 pocillos en una segunda reacción. Una vez finalizada la reacción enzimática, se detecta el sustrato residual con una reacción de avidina-peroxidasa que puede leerse en un lector de placas ELISA convencional. Como el sustrato se une covalentemente a la placa de microtitulación, no se producen artefactos tales como desplazamiento dependiente del pH del sustrato biotinilado. La sensibilidad permite una medición rápida de la actividad Hialuronidasa de las células cultivadas y las muestras biológicas con una variación entre ensayos de menos de 10%.

a. Protocolo

Preparación de sustrato de HA biotinilado

Se disolvieron 100 mg de HA (Sigma Chemicals) en MES 0,1 M, pH 5,0, a una concentración final de 1 mg/mL y se dejó que se disolvieran durante al menos 24 horas a 4°C antes del acoplamiento de biotina. Se añadió Sulfo-NHS (Pierce; Rockford IL) a la solución de MES CS04 a una concentración final de 0,184 mg/mL. Se disolvió la hidrazida de biotina (Pierce) en DMSO como una solución de partida 100 mM y se añadió a la solución de CS04 a una concentración final 1 mM. Se preparó una solución de partida de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) como una solución de partida 100 mM en agua destilada y se añadió a la solución de HA-biotina a una concentración final 30 mM. Esta solución se dejó en agitación durante la noche a 4°C. La biotina no unida y la EDAC se eliminaron por diálisis frente a agua con 3 cambios de 1000x volumen de agua. El HA biotinilado sometido a diálisis (bHA) se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C durante varios meses.

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

Las placas Covalink-NH con bHA inmovilizado se equilibraron con 100 µl/pocillo de tampón de ensayo - o bien formiato 0,1 M, pH 3,7, NaCl 0,1 M, detergente Triton X-100 al 1%, sacarolactona 5 mM para la Hialuronidasa lisosomal; o Hepes 10 mM pH 7,4 con CaCl₂ 1 mM y 1 mg/mL albúmina de suero humano (ICN) para las enzimas activas a pH neutro. Se generó un conjunto de patrones para la calibración de la actividad enzimática frente a "Unidades de Reducción de la Turbidez relativa" (rTRU) mediante la dilución de hialuronidasa bovina testicular (Sigma Tipo VI-S) en tampón enzimático neutro de 1,0 a 1x10⁻⁶ rTRU/pocillo y ensayando de 100 µl/pocillo por triplicado. Las muestras de hialuronidasa-activa a pH ácido se diluyeron en tampón de ensayo lisosomal de 1:10 a 1:130.000 y se pipetearon por triplicado a 100 µl/pocillo. Para la mayoría de los ensayos de extractos tisulares y plasma humano, fue suficiente una incubación de 30 min a 37°C. Los pocillos de control positivos y negativos (sin enzima o sin ABC (véase a continuación), respectivamente) fueron incluidos por triplicado.

La reacción se terminó mediante la adición de 200 µl/pocillo de guanidina HCl 6M seguido de tres lavados de 300 µl/pocillo con PBS, NaCl 2 M, MgSO₄ 50 mM, detergente Tween 20 al 0,05% (Tampón B). Se preparó un kit de complejo de avidina-biotina (ABC) (Vector Labs; Burlingame CA) se preparó en 10 mL de PBS que contenía detergente Tween 20 al 0,1%, que se preincubó durante 30 min a la temperatura ambiente durante la incubación. Se añadió la solución de ABC (100 µl/pocillo) y se incubó durante 30 min a la temperatura ambiente. La placa se lavó cinco veces con Tampón B, a continuación, se añadió un sustrato de o-fenilendiamina (OPD) a 100 µl/pocillo disolviendo un comprimido de 10 mg de OPD en 10 mL de tampón citrato-PO₄ 0,1 M, pH 5,3 y añadiendo 7,5 µl de H₂O₂ al 30%. La placa se incubó en la oscuridad durante 10-15 minutos, a continuación, se leyó utilizando un filtro de 492 nm en un lector de placas de ELISA (Titertek Multiskan PLUS; ICN) supervisado por ordenador utilizando el soporte lógico del lector de placas Delta Soft II de Biometallics (Princeton NJ). Se generó una curva patrón utilizando hialuronidasa testicular bovina mediante un ajuste de la curva de cuatro parámetros de la preparación de hialuronidasa testicular y se interpolaron muestras desconocidas a través de su absorbancia a 492 nm.

Para analizar la dependencia del pH de las hialuronidasas, se utilizan sHASEGP recombinante purificada y hialuronidasa testicular bovina. La dependencia del pH de la actividad enzimática se mide diluyendo sHASEGP purificada o hialuronidasa testicular bovina parcialmente purificada a 0,1 rTRU en los siguientes tampones: formiato 50 mM, pH 3-4,5; acetato 50 mM, pH 5-6; MES 50 mM, pH 6-7; o HEPES 50 mM, pH 7-8. Las muestras se sometieron a ensayo durante 30 min a 37°C y la actividad se expresó como un porcentaje de la actividad máxima. No se utilizó NaCl en los tampones, ya que puede alterar el pH óptimo de preparaciones de hialuronidasa testicular (Gold, Biochem. J. 205: 69-74, 1.982; Gacesa et al. Biochem. Soc. Trans. 7: 1287-1289, 1979); las concentraciones salinas fisiológicas (0,15 M) disminuyeron el pH óptimo aparente, un efecto que era más pronunciado en preparaciones purificadas de la enzima testicular que en la muestra bruta original.

b. Resultados

El hialuronano se biotiniló en una reacción de una etapa utilizando biotina-hidrazida y EDAC. Al limitar la EDAC, que acopla los grupos carboxilo libres de HA con la biotina-hidrazida, solo una pequeña fracción de los residuos de ácido glucurónico totales en HA fueron marcados. Esta cantidad de EDAC (3 x 10⁻⁵ M) añadida a HA (2,8 x 10⁻³ M) da como resultado un máximo de una molécula de biotina-hidrazida acoplada por 93 unidades de disacárido de HA.

Se preparó un ajuste de curva de cuatro parámetros de las reacciones patrón de hialuronidasa testicular bovina medida a pH 3,7, y diluida de 1,0 a 1x10⁻⁶ TRU/pocillo. Se establecieron ajustes de la curva de cuatro parámetros a partir de la ecuación $y = ((A-D)/(1 + (\text{conc}/C)^B)) + D$, donde $\log_{10} y = \ln(y'/1-y')$, $y' = (y-D)/(A-D)$,

B = $-b/\ln 10$ y C = EXP (a/B). Los cuatro parámetros (A, B, C, D) se calcularon con un programa de soporte lógico que utiliza el algoritmo 2 + 2 con regresión lineal (Rodbard et al., Clin Chem 22: 350, 1976). Este ajuste de la curva incorpora los aspectos sigmoideos de la curva patrón. La precisión óptima para la medición de una muestra se produce normalmente a partir de 0,001 a 0,01 TRU/pocillo durante una incubación de 30 min. Durante una incubación de 60 min, es detectable 1/1.000 de una TRU. También se puede utilizar una curva logarítmica patrón en un intervalo más corto de valores para establecer un ajuste de la curva patrón. Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención como se reivindica no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas.

10 Ejemplo 2

Clonación de ADNc de sHASEGP

15 El ácido nucleico que codifica sHASEGP humana puede ser obtenido por un experto en la técnica a través de una serie de procedimientos incluyendo, pero no limitados a, síntesis artificial de genes, RT-PCR, e hibridación de bibliotecas de ADNc (p. ej., véase, Gmachl et al FEBS 336 (3) 1993, Kimmel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 1993 10071-10075). Alternativamente, los clones que codifican sHASEGP humana se pueden obtener de IMAGE, u otros proveedores de secuencias génicas humanas (Invitrogen Clon ID IOH10647).

20 Se calculó que la longitud completa del ADNc de PH20 humano era de 2009 nucleótidos de longitud y contenía un marco de lectura abierto de 1530 nucleótidos. La UTR 5' es inusualmente grande, lo que puede indicar un intrón conservado retenido y puede inhibir la traducción impidiendo que el ribosoma se una al codón de inicio correcto de metionina debido a 9 codones de inicio no codificantes en la UTR 5'. Se pronostica que la proteína (Número de Acceso de Genbank NP_003108) comprenda 509 aminoácidos del SEQ ID NO: 1 con una masa molecular calculada de 58 kDa.

Para la secuenciación de los clones, se escindieron las bandas amplificadas por PCR, y se hicieron eluir con el Kit de Extracción en Gel (Qiagen) y se clonaron en los vectores apropiados con extremos compatibles después de digestión con enzimas de restricción. Todas las reacciones de secuenciación se realizaron en ADN de doble hebra con el kit de secuenciación por ciclos con terminador desoxi con colorante *Taq* (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se ejecutan en un secuenciador automatizado ABI Prism™ (Applied Biosystems).

35 El marco de lectura abierto de PH-20 humana se obtuvo amplificando una biblioteca de ADNc de testículo humano (Clontech, Palo Alto CA) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando los cebadores SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 47. Los productos de la PCR se digirieron con *NheI* y *BamHI* y se clonaron en los sitios *NheI* y *BamHI* del vector IRESpuro2 (Clontech).

Ejemplo 4

40 Aislamiento de sHASEGP a partir de ADNc de PH20 humana

Un vector de expresión de sHASEGP humana recombinante secretada catalíticamente activa susceptible de glicosilación eficaz en células de mamífero se generó como se describe a continuación. Se contemplan otros constructos de expresión con promotores y genes de selección para diferentes especies tales como células de levadura e insecto que también son capaces de generar sHASEGP. También se pueden utilizar genes de selección positiva tales como Glutamina Sintasa o Dihidrofolato Reductasa (DHFR). No se pretende que los ejemplos dados a continuación restrinjan sino que más bien se proporcionan como un ejemplo de varios sistemas de expresión de plásmidos que se pueden utilizar.

50 Para construir formas secretadas de sHASEGP, se construyeron mutantes de truncamiento que carecen del extremo C terminal hidrófobo. Utilizando un programa de predicción de escisión de GPI se localizó el sitio de escisión del ancla de GPI alrededor de la posición del aminoácido N 483 en la proteína anclada a GPI completa. Se utilizó un conjunto de siete cebadores anidados 3' para construir una serie de siete mutantes de delección truncados que carecían del ancla de GPI pronosticada que parte de la posición Y 482 y se eliminó progresivamente en un aminoácido. Estos cebadores se diseñaron para que tuvieran sitios *NheI* (5') y *BamHI* (3') compatibles para clonar los mutantes por truncamiento en el vector Irespuro2 ya sea sin etiquetar con un codón de parada en el cebador 3', ya sea como una proteína etiquetada con His en el extremo C para facilitar la purificación y la detección. Por ejemplo se utilizaron los cebadores inversos SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para generar mutantes por delección que terminan en la posición Y 482, F 481 e I 480 sin una etiqueta de 6 His. Se generaron otros cebadores mutantes con el mismo diseño de bases con las modificaciones apropiadas para incluir y excluir los aminoácidos concretos. Para generar variantes etiquetadas con His, se utilizó el mismo conjunto de cebadores que para las variantes no etiquetadas variantes, excepto que los cebadores carecen del codón de terminación en los respectivos cebadores inversos, quedando igual el cebador directo (por su construcción etiquetada con His se refieren a cebadores con los SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 que son los cebadores inversos sin codón de terminación

correspondientes a los cebadores inversos no etiquetados para sus respectivos constructos). Se utilizaron cebadores solapantes para construir un espaciador de seis aminoácidos seguido de hexahistidina dentro de los sitios BamHI y NotI en el vector Irespuro2 de modo que se generaron mutantes etiquetados con His por medio de la ligación de los productos amplificados por PCR y digeridos con enzimas de restricción dentro de los sitios NheI y BamHI en el vector Irespuro2 que contiene la etiqueta de His.

Para identificar si la sHASEGP humana podía ser modificada en su extremo carboxi para generar una enzima activa secretada y neutra, se realizaron una serie de truncamientos desde el sitio de anclaje al ancla de GPI al "dominio catalítico" pronosticado sobre la base de la homología con la enzima de veneno de abeja.

Se utilizó el ADN que codificaba el clon anclado a GPI completo de sHASEGP humana en IRESPuro2 como molde para generar los diversos mutantes por delección truncados. Los programas de modelado de soporte lógico proporcionaron varios sitios de escisión pronosticados para el polipéptido completa. Uno de dichos sitios pronosticados se encontraba en la posición del aminoácido N 483 (SEQ ID NO: 1). Se diseñaron cebadores de PCR para trincar sucesivamente la proteína desde N483 para generar seis mutantes por delección comenzando en Y 482 (que carece de N) y terminando en E 477 (que carece de P).

a. Protocolo

Generación de mutante por truncamiento que carece de N483:

Se utilizó el clon de sHASEGP anclada a GPI completo entre los sitios NheI y BamHI en pIRESPuro2 como molde. Este molde se amplificó con el cebador 5' que contiene el sitio NheI que comienza en la Metionina de partida del péptido señal nativo en M 1 (SEQ ID NO: 14), y un cebador 3' que contiene el sitio BamHI que termina en Y 482 (SEQ ID NO: 8). El producto de PCR se hizo correr sobre un gel de agarosa al 1% para resolver y confirmar la banda amplificada de tamaño correcto, se purificó en gel, se sometió a digestión con las enzimas de restricción NheI y BamHI y se clonó en el vector pIRESPuro2 (Clontech) entre los sitios NheI y BamHI generando un vector de expresión para expresar este mutante por truncamiento de sHASEGP que terminaba en la posición del aminoácido N482 y que carecía del ancla a GPI con la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5 para la secuencia del polipéptido resultante de sHASEGP hasta Y 482) y la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 48 - nucleótidos que codifican el polipéptido en el SEQ ID NO: 5) como se indica.

Generación de los demás mutantes por truncamiento que carecen de Y 482, F 481, I 480, Q 479 y P 478, respectivamente.

Se utilizó la misma estrategia con la única diferencia de que se utiliza el cebador 3' apropiado para cada mutante. Los cebadores 3' respectivos son los siguientes:

Cebador 3' para el mutante de sHASEGP que carece de Y 482 - SEQ NO: 9

Cebador 3' para el mutante que carece de F 481 - SEQ ID NO: 10

Cebador 3' para el mutante que carece de I 480 - SEQ ID NO: 11

Cebador 3' para el mutante que carece de Q 479 - SEQ ID NO: 12

Cebador 3' para el mutante que carece de P 478 - SEQ ID NO: 13

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

Se realizaron otras delecciones, en bloques de diez a veinte aminoácidos, a partir del extremo 3' del mutante por truncamiento activo a pH neutro más interno de sHASEGP, que es sHASEGP hasta E 477. El cebador directo NheI (SEQ ID NO: 14) se utilizó con un cebador 3' situado convenientemente para amplificar por PCR un mutante por delección de sHASEGP de la longitud deseada desde el extremo carboxi terminal. Por ejemplo, se utilizó la PCR con los cebadores descritos en el SEQ ID NO: 14 y el SEQ ID NO: 26 como cebadores 5' y 3' respectivamente para generar el polipéptido del SEQ ID NO: 49 cuando se expresa a partir de un constructo de expresión en el vector Irespuro2. Del mismo modo, se utilizaron la PCR con los cebadores 3' inversos descritos en los SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31 y 32 para generar mutantes por delección que terminan en las posiciones de los aminoácidos A 447, S 430, G 413, S 394, A 372, y S 347, respectivamente, de la sHASEGP madura. Los productos de PCR en cada caso se digirieron con las enzimas NheI y BamHI y el producto digerido se clonó en el vector pIrespuro2 entre los sitios NheI y BamHI. Unos pocos clones independientes en el constructo de expresión final de cada grupo se sometieron a ensayo para determinar la actividad de sHASEGP activa a pH neutro secretada por medio de transfección transitoria en células CHO en medios libres de suero CD-CHO (Invitrogen, CA) y las muestras se extrajeron en los puntos de tiempo indicados para el ensayo. Se transfectó el ADN Miniprep preparado a partir de cultivos de una noche con el

reactivo de transfección GeneJuice (Novagen, CA) siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. La actividad de la hialuronidasa se midió mediante un ensayo de microtitulación como se ha descrito anteriormente.

b. Resultados

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

AMINOÁCIDO 1 A :	U/ML/24 HRS PH 7,4
347	0,000
372	0,000
394	0,000
413	0,000
430	0,000
447	0,000
467	0,089
477	0,567
478	0,692
479	0,750
480	0,575
481	0,740
482	0,329
483	0,800
509	0,044

10 Los resultados mostraron que los seis mutantes por delección de un aminoácido que terminan en los aminoácidos indicados desde Y 482 a E 477 proporcionaron una mayor actividad secretada que la de sHASEGP anclada a GPI.

15 Los resultados también mostraron que las delecciones más allá de A 467 eliminaban cualquier actividad secretada. La actividad a pH neutro secretada desde los clones A 467 disminuyó a aproximadamente 10% de la encontrada en los clones P 478 o N 483. Por consiguiente, se llegó a la conclusión de que se requería más que el dominio carboxi terminal de la sHASEGP humana para crear el dominio Hialuronidasa activa a pH neutro de lo que se suponía anteriormente de la enzima de veneno de abeja. Las cisteínas en el dominio carboxi terminal por lo tanto son necesarias para la actividad a pH neutro. Un intervalo muy estrecho que abarcaba aproximadamente 10 aminoácidos antes del sitio de escisión de GPI en N 483 definió de este modo el dominio mínimamente activo.

20 Ejemplo 5

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

25 La SHASEGP humana posee un péptido líder nativo pronosticado inusualmente largo. Además, la existencia de dos residuos de cisteína adyacentes en el péptido líder puede conducir a la agregación de multímeros polipeptídicos dentro del retículo endoplásmico durante la expresión de alto nivel y por lo tanto puede prevenir la expresión de alto nivel de una sHASEGP. Por lo tanto, se sometió a ensayo una serie de péptidos líder secretadores más eficientes para examinar su capacidad para mejorar el direccionamiento de la sHASEGP para la secreción.

30 a. Protocolo

35 Se construyó el péptido líder Kappa mediante hibridación de cebadores solapantes y PCR de extensión con cebadores correspondientes a las secuencias de los SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 40. La secuencia kappa amplificada por PCR resultante se amplificó con cebadores flanqueantes que contenían un sitio NheI en el extremo 5' (como se describe en SEQ ID NO: 41) y un sitio EcoRI en el extremo 3' (como se describe en el SEQ ID NO: 42). Esto permitió la clonación del péptido líder Kappa (la secuencia polipeptídica es la que se describe en el SEQ ID NO: 43) en el vector Litmus 39 (NEB) entre los sitios NheI y EcoRI. La sHASEGP tiene un sitio EcoRI interno; por lo tanto, este constructo kappa entre el sitio NheI y el sitio EcoRI se amplificó adicionalmente con un cebador 5' SpeI (como se

describe en el SEQ ID NO: 44) y un cebador 3' Mlul (como se describe en el SEQ ID NO: 45). La sHASEGP sin ancla a GPI que termina en P 478 se cortó de plresPuro2 con NheI y BamHI y se clonó en un vector Litmus 39 (NEB) en los sitios NheI y BamHI del vector Litmus39. Este vector Litmus que contiene sHASEGP resultante se digirió con las enzimas de restricción SpeI y Mlul y el constructo líder kappa amplificado con SpeI y Mlul se clonó en él. La mutagénesis dirigida al sitio se realizó en este vector Litmus 39 que contenía tanto secuencias Kappa como sHASEGP para generar la fusión en marco de la secuencia líder Kappa con el polipéptido maduro de sHASEGP. Los pares de cebadores correspondientes a los SEQ ID NO: 34 y 35 se utilizaron para generar el líder kappa con el Asp nativo como aminoácido terminal fusionado a la F 38 de sHASEGP (hasta P 478) (como se describe en el SEQ ID NO: 46 para la secuencia polipeptídica de la proteína de fusión). Otras combinaciones de pares de cebadores tales como las representadas por el SEQ ID NO: 33 con el SEC ID NO: 35 se utilizaron para generar el líder Kappa que terminaba en el Asp (D) terminal fusionado a L 36 de sHASEGP, el SEQ ID NO: 33 con el SEC ID NO: 36 se utilizaron para generar líder Kappa que terminaba en la Gly (G) (antes del Asp (D) terminal) fusionado a L 36 de sHASEGP, y el SEQ ID NO: 34 con el SEC ID NO: 36 se utilizaron para generar Kappa que terminaba en la Gly (G) (antes del Asp (D) terminal) fusionado con F 38 de sHASEGP. Las fusiones de Kappa-sHASEGP obtenidas por mutagénesis dirigida al sitio se purificaron en gel, se digirieron con la enzima DpnI para digerir cualquier ADN parental de arrastre, y a continuación se digirieron con NheI y BamHI y se clonaron en el esqueleto de HisresPuro2 digerido con NheI/BamHI que tenía la etiqueta His (espaciador de seis aminoácidos seguido de seis histidinas) clonado entre los sitios BamHI y NotI en el vector pRESPuro2. Por lo tanto tras la ligadura los autores de la presente invención obtienen un constructo que es NheI-kappa-sHASEGP-BamHI-His en el vector plresPuro2. Se obtuvieron cuatro conjuntos de dicho constructo que se corresponderían con las combinaciones de G o D en el extremo del líder Kappa y L 36 o F 38 al comienzo de la sHASEGP madura. Unos pocos clones independientes de cada tipo de constructo se transfectaron en células CHO en medio CD-CHO (Invitrogen, CA) para someter a ensayo si la presencia de un líder de secreción kappa promovería un aumento de los niveles de proteína secretada en comparación con el líder de secreción nativo. El ADN Miniprep preparado a partir de cultivos de una noche se transfectó con el reactivo de transfección GeneJuice (Novagen, CA) siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante y se tomaron muestras para el ensayo mediante microtitulación en los puntos de tiempo indicados. La actividad de la hialuronidasa se midió por medio de un ensayo de microtitulación como se ha descrito anteriormente.

Se sometieron a ensayo los constructos de fusión de sHASEGP con péptido líder de la cadena Kappa de IgG de ratón para analizar los niveles más altos de actividad sHASEGP activa a pH neutro secretada.

b. Resultados

Constructo del gen sHASEGP humana	U/ML/24 HORAS PH 7,4
sHASEGP Líder Kappa de IgG AA 38-478 HIS6	3,0257
sHASEGP Líder Nativo AA 1-478 HIS6	0,4857

Los resultados del ensayo enzimático indicaban que el líder Kappa de IgG era capaz de aumentar la secreción de sHASEGP aproximadamente de 7 a 8 veces por encima de la del líder de secreción nativo cuando se compara con los clones P 478, Y 482 o N 483 que carecían de semejante líder. Otros constructos del líder kappa con variaciones del sitio de fusión al líder de Asp o Gly del líder Kappa a L36 o F38 de sHASEGP también produjeron un aumento de los niveles de actividad hialuronidasa activa a pH neutro secretada. Se pretende que estos ejemplos amplíen en lugar de limiten el alcance de la invención, ya que se pueden utilizar otras secuencias líder secretor eficientes con la misma tecnología.

Ejemplo 6

45 Generación de un vector de expresión de sHASEGP humana

Se generó una sHASEGP sin una etiqueta epitópica por clonación en una casete de expresión bicistrónica, HZ24 (SEC ID NO: 47). El vector plasmídico HZ24 para la expresión de sHASEGP comprende una cadena principal del vector pCI (Promega), una secuencia de ADN que codifica los aminoácidos 1-482 de la hialuronidasa PH20 humana, un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus ECMV (Clontech), y el gen de la dihidrofolato reductasa de ratón (DHFR). La cadena principal del vector pCI incluye ADN que codifica el gen de resistencia a Beta-lactamasa (AmpR), un origen de replicación f1, una región intensificadora/promotora inmediata temprana de Citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El ADN que codificaba el constructo de sHASEGP contenía una secuencia de consenso Kozak en la Metionina del líder señal nativo y un codón de parada en la Tirosina 482. El constructo resultante pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ-24) da como resultado una sola especie de ARNm dirigida por el promotor de CMV que codifica los aminoácidos 1-482 de PH20 y los aminoácidos 1-187 de la dihidrofolato reductasa separados por el sitio interno de entrada al ribosoma.

El marco de lectura abierto de PH20 humana se amplificó a partir de un clon de ORF de Invitrogen (IOH10647,

Invitrogen, Carlsbad CA) con un Cebador 5' que introdujo un sitio NheI y la secuencia consenso de Kozack antes de la Metionina de PH20 y un cebador inverso que introducía un codón de parada después de la Tirosina 482 e introdujo un sitio de restricción BamHI. El producto de la PCR resultante se ligó en el plásmido pIRESpuo2 (Clontech, Palo Alto, CA) después de digestión del fragmento de la PCR de PH20 con NheI y BamHI.

5 Ejemplo 7

Generación de una línea celular que expresa sHASEGP

10 Se sembraron células CHO DG44 no transfectadas que crecían en medio CD-CHO Modificado de GIBCO para DHFR(-), con un suplemento de glutamina 4 mM y 18 mL de Plurionic F68/L (Gibco), a $0,5 \times 10^6$ células/mL en un matraz de agitación en preparación para la transfección. Las células se cultivaron a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5% humidificado con una agitación de 120 rpm. Las células CHO DG44 no transfectadas de crecimiento exponencial se sometieron a ensayo para determinar la viabilidad antes de la transfección.

15 Se sedimentaron 60.000.000 de células viables del cultivo de células CHO no transfectadas con DG44 y se resuspendieron a una densidad de 20.000.000 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 del plásmido HZ24 lineal (250 µg), y las soluciones de células/ADN se transfirieron a cubetas de electroporación de 0,4 cm gap BTX (Gentronics) a la temperatura ambiente. Se llevó a cabo una electroporación de control negativa sin ADN del plásmido mezclado con las células. Las mezclas de células/plásmido se sometieron a electroporación con una descarga de condensador de 330 V y 960 µF o a 350 V y 960 µF.

25 Las células se retiraron de las cubetas después de la electroporación y se transfirieron a 5 mL de medio CD-CHO modificado para células DHFR(-), con un suplemento de glutamina 4 mM y 18 mL de Pluronic 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 una incubadora con 5% de CO₂ humidificada.

30 Dos días después de la electroporación, se retiraron 0,5 mL de medio de cultivo de tejido de cada pocillo y se sometieron a ensayo para determinar la presencia de la actividad hialuronidasa.

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

35 Las células de la transfección 2 (350V), se recogieron del pocillo de cultivo de tejidos, se sometieron a recuento y se diluyeron a 10.000 - 20.000 células viables por mL. Se transfirió una alícuota de 0,1 mL de la suspensión celular a cada pocillo de cinco placas para el cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron 0,1 mL de medio CD-CHO (GIBCO) que contenía Glutamax-1 4 mM, y sin suplementos de hipoxantina y timidina a los pocillos que contenían las células (volumen final de 0,2 mL).

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

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

ES 2 557 818 T3

ID Placa/Pocillo	Actividad Hialuronidasa Relativa
1E11	242
A1 (+) control	333
H12 (-) control	0

5 Se expandieron seis clones HZ24 en el cultivo y se transfirieron a matraces de agitación en forma de suspensiones de células individuales. Los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11 y 4D10 se sembraron en placas de fondo redondo de 96 pocillos para el cultivo de tejidos utilizando una estrategia de dilución infinita bidimensional. Los clones diluidos fueron cultivados en un fondo de 500 células CHO DG44 no transfectadas por pocillo, para proporcionar los factores de crecimiento necesarios para los días iniciales de cultivo. Se elaboraron diez placas por subclón.

10 El clon 3D3 produjo 24 subclones visuales. Se midió la actividad hialuronidasa significativa en los sobrenadantes de 8 de los 24 subclones (> 50 Unidades/ml), y estos 8 subclones se expandieron en matraces T-25 de cultivo de tejidos en presencia de metotrexato 50 nM. El clon 3D3 50 nM se amplió adicionalmente en metotrexato 500 nM dando lugar a clones que producían más de 1.000 Unidades/mL en matraces de agitación (clon 3D3 5M).

Ejemplo 8

15 Producción de sHASEGP

20 Se descongeló un vial de 3D3 5M y se expandió desde matraces T a través de matraces de agitación centrífuga de 1L en CHO CDM (Invitrogen, Carlsbad CA) con un suplemento de metotrexato 100 nM y Glutamax (Invitrogen). Las células se transfirieron de matraces de agitación centrífuga a un biorreactor de 5 L (Braun) a una densidad de inoculación de $4,0 \times 10^5$ células viables por mL. Parámetros fueron el punto de ajuste de temperatura, 37°C, pH 7,2 (punto de ajuste inicial), con un punto de ajuste de Oxígeno Disuelto del 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 + 50 g/L de glucosa). A las 216 horas, se añadieron 250 mL de Medio de Alimentación Núm. 2 (CD CHO + 50 g/L de glucosa + butirato de sodio 10 mM), y a las 264 horas se añadieron 250 mL de Medio de Alimentación Núm. 2. Este proceso dio como resultado una productividad final de 1600 Unidades por mL con una densidad celular máxima de 6 millones de células/mL. Se encontró que la adición de butirato de sodio mejoraba drásticamente la producción de sHASEGP en las fases finales de la producción.

30 Crecimiento en 3D3-5M y Producción de sHASEGP, Biorreactor 5 L

Horas ejecución	Células Viables x10E5	% Viable	Unidades/ml	Vol (mL)	[Glucosa]	Alimentación
0	4,4	100	0	4500	547	
24	5,7	100	0	4500	536	
48	10,1	100	37	4500	501	
72	17,1	99	62	4500	421	
96	28,6	99	118	4500	325	
120	28,8	99	240	4500	274	
144	60,2	100	423	4500	161	
168	55	100	478	4500	92	250 ml Alimentación Núm. 1
192	66,6	98	512	4750	370	
216	55,2	92	610	4750	573	250 ml Alimentación Núm. 2
240	53	88	710	5000	573	
264	49,8	84	852	5000	474	250 ml Alimentación Núm. 2

Horas ejecución	Células Viables x10E5	% Viable	Unidades/ml	Vol (mL)	[Glucosa]	Alimentación
288	40	70	985	5250	770	
312	31	61	1467	5250	773	
336	25,4	52	1676	5250	690	

Ejemplo 9

Purificación de sHASEGP

5 El medio acondicionado del clon 3D3 se clarificó por filtración en profundidad y diafiltración de flujo tangencial en Hepes 10 mM pH 7,0. A continuación, se purificó HASEGP soluble mediante cromatografía secuencial de intercambio iónico en Q Sepharose (Pharmacia), cromatografía de interacción hidrófoba en Fenil Sepharose (Pharmacia), cromatografía en boronato de fenilo (Prometics) e Hidroxapatita (Biorad, Richmond, CA).

10 La SHASEGP se unió a Q Sepharose y se hizo eluir a NaCl 400 mM en el mismo tampón. El producto eluido se diluyó con sulfato de amonio 2 M a una concentración final de ASO4 500 mM y se hizo pasar a través de una columna de Fenil Sepharose (Baja Sustitución), seguido de unión en las mismas condiciones a una resina de boronato de fenilo. La sHASEGP se hizo eluir de la resina de fenilsefarosa en Hepes pH 6,9 después de lavar a pH 9,0 en bicina 50 mM sin ASO4. El producto eluido se cargó en una resina de hidroxiapatita cerámica a pH 6,9 en PO4 5 mM CaCl2 1 mM y se hizo eluir con PO4 80 mM pH 7,4 con CaCl2 0,1 mM.

15 La sHASEGP purificada resultante poseía una actividad específica de más de 65.000 Unidades USP/mg de proteína por medio del ensayo de microturbidez utilizando el patrón de referencia USP. La sHASEGP purificada eluyó como un solo pico de 24 a 26 minutos desde una columna de divinilbenceno estireno 5RPC de Pharmacia con un gradiente entre TFA al 0,1%/H₂O y TFA al 0,1%/acetoniitrilo al 90%/H₂O al 10% y se resolvió como una sola banda de 61 kDa ancha mediante electroforesis SDS que se redujo a una banda 51 kDa afilada tras el tratamiento con PNGASA-F. La secuenciación de aminoácidos N-terminal reveló que el péptido líder se había eliminado eficazmente.

25 Secuencia de aminoácidos N-terminal de sHASEGP bioquímicamente purificada

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

Ejemplo 10

Análisis de la glicosilación de sHASEGP derivada de CHO DG44

30 Existen datos contradictorios sobre si las sHASEGP de diferentes especies requieren glicosilación para su actividad catalítica. Por ejemplo, se informa de que se puede sintetizar hialuronidasa enzimáticamente activa de veneno de abeja en las células que carecen de la maquinaria de glicosilación, es decir, tales como E. coli. Por otra parte, el tratamiento de hialuronidasa purificada de testículo bovino con PNGasa no inactivó la actividad enzimática (Yamagata et al 1997). Otros estudios refieren pérdida de actividad tras la desglucosilación y el requerimiento, además, de enlaces disulfuro.

40 Como todos estos ensayos anteriores se realizaron utilizando preparaciones brutas o parcialmente purificadas sin embargo, no estaba claro si la pérdida de actividad era el resultado de la exposición de enzima desglucosilada a proteasas contaminantes en las preparaciones brutas o una relación funcional directa entre la glicosilación y la actividad catalítica.

a. Protocolo

45 Para determinar si la glicosilación ligada a N funcional podría ser introducida en sHASEGP humana utilizando un sistema de expresión basado CHO en condiciones libres de proteínas, se expresó un ADNc que codificaba sHASEGP-HIS6 humana en células CHO utilizando una casete bicistrónica de IRESpuo en medios definidos químicamente. Las células se cultivaron durante 72 horas en CHO CDM (Invitrogen/Gibco) seguido de concentración y diafiltración de flujo tangencial en una unidad Pellicon TFF (Millipore) con membranas de corte de 30 kDa. El producto concentrado se intercambió con Hepes 10 mM pH 7,4 NaCl 50 mM. A continuación, el producto diafiltrado se cargó en una resina de sefarosa DEAE Streamline y se hizo eluir con un gradiente de NaCl de NaCl de 0 a 1 M en una resina FPLC de Pharmacia. La sHASEGP humana eluyó a NaCl entre 10 y 30%. Los niveles de sHASEGP

en fracciones de columna determinaron que la mayoría de la enzima se recuperó en el gradiente de NaCl de 10 a 30%. A continuación, la enzima del gradiente de NaCl de 10-30% se purificó adicionalmente por medio de cromatografía de afinidad en una resina IMAC cargada con Ni. La sHASEGP humana se hizo eluir de la resina IMAC después de lavar con Imidazol 10 mM con Acetato 50 mM pH 5,0. La proteína se concentró y se sometió a diálisis frente a HEPES 10 mM, pH 7,4. Se determinó que la enzima altamente purificada poseía una actividad específica de 97.000 Unidades/mg de proteína en presencia de Calcio 1 mM y 1 mg/mL de HSA en el ensayo de microtitulación de sustrato biotinilado basado en ELISA.

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

b. Resultados

El análisis de transferencia Western determinó que la sHASEGP humana producida en células CHO era sensible al tratamiento con PNGASA. La masa molecular relativa de sHASEGP humana reveló que la proteína estaba altamente glicosilada. Tras la digestión completa durante la noche con PNGASA, la sHASEGP humana se redujo a una sola especie confirmando que la heterogeneidad leve de la banda sin digerir podría atribuirse a residuos de azúcar unidos a N. La digestión parcial con PNGasaF mostró una serie de intermedios que pasaban de no tratados a un cambio progresivo con un tratamiento más prolongado. Aunque las bandas eran algo difusas en un gel al 7%, se pudieron visualizar al menos 6 isoformas intermedias diferentes.

El tratamiento de sHASEGP con Neuraminidasa puso de manifiesto que las células CHO eran de hecho capaces de sintetizar sHASEGP humana sialada. Tras el tratamiento con neuraminidasa y análisis de transferencia Western de sHASEGP en geles al 7%, la sHASEGP humana recombinante derivada de CHO reveló un desplazamiento de aproximadamente 1-3 kDa en la movilidad en comparación con la sHASEGP sin tratar. Este es por lo tanto el primer informe sobre la generación de una sHASEGP humana sustancialmente sialada. Esto es muy valioso tanto para la estabilidad como para mejorar la vida media en suero de una sHASEGP humana ya que la sHASEGP de esperma nativa de muchas especies carece de sialación y no reacciona con las lectinas específicas de ácido siálico.

Análisis FACE de sHASEGP

El análisis de oligosacáridos sHASEGP activos mediante análisis FACE permite la rápida determinación de los perfiles de sHASEGP catalíticamente activos.

Protocolo

Se evaluó la hialuronidasa purificada del clon 3D3 5M utilizando el Perfilado de Oligosacáridos Unidos a N FACE™ (Prozyme). Los oligosacáridos se escindieron de 128,7 µg de glicoproteínas por digestión enzimática con N-Glicanasa (también conocida como PNGasa), se marcaron utilizando el fluoróforo ANTS, y se separaron por electroforesis. Las posiciones relativas de las bandas de oligosacáridos se determinaron mediante la ejecución de la muestra y diluciones de la muestra junto con una escala de patrones de oligosacáridos que designaba la distancia de migración en Unidades de Grado de Polimerización DP).

Resultados

El Perfil de N de la muestra de Hialuronidasa consiste en diez bandas de las cuales seis (en ejecución concomitante con las bandas de patrones de oligosacáridos G5 - G12) tenía intensidades superiores a 9%. Además, la banda que corre al lado del patrón G9 era la más intensa con intensidades de 35% - 46%.

Análisis de oligosacáridos de sHASEGP

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

Oligosacárido de sHASEGP	Grado de Polimerización	Porcentaje del Total
7	6,14	9,0
8	5,57	12,4
9	3,84	2,3
10	3,26	0,5

Ejemplo 11

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

5

a. Protocolo

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

10

b. Resultados

MUESTRA	U/ML
No Rx	22,01
Neuraminidasa O/N OG 50 mM	23,57
PNGasaF w/ OG 50 mM	0,0
PNGasaF sin OG 50 mM o/n	10,74

15 Ejemplo 12

Actividad de sHASEGP hacia glicosaminoglicanos sulfatados y no sulfatados

Además del ensayo basado en microtitulación utilizando HA, la especificidad de sustrato de sHASEGP hacia otros glicosaminoglicanos o proteoglicanos puede someter a ensayo utilizando un ensayo de desplazamiento en gel con sustratos purificados para determinar la actividad de sHASEGP hacia otros glicosaminoglicanos. Muchos ensayos de hialuronidasa se han basado en la medición de la generación de nuevos grupos reductores N-acetilamino (Bonner y Cantey, Clin. Chim. Acta 13: 746-752, 1.966), o pérdida de viscosidad (De Saegui et al., Arch Biochem. Biophys. 121: 548-554, 1967) o turbidez (Dorfman y Ott, J. Biol Chem 172: 367, 1948). Con sustratos purificados todos estos métodos son suficientes para la determinación de la presencia o ausencia de actividad endoglucosamídica.

25

a. Protocolo

Ensayo de desplazamiento en gel - Los sustratos purificados se mezclan con sHASEGP recombinante para someter a ensayo la actividad endoglucosidasa que da lugar a una mayor movilidad en el sustrato dentro del gel. El Sulfato de Condroitina A, el Aggrecan y D fueron de Calbiochem. El Hialuronano (Cordón umbilical humano), el Sulfato de Condroitina C, el Dermatán sulfato y el Heparán sulfato se obtienen de Calbiochem. El hialuronano de cordón umbilical humano se obtuvo de ICN. Cada sustrato de ensayo se diluyó a 0,1 mg/mL. Se mezclaron muestras de 10 µl de sHASEGP purificada o medio acondicionado de células que expresaban sHASEGP, así como también se mezclaron con 90 µl de sustrato de ensayo en tampón deseado y se incubaron durante 3 horas a 37°C. Después de la incubación las muestras se neutralizaron con tampón de muestra (Tris EDTA pH 8,0, Azul de Bromofenol y glicerol) seguido de electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%. Los glicosaminoglicanos se detectan por tinción de los geles en Azul Alcian al 0,5% en 3% Ácido acético glacial durante una noche seguido por decoloración en Ácido acético glacial al 0,7%. La degradación se determina mediante comparación de la movilidad del sustrato en presencia y ausencia de la enzima.

40

b. Resultados

Se incubaron 100 Unidades de sHASEGP HIS6 en 10 µl con 90 µl de Tampón Hepes 10 mM con 50 µg/mL de albúmina de suero humano durante 2 horas a 37°C que contenía 10 µg de diversos glicosaminoglicanos y proteoglicanos. El ensayo electroforético seguido de tinción con azul Alcian reveló un aumento de desplazamientos de movilidad para una sola especie en Sulfato de Condroitina A, C y D, Aggrecan e Hialuronano pero no en Heparán sulfato ni en Sulfato de Condroitina B. Mientras los glicosaminoglicanos no digeridos corrieron como una mancha en

45

medio del gel, los productos digeridos mostraron la mayor parte de la mancha de azul Alcian que corría en la parte delantera del colorante con una pequeña cantidad de material que corría como una escala creciente.

Ejemplo 13

5 Efectos de los iones metálicos sobre la activación de sHASEGP

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

15 a. Protocolo

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

20 b. Resultados

Aditivo de Sal Metálica	Actividad a pH Neutro U/ml
Sin aditivos	11,909
Ni 100 µM	6,0306
Co 100 µM	8,972
Zn 100 µM	3,7476
Ca 100 µM	101,9892

25 Se encontró un aumento significativo en la actividad hialuronidasa después de la incubación de sHASEGP con Calcio 0,1 mM o Magnesio 0,1 mM. No se encontró dicha activación después de la incubación con otros metales. La adición de Calcio a sHASEGP aumentó la actividad específica de la enzima hasta aproximadamente 97.000 unidades por mg de proteína basada en la medición de A280. A continuación, se sometió a ensayo la curva de respuesta a la dosis de metales de los Calcio y Magnesio para determinar la concentración óptima de iones metálicos para la enzima.

30

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

35 Se encontró que la activación de sHASEGP se producía en el rango micromolar. Las concentraciones superiores a 10 mM eran inhibitoras tanto para el calcio como para el magnesio. Para descartar la activación inespecífica del sustrato en lugar de la enzima, se incubó cloruro de calcio en tampón Hepes 10 mM con el sustrato biotinilado inmovilizado sobre la placa de microtitulación seguido de lavado. No se encontró activación cuando se añadía la enzima a la placa previamente incubada con calcio que había sido lavada. La activación también se sometió a ensayo sobre la sHASEGP nativa liberada con fosfolipasa C que puso de manifiesto una activación similar con Calcio descartando un artefacto de la etiqueta epitópica HIS6 carboxi terminal.

Ejemplo 14

Efectos de la albúmina sobre la actividad de sHASEGP

5 Se encontró que la dilución de rHuPH20 recombinante y otras preparaciones de hialuronidasas derivadas de testículos de matadero requería albúmina además de Calcio para una actividad óptima.

a. Protocolo

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

b. Resultados

15 La activación de la actividad de la hialuronidasa se encontró a altas diluciones en presencia de albúmina. No estaba claro si esta activación era el resultado de la prevención de la desnaturalización o si la albúmina afectaba a la disponibilidad de sustrato. Por lo tanto, una formulación preferible de sHASEGP humana podría incluir Albúmina y una sal metálica que consistiera en calcio o magnesio.

20 Ejemplo 15

Ampliación de la actividad de la sHASEGP purificada *in vivo*

a. Protocolo

25 Se diluyó SHASEGP purificada en Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Pluronic al 0,1% a 0,5 U/μl en agua libre de pirógenos con NaCl 0,15 M. Se realizó una serie de diluciones en 20 μl finales de solución salina para dar un total de 0,01, 0,05, 0,1 Unidades por inyección. Se añadieron 20 μl de la solución de azul de tripano a un volumen final de 40 μl y se inyectaron por vía subcutánea en la piel lateral a cada lado de ratones balb Nu/Nu que habían sido anestesiados previamente i.p. mediante la administración de cetamina/xilazina. Se midieron las áreas de colorante en 2 dimensiones con un microcalibre desde t = 0 a t = 45 min. El área se representa en mm². Como control se incluyó HYAL1 humana recombinante que carece de actividad a pH neutro, pero es secretada.

35 b. Resultados

Artículo de ensayo	Área de colorante @ 45 min
A. Control salino	51,5 mm ²
B. sHASEGP 0,01 U	76,8 mm ²
C. sHASEGP 0,05 U	98,22 mm ²
D. sHASEGP 0,10 U	180,4 mm ²
E. HYAL1 100 U	67,48 mm ²

Ejemplo 16

Cinética de la actividad de difusión de sHASEGP

40 a. Protocolo

45 Se separó sHASEGPHis6 recombinante purificada en 2 alícuotas. Una se calentó a 95°C durante 15 minutos en un termociclador con una tapa calentada. La otra permaneció a temperatura ambiente. Se verificó la inactivación térmica de la actividad enzimática en el ensayo de enzima basado en microtitulación. Para el ensayo cinético se sometió a ensayo material inactivado con calor versus material nativo. Se inyectaron subcutáneamente 4 unidades de sHASEGP purificada o material inactivado con calor equivalente con colorante azul de tripano. Se analizaron las áreas en varios puntos de tiempo hasta 15 minutos.

50 b. Resultados

4 Unidades	4 Unidades inactivado con calor
$t_{\text{minutos post inyección}}$	$t_{\text{minutos post inyección}}$
$t_0 = 52,38$	$t_0 = 50,58$
$t_3 = 116,51$	$t_3 = 65,48$
$t_{6,5} = 181,93$	$T_{6,5} = 63,87$
$t_{10} = 216,96$	$T_{10} = 65,80$
$t_{16} = 279,99$	$T_{16} = 74,3$

Ejemplo 17

5 Restauración de la barrera dérmica destruida por sHASEGP

a. Protocolo

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

15 b. Resultados

2 Unidades	Control salino
$T_{\text{horas post inyección sHASEGP}}$	$t_{\text{horas post inyección sHASEGP}}$
$t_{0,5h} = 183$	$t_{0,5h} = 54$
$t_{1hr} = 167$	$t_{1hr} = 50$
$t_{22hr} = 61$	$t_{22hr} = 48$

20 Los resultados demuestran que la barrera dérmica se reconstituye en el plazo de 24 horas desde la administración de 2 Unidades de enzima.

Ejemplo 18

Determinación del tamaño de los canales abiertos por sHASEGP

25 Se demostró que la sHASEGP humana abría canales en el espacio intersticial suficientes para permitir la difusión de una pequeña molécula, es decir, colorante azul de tripano. Sin embargo, se desconocía cuáles eran los límites superiores del tamaño de las partículas que podrían difundirse en presencia de sHASEGP.

a. Protocolo

30 Se utilizaron moléculas fluorescentes de diferentes tamaños para determinar el tamaño de los canales abiertos por la sHASEGP humana, se administraron dextranos con fluoresceína añadida con un peso molecular medio ponderal de 4.400 y 2 millones de Da (Sigma), así como cuentas marcadas con fluoresceína de diámetros definidos de 20 nanómetros a 500 nanómetros (Molecular Probes) por vía subcutánea en un volumen de 40 μ l después de la inyección de sHASEGP o control salino en los mismos sitios. A continuación, se midió el área del frente de colorante en dos dimensiones a los 15 minutos de la inyección.

b. Resultados

Agente de difusión	Tamaño de partícula del ensayo de difusión	Área a los 15 min	Desv. Típica
sHASEGP	4400 Da	84,2	25,7
Control	4400 Da	38,0	5,8
sHASEGP	2x10E6 Da	141,2	4,5

Agente de difusión	Tamaño de partícula del ensayo de difusión	Área a los 15 min	Desv. Típica
Control	2x10E6 Da	51,7	8,1
sHASEGP	Diámetro 20 nm	92,3	20,6
Control	Diámetro 20 nm	51,6	3,0
sHASEGP	Diámetro 100 nm	61,0	5,7
Control	Diámetro 100 nm	40,0	7,0
sHASEGP	Diámetro 200 nm	35,5	1,6
Control	Diámetro 200 nm	27,9	8,2
sHASEGP	Diámetro 500 nm	44,8	13,6
Control	Diámetro 500 nm	41,2	9,8

5 Los resultados demostraron que las moléculas de aproximadamente 1 kDa (azul de tripano) a 50 nm de diámetro (cuentas de látex) mostraban una mayor difusión después de la administración de sHASEGP. Mientras que la albúmina de suero bovino (66 kDa) mostraba una cinética de difusión similar a la del azul de tripano, las cuentas de látex de 50 nm requerían significativamente más tiempo para difundirse. Las cuentas de 500 nm no mostraron difusión hasta los 480 minutos.

Ejemplo 19

10 Perfiles farmacocinéticos en suero de anticuerpos biotinilados después de la co-inyección subcutánea de sHASEGP humana.

a. Protocolo

15 Se anestesiaron ratones Balb/c hembra con una mezcla de cetamina/xilazina. A continuación se inyectaron subcutáneamente a los ratones 20 µl de solución de 0,5 mg/mL de IgG de ratón biotinilada mezclada con 20 µl de solución salina o 20 µl de sHASEGP que contenía 4 unidades de actividad.

b. Resultados

20

Tiempo después de la inyección	CONTROL	sHASEGP (4U)
IgG suero t = 0 hrs	0 ng/ml	0 ng/ml
IgG suero t = 2 hrs	0 ng/ml	360 ng/ml
IgG suero t = 51 hrs	4152 ng/ml	4176 ng/ml

25 Los resultados demuestran que la sHASEGP aumenta la cinética de distribución en suero de moléculas de gran tamaño en circulación. Cuando no se pudo detectar IgG biotinilada en el grupo de control a las 2 horas, fueron evidentes 360 ng/mL a las 2 horas en el grupo de sHASEGP.

Ejemplo 20

30 Actividad de propagación de moléculas inyectadas subcutáneamente después de la inyección intravenosa de sHASEGP humana

a. Protocolo

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

b. Resultados

40 Los resultados demostraron que la sHASEGP altamente purificada estaba disponible sistémicamente para los tejidos distales tras la administración intravenosa. La actividad de propagación de sHASEGP administrada sistémicamente fue dependiente de la dosis, siendo indistinguible una inyección de 10 unidades del control de portador.

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

Ejemplo 21

5 Uso ilustrativo de la PEGilación para generar sHASEGP modificadas que muestran una farmacocinética mejorada

Como un ejemplo ilustrativo del uso de la pegilación para generar formas modificadas de sHASEGP que tienen una farmacocinética mejorada, tal como un aumento de la vida media en suero, los autores de la presente invención anclaron radicales de polietilenglicol lineales o ramificados (PEG) a una sHASEGP ilustrativa, PH20 humana recombinante (rHuPH20) como se ha descrito anteriormente.

Se pueden utilizar numerosos grupos funcionalmente activados diferentes para el anclaje de radicales de PEG a sHASEGP tales como rHuPH20 (incluyendo, a modo de ilustración, aldehídos, succinimidias, maleimidias y otros). Numerosos reactivos de pegilación diferentes se encuentran disponibles en el mercado de varias fuentes, incluyendo Nektar Therapeutics (www.nektar.com), así como otros numerosos proveedores (www.pharma.dow.com, www.nof.co.jp, www.sunbio.com, www.celares.com). Con fines ilustrativos, rHuPH20 se ha pegilado de manera eficaz como se describe en la presente memoria utilizando numerosos reactivos PEG ilustrativos para generar numerosas enzimas rHuPH20 PEGiladas. También se han aplicado metodologías análogas a otras enzimas hialuronidasa, incluyendo una hialuronidasa de origen animal ilustrativa (utilizando una preparación de hialuronidasa testicular ovina disponible como Vitrase™ de ISTA Pharmaceuticals), una hialuronidasa derivada de bacteria ilustrativa (utilizando una preparación de hialuronidasa bacteriana disponible como Hialuronato de liasa de Sigma), y una condroitinasa derivada de bacteria ilustrativa que tiene actividad hialuronidasa (utilizando una preparación de condroitinasa ABC bacteriana disponible como Condroitinasa ABC de Associates of Cape Cod, Inc./Seikagaku Corporation).

Además de variar el grupo funcional, se encuentran disponibles PEG de una variedad de longitudes y estructuras diferentes que se puede incorporar utilizando un grupo funcional concreto. Con fines ilustrativos, se han conjugado longitudes de PEG que van desde 5 a 60 kDa (p. ej., 5, 10, 20, 30, 40 y 60 kDa) con rHuPH20. Una vez más se encuentra fácilmente disponible una variedad de diferentes PEG que tienen diferentes longitudes y estructuras a partir de fuentes que incluyen Nektar, Dow Chemical Corporation (Dowpharma), NOF Corporation, SunBio, Celares y otros. Se conoce un gran número de referencias en la técnica relacionada con reactivos PEG y métodos de PEGilación de proteínas, incluyendo numerosos comentarios y artículos citados en ellos; véanse, p. e., MJ et al. *Advanced Drug Delivery Review* 2002, 54: 459-476; Harris JM y Zalipsky, S (eds) de "Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications" ACS Symposium Serie 680 (1997); Mehvar, R et al. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3(1): 125-136 (2000); Harris, JM, *Nature Reviews* 2: 215 y sig. (2003); Tsubery, H., *J Biol. Chem* 279(37): 38118-24 (2004); y se describen adicionalmente en numerosas referencias que describen la PEGilación y diversos reactivos y metodologías (véase, p. ej., Monfardini, C et al., *Bioconjugate Chem.* 6: 62-69 (1995); Veronese FM et al., *J. Bioactive Compatible Polymers* 12: 197-207 (1997); y una variedad de patentes de los Estados Unidos y otras patentes y solicitudes publicadas incluyendo US 5.672.662; US 5.932.462; US 6.495.659; y US 6.737.505; así como también las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.002.531; 4.179.337; 5.122.614; 5.183.550; 5.324.844; 5.446.090; 5.612.460; 5.643.575; 5.766.581; 5.795.569; 5.808.096; 5.900.461; 5.919.455; 5.985.263; 5.990.237; 6.113.906; 6.214.966; 6.258.351; 6.340.742; 6.413.507; 6.420.339; 6.437.025; 6.448.369; 6.461.802; 6.828.401; 6.858.736; Publicaciones de las Solicitudes de los Estados Unidos 20010021763; 20010044526; 20010046481; 20020052430; 20020072573; 20020156047; 20030114647; 20030143596; 20030158333; 20030220447; 20040013637; 2005000360; 20050114037; 20050171328 y 20050209416; y publicaciones Europeas EP 01064951; EP0822199; y publicaciones PCT WO 00176640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; y WO 0187925.

Ejemplo 21 A: Versiones PEGiladas ilustrativas de hialuronidasas recombinantes humanas

Como una ilustración ejemplar de la pegilación de una sHASEGP ilustrativa, se han aplicado PEG -aldehídos, -succinimidias y -carbonatos para conjugar radicales de PEG a rHuPH20. De estos tres compuestos químicos, los PEG-succinimidilos han sido típicamente los más convenientes para utilizar en el caso de rHuPH20. Por ejemplo, se ha conjugado rHuPH20 con reactivos de monoPEG-succinimidilo ilustrativos (MPEG) incluyendo propionatos de mPEG-succinimidilo (mPEG-SPA), butanoatos de mPEG-succinimidilo (mPEG-SBA), y (para anclar PEG "ramificados") mPEG2-N-hidroxilsuccinimida. Estos ésteres de succinimidilo pegilados contienen cadenas principales de carbono de diferentes longitudes entre el grupo PEG y el entrecruzador activado, y un grupo PEG individual o ramificado. Estas diferencias se pueden utilizar, por ejemplo, para proporcionar para diferentes cinéticas de reacción y para restringir potencialmente los sitios disponibles para el anclaje de PEG a rHuPH20 durante el procedimiento de conjugación.

Se han conjugado PEG-succinimidilos (como anteriormente) que comprenden PEG lineales o ramificados con rHuPH20. Utilizando composiciones y mecanismos como los descritos en la técnica, se han empleado PEG-succinimidilos para generar rHuPH20s de manera reproducible que comprenden una combinación de moléculas que de aproximadamente tres a seis moléculas de PEG por sHASEGP. Tales composiciones de rHuPH20 pegiladas se purificaron fácilmente para producir composiciones que tenían actividades específicas de con aproximadamente 25.000 Unidades/mg de actividad hialuronidasa, y que estaban sustancialmente libres de rHuPH20 no PEGilada (menos de 5% no PEGiladas). Como es sabido en la técnica, y como se describe por ejemplo en las referencias de PEGilación que incluyen las citadas anteriormente, también se encuentra disponible una variedad de reactivos y técnicas para la consecución de productos de PEG monodispersos en oposición a polidispersos (véanse, p. ej., las revisiones y referencias citadas en la descripción detallada anterior relacionadas con la monopegilación específica del sitio y la PEGilación dirigida al sitio).

Se han observado mejoras tanto en la farmacocinética como en la farmacodinámica en modelos animales tras la administración de una sHASEGP PEGilada en comparación con la versión no modificada de la sHASEGP. Por ejemplo, tras la administración intravenosa a ratones tanto de 1.000 unidades de una rHuPH20 no modificada como de 1.000 unidades de rHuPH20 conjugada con PEG que tenía un peso molecular de aproximadamente 40 kDa (rHuPH20-PEG40), se observó que la vida media en suero de la actividad de la hialuronidasa activa a pH neutro (PH20) en el suero de ratones tratados con rHuPH20-PEG40 era significativamente más larga (16-20 veces) que la de los ratones tratados con rHuPH20 no modificada. Además, se ha comparado la eficacia de rHuPH20-PEG40 con la de rHuPH20 no PEGilada en un modelo de accidente cerebrovascular en rata. Los resultados iniciales de estos estudios demuestran una mayor eficacia de rHuPH20-PEG40 (mayor de 75-85% de supervivencia, frente a menos de 50% en los controles) en la supervivencia de ratas 7 días después de la inducción del accidente cerebrovascular.

Utilizando diversos reactivos de PEG como los disponibles de Nektar, los autores de la presente invención han preparado versiones ilustrativas de hialuronidasas recombinantes humanas (enzimas particularmente preferidas basadas en rHuPH20) empleando mPEG-SBA (301 kD), mPEG-SMB (30 kD), y versiones ramificadas basadas en mPEG2-NHS (401 kD), mPEG2-NHS (601 kD). Estos reactivos y muchos otros se encuentran disponibles en varios pesos moleculares (véase, p. ej., el Catálogo de Productos Nektar 2005-06, que se encuentra disponible en la red en <http://www.nektar.com> o http://www.nektar.com/pdf/nektar_catalog.pdf, referencias de los mismos). Se encuentran disponibles otros numerosos reactivos y metodologías de PEG de otros proveedores y/o se describen en la técnica.

A modo de ilustración, se han generado versiones pegiladas de rHuPH20 utilizando la química de NHS, así como carbonatos, y aldehídos, utilizando cada uno de los siguientes reactivos disponibles de Nektar: mPEG2-NHS-40K ramificado (Nektar núm. 2z3y0t01); mPEG-NHS-10K ramificado (Nektar núm. 2z3x0Lo1-10); mPEG-NHS-20K ramificado (Nektar núm. 2z3x0Lo1-20); mPEG-NHS-40K ramificado (Nektar núm. 2z3x0Lo1-40); MPEG2-NHS-60K ramificado (Nektar núm. 2z3y0v01); mPEG-SBA-5K (Nektar núm. 2m450h01); mPEG-SBA-20K (Nektar núm. 2m450p01); mPEG-SBA-30K (Nektar núm. 2M450r01); mPEG-SMB-20K (Nektar núm. 2m4k0p01); mPEG-SMB-30K (Nektar núm. 2m4k0r01); mPEG-butiraldehído-30K (Nektar núm. 072M0R01); mPEG-SPA-20K (Nektar núm. 2m4m0p01); mPEG-SPA-30K (Nektar núm. 2m4m0r01); y PEG-NHS-5K-biotina (Nektar núm. 0H4M0H02).

Los autores de la presente invención también han generado versiones PEGiladas de hialuronidasas (p. ej., rHuPH20) utilizando reactivos de PEG disponibles de Dow Pharma, una división de Dow Chemical Corporation; incluyendo hialuronidasas PEGiladas con carbonato de p-nitrofenilo-PEG de Dowpharma (30 kDa) y con propionaldehído-PEG (30 kDa). Los reactivos de Nektar y Dowpharma y sus productos resultantes se utilizaron y se sometieron a ensayo esencialmente como se describe a continuación para generar una gran variedad de composiciones de hialuronidasa pegiladas. Otros reactivos y otros hialuronidasas, se pueden hacer reaccionar de manera similar utilizando técnicas análogas.

Para la generación de versiones PEGiladas de rHuPH20, se mezcló enzima purificada (a una concentración de entre aproximadamente 1 a 14 mg/ml) con un exceso molar de cada reactivo PEG (generalmente a aproximadamente un exceso molar 10:1 de PEG:enzima), a un pH y otras condiciones como las recomendadas para cada uno de los reactivos de PEG o químicos (generalmente se realizaron reacciones con aldehídos a un pH de aproximadamente 4,5, reacciones con NHS a pH neutro y reacciones con carbonato a un pH de aproximadamente 9,5). Los componentes de reacción se hicieron reaccionar mediante mezclado durante aproximadamente 16 horas a 4 grados C.

Se utilizó SDS-PAGE para examinar inicialmente los productos de reacción. Generalmente se observó que la rHuPH20 no modificada migraba como una única banda de aproximadamente 63 kDa de peso molecular. Las diversas versiones pegiladas de rHuPH20 generalmente comprenden una banda en el intervalo de aproximadamente 150-200 kDa (típicamente de aproximadamente 180 kDa), así como varias bandas de más de 200 kDa.

A continuación los autores de la presente invención realizaron la filtración en gel de los productos de enzimas modificadas seguida de la actividad enzimática de las proteínas fraccionadas. Brevemente, siguiendo mecanismos como los conocidos en la técnica, se llevaron a cabo separaciones de hialuronidasas modificadas con PEG de sus respectivas formas no modificadas nativas, por medio de cromatografía de filtración en gel, utilizando una columna Superose 6 (GE/Pharmacia). Se utilizó solución salina tamponada con fosfato como fase móvil para las separaciones, con una velocidad de flujo de 0,2 mL/minuto. La columna se calibró utilizando gel Patrones de Calibración de Filtración en Gel de GE/Pharmacia. Las fracciones que contenían enzimas degradantes de hialuronano separadas se analizaron para determinar la actividad hialuronidasa relativa mediante un ensayo de Turbidez USP modificado, realizado en un formato de microtitulación. El volumen de retención pico (tiempo) para la actividad de la enzima hialuronidasa rHuPH20 que se fracciona a través de una columna de filtración en Superose 6, se desplazó de aproximadamente 16 mL (aproximadamente 60 a 80 kD de peso molecular aparente) para la hialuronidasa sin modificar, a aproximadamente 10 mL (peso molecular aparente de más de 100.000 KD a aproximadamente 670.000 KD) para la hialuronidasa modificada con PEG. La modificación con PEG puede desplazar completamente, aparentemente toda la actividad de la enzima medible a las formas modificadas de mayor peso molecular, cuando el exceso molar de PEG se hace reaccionar con la enzima.

A continuación, los autores de la presente invención examinaron la actividad enzimática de diversas enzimas nativas y modificadas utilizando una zimografía (análisis de la actividad degradante de glicosaminoglicanos por electroforesis en gel de sustrato). Brevemente, los geles del zimograma de SDS-PAGE que contenían hialuronano se fundieron y se realizaron ensayos esencialmente de acuerdo con el procedimiento descrito previamente por Miura RO, et. al. Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (zymography). Anal Biochem. 1 Mar 1995;225(2):333-40.

La Hialuronidasa rHuPH20 nativa mostró una actividad degradante-hialuronano en los geles del zimograma en forma de una sola banda con un peso molecular aparente de aproximadamente 60 kDa. Modificaciones con PEG de la hialuronidasa rHuPH20 dieron como resultado un desplazamiento en la actividad de degradación de hialuronano en los geles del zimograma con señales enzimáticamente activas a aproximadamente 180 kDa, y con al menos 2 bandas adicionales que tienen actividad enzimática con masas moleculares superiores a 200 kDa.

Estos y otros resultados descritos en la presente memoria demuestran que las glicosaminoglicanasas se pueden modificar eficazmente por PEGilación (que se puede utilizar para alterar los perfiles farmacocinéticos y/u otros) utilizando cualquiera de una amplia variedad de reactivos de PEG, y que las enzimas resultantes pueden retener la actividad enzimática sustancial haciéndolas útiles en cualquiera de variedad de aplicaciones diferentes -

especialmente aplicaciones in vivo u otras aplicaciones en las que puede resultar útil la modificación de la enzima para prolongar su vida media.

Ejemplo 21-B: Versiones PEGiladas ilustrativas de hialuronidasas no humanas

Aunque las hialuronidasas recombinantes humanas son particularmente preferidas para aplicaciones en las que la enzima está siendo utilizado en asociación con las células humanas, e incluso más particularmente cuando está siendo aplicada a o dentro del organismo humano, las técnicas ilustradas en la presente memoria también se pueden emplear para generar versiones mejoradas farmacocinéticamente de otras enzimas hialuronidasa que pueden tener aplicación adecuada en ciertos contextos o entornos. Por lo tanto, mediante la aplicación de metodologías como las que se ilustran en la presente memoria y se describen en la técnica para otras enzimas hialuronidasa, los autores de la presente invención han generado una serie de enzimas modificadas que están PEGiladas (que se pueden utilizar para mejorar su farmacocinética, como se ilustra más arriba) y, sin embargo retienen una actividad enzimática sustancial. Con fines ilustrativos, las metodologías descritas e ilustradas en la presente memoria se han aplicado a una serie de diferentes enzimas hialuronidasa ilustrativas "no humanas", incluyendo una hialuronidasa de origen animal ilustrativa, una hialuronidasa de origen bacteriano ilustrativa, y una condroitinasa de origen bacteriano ilustrativa que tiene actividad hialuronidasa. Las versiones pegiladas de tales hialuronidasas no humanas, como se describe en la presente memoria, se pueden utilizar para proporcionar de manera efectiva una vida media prolongada (p. ej., tras la administración intravenosa u otra administración in vivo).

Como ejemplo ilustrativo de una hialuronidasa de origen animal no humano, los autores de la presente invención han generado versiones PEGiladas de la hialuronidasa testicular ovina (disponibles como Vitrase™ de ISTA Pharmaceuticals). Vitrase (hialuronidasa para inyectables, Liofilizada, Ovina NDC 67425-001-01, 6200 Unidades USP/vial), adquirido de los productos farmacéuticos ISTA, fue una donación de un oftalmólogo. Las soluciones de Vitrase se prepararon mediante la reconstitución de Vitrase liofilizado con inyección de cloruro de sodio USP al 0,9% (Baxter).

Como ejemplo ilustrativo de una hialuronidasa de origen bacteriano no humana, los autores de la presente invención han generado versiones PEGiladas de hialuronidasa bacteriana disponibles como Hyaluronate Lyase de Sigma. Hyaluronate Lyase de *Streptomyces hyalurolyticus* o de otra especie, Número CAS 9001-54-1, Número EC 4.2.2.1) (674 unidades/vial) se adquirió de Sigma. La Hyaluronate Lyase se reconstituyó con solución salina tamponada con fosfato filtrada estéril. Véase, por ejemplo, Ohya, T., y Kaneko, Y. *Biochim. Biophys. Acta* 198, 607, (1970).

Como ejemplo ilustrativo de una condroitinasa no humana que tiene actividad hialuronidasa, los autores de la presente invención han generado versiones PEGiladas de condroitinasa ABC bacteriana (disponible como condroitinasa ABC de Associates of Cape Cod, Inc. Seikagaku Corporation). condroitinasa ABC de *Proteus vulgaris* (condroitin ABC lyase, condroitin ABC eliminase, Número CE: 4.2.2.4, Número CAS: 9024-13-9, Núm. de cat. 100330 o 10033) se adquirió de Associates of Cape Cod Inc. Las soluciones de condroitinasa ABC se prepararon en solución de BSA al 0,1%. Las referencias incluyen: (1) Yamagata, T., et al., *J. Biol. Chem.*, 243, 1523 (1968); (2) Saito, H., et al., *J. Biol. Chem.*, 243, 1536 (1968); (3) Suzuki, S., et al., *J. Biol. Chem.*, 243, 1543 (1968); y (4) Oike, Y., et al., *J. Biol. Chem.*, 257, 9751 (1982).

Como reactivo de PEG ilustrativo, se utilizó un Butanoato de Succinimidilo-mPEG (disponible como mPEG-SBA (30 kD) de Nektar). Si bien mPEG-SBA-30K (éster de N-hidroxisuccinimidilo de ácido metoxi-poli(etilenglicol)-butanoico, PM medio ponderal 30.000, Núm. Cat 2M450R01), se utilizó para este ejemplo, también se pueden utilizar otros ésteres de N-hidroxisuccinimidilo de metoxi-poli(etilenglicol) de cualquier peso molecular o ésteres de N-hidroxisuccinimidilo de poli(etilenglicol) de cualquier peso molecular, o PEG-aldehídos de cualquier tamaño, o PEG-carbonatos de cualquier tamaño, u otros reactivos PEG de Nektar, u otros reactivos de pegilación. Véase, por ejemplo, Zalipsky, S y C Lee, "Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications" J. M. Harris, ed., Plenum, NY, 1992, véase el capítulo 21.

Para la generación de versiones PEGiladas ilustrativas de hialuronidasas de origen animal, se reconstituyó un vial de hialuronidasa testicular ovina (Vitrarse) con 0,62 mL de solución salina al 0,9% (10 unidades/microlitro), y se transfirieron 0,3 mL de la solución de enzima reconstituida a un tubo estéril. El reactivo PEG ilustrativo, mPEG-SBA-30K (9,9 mg), se añadió al tubo que contenía la solución de Vitrase, se mezcló el tubo hasta que todo el mPEG pareció entrar en disolución, y a continuación la mezcla se hizo reaccionar durante aproximadamente 16 horas a 4 grados C, mezclando.

Para la generación de versiones PEGiladas ilustrativas de hialuronidasas derivadas de bacterias, se reconstituyó una ampolla de Hyaluronate Lyase de Sigma con 0,7 mL de solución salina tamponada con fosfato filtrada en condiciones estériles (~ 1 unidad/microlitro), y se transfirieron 0,3 mL de la solución de enzima reconstituida a un tubo estéril. El reactivo PEG ilustrativo, mPEG-SBA-30K (9,8 mg), se añadió al tubo que contenía la solución de Hyaluronate Lyase, el tubo se mezcló a continuación hasta que todo el mPEG pareció estar en disolución, y la

mezcla se hizo reaccionar durante aproximadamente 16 horas a 4 grados C, mezclando.

Para la generación de versiones PEGiladas ilustrativas de condroitinasa de origen bacteriano que tiene actividad hialuronidasa, se reconstituyó un vial de condroitinasa ABC (10 unidades) con 0,2 mL de solución salina al 0,9%, y se añadió el reactivo de PEG ilustrativo, mPEG-SBA-30K (12,4 mg), al vial que contenía la solución de condroitinasa ABC, y se mezcló hasta que todo mPEG parecía estar en disolución, y la mezcla se hizo reaccionar durante aproximadamente 11 horas a 4 grados C, mezclando.

Los análisis iniciales incluían la aplicación de SDS-PAGE para examinar las enzimas modificadas en comparación con los controles sin modificar. Brevemente, se visualizó la proteína total con azul de Coomassie o tinción con plata después de la separación a través de geles de Tris/acetato de etilo NuPage del 3% al 8% (Invitrogen). Los pesos moleculares de bandas coloreadas se determinaron mediante comparación con proteínas patrón de masa conocida que se hicieron correr sobre el mismo gel.

Los resultados con Vitrase fueron los siguientes: (A) Vitrase (sin modificar), 5 bandas de aproximadamente los siguientes pesos moleculares (kDa): 90, 80, 63, 50 y 40; (B) PEG-Vitraxe, 7 bandas de aproximadamente los siguientes pesos moleculares (kDa): 150, 180 y cinco bandas de más de 200.

Los resultados con condroitinasa ABC fueron los siguientes: (A) condroitinasa ABC (sin modificar), 6 bandas de aproximadamente los siguientes pesos moleculares (kDa): 100, 80, 50, 38, 33 y 30; (B) PEG-condroitinasa ABC, 8 o más bandas de aproximadamente los siguientes pesos moleculares (kDa): de una a dos bandas entre 150-200 y seis o más bandas de más de 200.

Los resultados con Hyaluronate Lyase fueron los siguientes: (A) Hyaluronate Lyase (sin modificar), una banda de aproximadamente el siguiente peso molecular (kDa): 35; (B) PEG-Hyaluronate Lyase, cuatro o más bandas de aproximadamente los siguientes pesos moleculares (kDa): más de 200.

Como se ha demostrado, el polietilenglicol activado (p. ej., mPEG-SBA-30K (éster de N-hidroxisuccinimidilo de ácido metoxi-poli(etilenglicol)butanoico, PM promedio 30.000), se puede aplicar a la hialuronidasa ovina (p. ej., Vitrase), las condroitinasa ABC bacterianas (p. ej., de *Proteus vulgaris*), o las hialuronato liasas bacterianas (p. ej., de *Streptomyces hyalurolyticus*), para inducir cambios químicos en las preparaciones de enzima que produce nuevas moléculas de mayor masa molecular promedio, que estarían asociados con la generación de versiones PEGiladas de estas enzimas. La caracterización adicional de estos productos proporcionó una evidencia adicional de que las enzimas no solo pueden ser efectivamente PEGiladas, sino de que los productos de enzimas resultantes pueden exhibir una actividad sustancial enzimática en la degradación del hialuronano - lo que demuestra que la PEGilación se puede aplicar a estos diversos tipos de enzimas (que se pueden utilizar para alterar sus perfiles farmacocinéticos mientras que al mismo tiempo conservan una actividad enzimática sustancial).

A continuación los autores de la presente invención realizaron una filtración en gel de los productos de enzimas modificadas seguido de la actividad enzimática de las proteínas fraccionadas. Brevemente, siguiendo mecanismos conocidos en la técnica, se realizaron separaciones de hialuronidasas modificadas con PEG de sus respectivas formas no modificadas nativas, por medio de cromatografía de filtración en gel, utilizando una columna Superose 6 (GE/Pharmacia). Se utilizó solución salina tamponada con fosfato como fase móvil para las separaciones, con una velocidad de flujo de 0,2 mL/minuto. La columna se calibró utilizando Patrones de Calibración de Filtración en Gel de GE/Pharmacia. Las fracciones que contenían enzimas degradantes de hialuronano separadas se sometieron a ensayo para determinar la actividad hialuronidasa relativa mediante un ensayo de Turbidez USP modificado, realizado en un formato de microtitulación. El pH y el tampón utilizados para analizar la actividad de cada una de las enzimas de degradación de hialuronano sometidas a ensayo, fueron los descritos en la literatura, para cada enzima específica.

El volumen de retención pico (tiempo) para la actividad enzimática de hialuronidasa ovina (p. ej., Vitrase) se fraccionó a través de una columna de filtración en gel Superose 6, se desplazó de 15,5 mL (aproximadamente 60 a 80 kD de peso molecular aparente) para la hialuronidasa ovina nativa, a 9,5 mL (mayor de 100.000 KD a aproximadamente 670.000 KD de peso molecular aparente) para la hialuronidasa ovina modificada con PEG. La modificación con PEG puede desplazarse aparentemente de forma completa toda la actividad de la enzima medible a las formas de mayor peso molecular modificadas, cuando el exceso molar de PEG se hace reaccionar con la enzima ovina.

El volumen de retención de pico (tiempo) para la actividad de la enzima Hyaluronate Lyase bacteriana nativa fue de aproximadamente 16 mL (aproximadamente de 50 a 70 kD de peso molecular aparente) después de la inyección. La Hyaluronate Lyase modificada con PEG fraccionada mediante filtración en gel demostró que no había actividad de la enzima en ninguna de las fracciones. La falta de actividad enzimática medible incluía las fracciones donde la actividad Hyaluronate Lyase nativa es normalmente medible, lo que sugiere que la modificación con peg afectaba negativamente a la función de la enzima.

La condroitinasa ABC modificada con PEG demostró una actividad máxima de la enzima a aproximadamente 11 mL y 13 mL después de la inyección (aproximadamente entre 200 y 600 kD de peso molecular aparente), y de nuevo a aproximadamente 16 mL después de la inyección (aproximadamente 50 a 70 kD de peso molecular aparente). La condroitinasa ABC nativa tiene actividad enzimática solo a aproximadamente 16 mL después de la inyección. Estos datos sugieren que la condroitinasa ABC se había modificado con PEG, con un mantenimiento de la actividad enzimática tan alta como las moléculas de masa molecular nativa.

La filtración en gel se puede utilizar para estimar el grado de modificación con Peg de las enzimas degradantes de hialuronano; y el análisis de la actividad enzimática de las preparaciones fraccionadas se puede utilizar para evaluar el efecto que la modificación con PEG tiene sobre la actividad enzimática de las enzimas de degradación de hialuronano, con respecto a la actividad total y la masa molecular de los constituyentes que demuestran la actividad enzimática.

A continuación, los autores de la presente invención examinaron la actividad enzimática de diversas enzimas nativas y modificadas utilizando la zimografía (análisis de la actividad degradante de glicosaminoglicanos por electroforesis en gel de sustrato). Brevemente, los geles del zimograma de SDS-PAGE que contenían hialuronano se fundieron y se realizaron análisis esencialmente de acuerdo con el procedimiento descrito previamente por Miura RO, et. al. Analysis of glycosaminoglycan-degradin enzymes by substrate gel electroforesis (zymography). Anal Biochem. 1 Mar 1995; 225 (2): 333-40.

La hialuronidasa ovina nativa demuestra actividad degradante de hialuronano en geles de zimograma que identifican principalmente 2 bandas de actividad a aproximadamente 60 KD y 90 KD con algunas manchas de actividad enzimática entre esos pesos moleculares. No se demuestra actividad de la enzima mayor de 100 KD. La modificación con PEG de hialuronidasa ovina demuestra un desplazamiento en la actividad de degradación de hialuronano en geles de zimograma con señales enzimáticamente activas a aproximadamente 150 KD, y con al menos 2 bandas adicionales que tienen actividad de la enzima con masas moleculares mayores de 200 KD.

La condroitinasa ABC nativa demostró una sola banda de actividad de degradación de hialuronano en geles de zimograma, lo que demuestra una masa molecular de aproximadamente 80 a 90 por KD. La modificación con PEG de la condroitinasa ABC demuestra un desplazamiento en la actividad de degradación de hialuronano en geles de zimograma con señales enzimáticamente activas a aproximadamente 180 KD, y con al menos una banda adicional de actividad con una masa molecular mayor de 200 KD.

De ese modo, el análisis mediante zimografía confirmó que una hialuronidasa de origen animal ilustrativa (Vitrase) y una condroitinasa de origen bacteriano ilustrativa que tiene actividad hialuronidasa (Condroitinasa ABC) pueden ser modificadas por PEGilación (que se puede utilizar para alterar su perfil farmacocinético como se ha ilustrado anteriormente con respecto a hialuronidasa humana recombinante) y que las enzimas modificadas resultantes todavía pueden mostrar una actividad enzimática sustancial.

Como apreciarán los expertos en la técnica a la vista de los ejemplos anteriores, otras hialuronidasas (tanto humanas como otras versiones recombinantes descritas en la presente memoria, así como otras hialuronidasas animales no humanas o bacterianas, procarióticas u otras, así como condroitinasas) pueden ser modificadas del mismo modo mediante cualquiera de una variedad de reactivos de PEG como los conocidos en la técnica o recién descubiertos, para generar enzimas modificadas que tienen perfiles farmacocinéticos y/u otros perfiles alterados que los hacen útiles para aplicaciones concretas.

Ejemplo 22 - Uso ilustrativo de una sHASEGP para promover la propagación de un agente farmacológico de molécula pequeña in vivo

Como ejemplo ilustrativo de la utilización de composiciones de sHASEGP de la presente invención para promover la propagación o difusión de agentes farmacológicos hacia y dentro de órganos y tejidos en un mamífero, los autores de la presente invención evaluaron el uso de rHuPH20 para promover la penetración de la dexametasona ("dex", un agente anti-inflamatorio utilizado como un agente farmacológico de molécula pequeña ilustrativo) en los tejidos del ojo de mamíferos in vivo.

Para la inyección de agentes tales como anestésicos en el ojo de los mamíferos, las rutas periorbitales comúnmente utilizadas para lograr bloqueos anestésicos incluyen inyecciones peribulbares, retrobulbares y sub-Tenon. Para este ejemplo ilustrativo, los autores de la presente invención compararon las inyecciones sub-Tenon de dex, con o sin la administración concomitante de sHASEGP, en el espacio episcleral, y a continuación examinaron las concentraciones de dex dentro de los tejidos de la parte posterior del ojo, particularmente la coroides y las capas de la retina, que son importantes dianas farmacológicas pero a menudo son difíciles de alcanzar de manera eficiente con agentes farmacológicos.

Se emplearon conejos New Zealand macho de color rojo (aproximadamente 2,1 a 3,2 kg) y se colocaron bajo

- anestesia general utilizando inyecciones intramusculares de clorhidrato de cetamina (21 mg/kg) y clorhidrato de xilazina (5,25 mg/kg). Se utilizó proparacaína al 0,5% tópica para anestesiar la superficie ocular. Las pupilas se dilataron con tropicamida al 1% y fenilefrina al 2,5%. Después de abrir la conjuntiva del ojo derecho de cada conejo con unas tijeras Vannas, se insertó la punta de una cánula anestésica tri-puerto Medez (Eagle Laboratories, Rancho Cucamonga, CA) en el espacio episcleral y se inyectaron 1,5 mL de cualquiera de dex sola (American Pharmaceutical Partners, n = 18) o dex más sHASEGP (3000 unidades de rHCTPH20, n = 18) adyacente al polo posterior del ojo. Se colocó un aplicador con punta de algodón en el sitio de entrada conjuntival para evitar la salida de fluido.
- 5 A las 1, 2, 3 ó 6 horas de la inyección, los conejos se anestesiaron como se describió anteriormente y se sacrificaron mediante una inyección intracardiaca de pentobarbital de sodio (120 mg/kg). Después de la eutanasia, se tomó 1 mL de muestra de sangre y los dos ojos fueron enucleados de cada animal. Inmediatamente después de la enucleación, se recogió una muestra de 2 mL de humor acuoso a través de paracentesis de la cámara anterior con jeringa de tuberculina de cada ojo. Tras la eliminación del segmento anterior de los ojos enucleados, se retiró 1 mL de muestra
- 10 vitrea y se colocó en tubos Eppendorf marcados. El resto del ojo fue disecado y se utilizó una trefina de 6 mm (Fine Science Tools, Foster City, CA) para perforar la muestra de tejido inferior a la del nervio óptico donde se había inyectado el fármaco en el lado extraescleral. Desde el tejido perforado se raspó la retina con una cuchilla roma y se colocó en el tubo etiquetado como coroides.
- 15 Se utilizó la espectrometría de masas para evaluar los niveles de dex en los tejidos estando los límites mínimos cuantificables en el orden de 5 ng/mL. Para las muestras de la coroides y la retina, se añadió un tampón que contenía base Tris 50 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 9,0, al tejido de manera que la concentración final fue de 20 mg/mL. El tejido se rompió utilizando un homogeneizador ultrasónico (BioLogics, Inc., modelo 150 V/T) durante 5-15 segundos. Las muestras de producto homogeneizado de tejido, el fluido vítreo, el fluido acuoso, y el plasma fueron analizados
- 20 por el siguiente procedimiento. Las muestras que contenían dexametasona y prednisolona como patrón interno (I.S.) se extrajeron con metil t-butil éter mediante mezclado por vórtice durante cinco minutos. Las capas orgánica y acuosa se separaron mediante centrifugación a 1.300 g durante cinco minutos, la capa acuosa se congeló a -70°C durante quince minutos, y la capa orgánica se vertió en nuevos tubos y se evaporó bajo una corriente de nitrógeno a 40°C. El residuo se reconstituyó con agua:acetoniitrilo (50:50 v/v). Las muestras tratadas se analizaron mediante
- 25 cromatografía líquida de alta resolución utilizando una columna Phenomenex Synergy Polar RP mantenida a 45°C. La fase móvil se nebulizó utilizando nitrógeno calentado en una fuente/interfaz ZSpray y los compuestos ionizados se detectaron utilizando un espectrómetro de masas cuadrupolar en tándem. Las alturas máximas de dexametasona y prednisolona fueron adquiridas e integradas utilizando el soporte lógico MassLynx™, Micromass, Beverly, MA. Las curvas de calibración se obtuvieron mediante el ajuste de las proporciones de altura de los picos pico de los
- 30 patrones con respecto al patrón interno a una ecuación de poder en MassLynx™. La ecuación de la curva de calibración se utilizó a continuación para interpolar la concentración de dexametasona en las muestras utilizando sus proporciones de altura de los picos.
- 35 Los resultados del espectro de masas revelaron que los niveles de dexametasona en la coroides, la retina y el humor vítreo de conejos tratados con Dex sola alcanzan concentraciones pico en el primer punto temporal (es decir, 1 hora después de la inyección); mientras que las concentraciones de dex en de la coroides y la retina de conejos que recibieron sHASEGP concomitante eran más altas y continuaban aumentando en el segundo punto temporal (es decir, 2 horas después de la inyección). Las concentraciones pico en la coroides, la retina y el humor vítreo fueron
- 40 aproximadamente 10 veces, 5 veces y 8 veces mayores, respectivamente, en los tejidos que habían sido tratados con sHASEGP, y las áreas bajo la curva (AUC) fueron también al menos 50% mayores.
- 45 Estos resultados indican que la administración de sHASEGP se puede utilizar para mejorar sustancialmente el suministro de agentes farmacológicos tales como dex, incluso en tejidos relativamente difíciles de alcanzar in vivo, tales como segmentos en la parte posterior del ojo de los mamíferos. Además, puesto que la capa escleral relativamente gruesa forma una barrera de tejido entre el espacio de la inyección sub-Tenon y la coroides y las capas de la retina elegidas como diana, los altos niveles de agente farmacológico suministrado en las últimas capas indican que sHASEGP se puede utilizar para promover eficazmente el suministro de agentes farmacológicos a través de capas de tejido dentro del organismo.
- 50 En el caso de la promoción del suministro transescleral, la sHASEGP por lo tanto se puede aplicar en un procedimiento mínimamente invasivo para promover el suministro de agentes utilizados para tratar las afecciones que afectan a la parte posterior del ojo que son de particular interés en numerosas situaciones de enfermedad ocular. Esto puede proporcionar, por ejemplo, una ruta de suministro menos invasiva para el tratamiento de la neovascularización coroidea (p. ej., mediante la administración de esteroides), la degeneración macular y otras
- 55 enfermedades que afectan a estos tejidos que se tratan típicamente mediante inyección intravítrea. Existe una amplia variedad de agentes que actualmente se utilizan para estas afecciones, tales como, pero no limitados a, dexametasona, triamcinolona, Macugen™, y antagonistas de VEGF.
- 60

Además de las actividades enzimáticas de sHASEGP que contribuyen a la propagación en el contexto de las rutas

de suministro tales como a través de inyección sub-Tenon, también se cree que la introducción de la sHASEGP en un volumen de fluido que llena o distiende el espacio del tejido de una forma efectiva que se inyecta genera presiones hidrostáticas positivas que sirven para impulsar aún más el suministro de los fluidos, y los agentes comprendidos en ellos, en los tejidos circundantes (p. ej., promoviendo el transporte convectivo).

5 Ejemplo 23 - Uso ilustrativo de una sHASEGP para reducir la presión del fluido intersticial tumoral promoviendo de ese modo la susceptibilidad de un tumor a agentes farmacológicos antitumoral

10 Como se ha descrito e ilustrado en la presente memoria, las sHASEGP se pueden utilizar para generar canales intersticiales que pueden aumentar el flujo de fluido y facilitar el suministro de agentes farmacológicos y de otro tipo a los sitios al tejido deseado in vivo. Los tumores presentan un problema diana particularmente importante para numerosos agentes farmacológicos conocidos y desarrollados regularmente, especialmente antineoplásicos, antimetabolitos, antiangiogénicos y diversos agentes citotóxicos y citostáticos. Los desafíos asociados con el direccionamiento de tales agentes farmacológicos a los sitios tumorales in vivo se ven agravados por el hecho de que muchos tumores presentan presiones intersticiales elevadas que tienden a impedir la infusión de los agentes farmacológicos administrados, en particular en los sitios profundos dentro de una masa tumoral. Se cree que las sHASEGP pueden reducir esta impedancia, y por lo tanto facilitar el suministro de cualquiera de una variedad de agentes farmacológicos conocidos y recién desarrollados a tumores, haciéndolos de ese modo más sensibles y más tratable por una dosis dada de un agente farmacológico. En estos aspectos, se ha demostrado que las sHASEGP de la presente invención son capaces de promover la formación de canales intersticiales y mejorar la dispersión de los marcadores de diferentes tamaños como se describió anteriormente. Además, los autores de la presente invención han observado que las sHASEGP se pueden utilizar para aumentar la conductividad hidráulica de los tejidos intersticiales más de diez veces.

25 Como confirmación de estos principios en el contexto de las células tumorales, la aplicación de una sHASEGP ilustrativa (rHuPH20, 50 unidades) a las células tumorales in vitro dio como resultado la eliminación sustancial de las matrices pericelulares, que se cree que contribuyen de manera importante a la presión del fluido intersticial tumoral elevada.

30 Además, la administración de rHuPH20 in vivo, en un modelo de xenoinjerto de tumor humano, dio como resultado una reducción significativa en la presión del fluido intersticial del tumor en el plazo de una hora desde la administración.

35 Como se describe en la descripción detallada de la invención anterior, las sHASEGP de la presente invención se pueden aplicar combinadas con cualquiera de los numerosos agentes antitumorales conocidos o desarrollados recientemente para su uso en el tratamiento de varios tipos de cáncer.

Ejemplo 24 - Uso ilustrativo de una sHASEGP para mejorar la farmacocinética de una macromolécula suministrada por medio de inyección parenteral no i.v.

40 Como se discutió anteriormente, las sHASEGP se pueden utilizar para modular la farmacocinética de agentes farmacológicos conocidos o desarrollados recientemente y otros agentes por, ejemplo, facilitando su absorción y/o distribución en el organismo. Tales parámetros farmacocinéticos mejorados se pueden utilizar a su vez ser para mejorar la farmacodinámica de un agente en particular (p. ej., reducción de la toxicidad local disminuyendo la cantidad de un agente que queda cerca del lugar de la inyección y/o aumentar la eficacia incrementando la cantidad de un agente suministrado a (y/o a través de) una diana deseada). Alternativamente, puesto que las sHASEGP se pueden utilizar para conducir eficazmente la dispersión de un agente farmacológico administrado localmente (p. ej., a través de un sitio de inyección y en el torrente sanguíneo), también es posible utilizar la sHASEGP para mejorar esencialmente la farmacocinética de la absorción y alcanzar una farmacodinámica similar con una cantidad reducida de agente aplicado.

55 Como un ejemplo ilustrativo del uso de sHASEGP para mejorar la farmacocinética de un fármaco macromolecular que normalmente se administra por inyección parenteral no intravenosa, los autores de la presente invención combinaron PH20 humana recombinante (rHuPH20) con una versión pegilada de interferón alfa 2b (PEG-INTRON™ disponible de Schering-Plough). El PEG-INTRON es una macromolécula de aproximadamente 31 kD que se administra típicamente por inyección subcutánea para el tratamiento del virus de la hepatitis C (VHC) (generalmente combinado con el fármaco de molécula pequeña ribavirina). Al igual que muchas macromoléculas administradas por vía subcutánea, el PEG-INTRON se absorbe de manera relativamente lenta y una porción sustancial del agente nunca llega a la circulación sanguínea, con una biodisponibilidad del orden de 50-60%. Además, una fracción sustancial de pacientes (típicamente más de la mitad) desarrolla diversas reacciones en el sitio de la inyección, presumiblemente como resultado de o exacerbadas por las concentraciones locales retenidas del agente farmacológico. Como apreciarán los expertos en la técnica, las consecuencias de tal farmacocinética son múltiples; e incluyen no solo el "desaprovechamiento" del agente atrapado cerca del sitio de la inyección, sino también reacciones frente al compuesto metabolizado a localmente.

Los autores de la presente invención administraron PEG-INTRON marcado con Yodo-125 por medio de diferentes rutas de administración, con o sin administración concomitante de rHuPH20, para examinar los efectos de rHuPH20 en los parámetros farmacocinéticos del PEG-INTRON. Para determinar la biodisponibilidad absoluta de rHuPH20, los autores de la presente invención también midieron los parámetros farmacocinéticos de PEG-INTRON administrado por administración intravenosa.

Brevemente, se dividieron dieciocho ratas Sprague-Dawley (cada una con un peso aproximado de 225-250 gramos) en tres grupos de seis animales cada uno. A un primer grupo se le administró artículo de ensayo (es decir, PEG-INTRON marcado con I-125) mediante administración intravenosa (1,5 microgramos/kg en un volumen de 100 microlitros a través de inyección en la vena de la cola). La actividad específica del interferón marcado con I-125 era de 55 μCi /microgramo. Las muestras de sangre (100 microlitros) se recogieron antes de la dosis y a las 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 y 120 horas de la dosificación y se procesó para la cuantificación del fármaco marcado por recuento gamma (expresado como cuentas por minuto (CPM) por gramo de plasma). A un segundo grupo de seis animales se le administró una dosis y un volumen equivalentes de artículo de ensayo por inyección intradérmica en un lugar afeitado y preparado sobre la parte posterior del cuello, y las muestras de sangre se procesaron como para el primer grupo. A un tercer grupo de seis animales se le administró una dosis equivalente de artículo de ensayo mezclado con rHuPH20 (100 I.U.) en un volumen combinado de 100 microlitros por inyección intradérmica como en el grupo anterior, y las muestras de sangre se procesaron a continuación como para los grupos uno y dos. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 24-1 a continuación.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Halozyme Therapeutics, Inc.
 BOOKBINDER, Louis H.
 KUNDU, Anirban
 FROST, Gregorio I.
 HALLER, Michael F.
 KELLER, Gilbert A.
 10 DYLAN, Tyler M.
 <120> Glicosaminoglicanasas solubles y métodos de preparación y uso de glicosaminoglicanasas solubles
 <130> Halo1340-3WO
 <140> Estados Unidos 11/238.171
 <141> 2005-09-27
 15 <150> Estados Unidos 11/065.716
 <151> 2005-02-23
 <160> 53
 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
 20 <210> 1
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 25 <221> CARBOHYD
 <222> 82, 166, 235, 254, 368, 393, 490
 <400> 1
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
 100 105 110
 Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro

```

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

```

```

<210> 2
<211> 35
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

```

```

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
          35

```

```

10 <210> 3
<211> 474
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3

```

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

ES 2 557 818 T3

```

          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> 5
 <211> 482
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

5

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
  1              5              10              15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
              20              25              30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
              35              40              45
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> 6

<211> 1530

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) ... (1530)

10 <223> Glicoproteína Hialuronidasa anclada a GPI PH-20

<400> 6

```

atg gga gtg cta aaa ttc aag cac atc ttt ttc aga agc ttt gtt aaa 48
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
  1          5          10          15

tca agt gga gta tcc cag ata gtt ttc acc ttc ctt ctg att cca tgt 96
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
          20          25          30

tgc ttg act ctg aat ttc aga gca cct cct gtt att cca aat gtg cct 144
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
          35          40          45

ttc ctc tgg gcc tgg aat gcc cca agt gaa ttt tgt ctt gga aaa ttt 192
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
          50          55          60

gat gag cca cta gat atg agc ctc ttc tct ttc ata gga agc ccc cga 240
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65          70          75          80

ata aac gcc acc ggg caa ggt gtt aca ata ttt tat gtt gat aga ctt 288
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
          85          90          95

ggc tac tat cct tac ata gat tca atc aca gga gta act gtg aat gga 336
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly

```

ES 2 557 818 T3

100					105					110					
gga atc ccc cag aag att tcc tta caa gac cat ctg gac aaa gct aag	Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys	115	120	125	384										
aaa gac att aca ttt tat atg cca gta gac aat ttg gga atg gct gtt	Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val	130	135	140	432										
att gac tgg gaa gaa tgg aga ccc act tgg gca aga aac tgg aaa cct	Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro	145	150	155	480										
aaa gat gtt tac aag aat agg tct att gaa ttg gtt cag caa caa aat	Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn	165	170	175	528										
gta caa ctt agt ctc aca gag gcc act gag aaa gca aaa caa gaa ttt	Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe	180	185	190	576										
gaa aag gca ggg aag gat ttc ctg gta gag act ata aaa ttg gga aaa	Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys	195	200	205	624										
tta ctt cgg cca aat cac ttg tgg ggt tat tat ctt ttt ccg gat tgt	Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys	210	215	220	672										
tac aac cat cac tat aag aaa ccc ggt tac aat gga agt tgc ttc aat	Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn	225	230	235	720										
gta gaa ata aaa aga aat gat gat ctc agc tgg ttg tgg aat gaa agc	Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser	245	250	255	768										
act gct ctt tac cca tcc att tat ttg aac act cag cag tct cct gta	Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val	260	265	270	816										
gct gct aca ctc tat gtg cgc aat cga gtt cgg gaa gcc atc aga gtt	Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val	275	280	285	864										
tcc aaa ata cct gat gca aaa agt cca ctt ccg gtt ttt gca tat acc	Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr	290	295	300	912										
cgc ata gtt ttt act gat caa gtt ttg aaa ttc ctt tct caa gat gaa	Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu	305	310	315	960										
ctt gtg tat aca ttt ggc gaa act gtt gct ctg ggt gct tct gga att	Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile	325	330	335	1008										
gta ata tgg gga acc ctc agt ata atg cga agt atg aaa tct tgc ttg	Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu				1056										

ES 2 557 818 T3

	340		345		350	
ctc cta gac aat tac atg gag act ata ctg aat cct tac ata atc aac						1104
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn						
	355		360		365	
gtc aca cta gca gcc aaa atg tgt agc caa gtg ctt tgc cag gag caa						1152
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln						
	370		375		380	
gga gtg tgt ata agg aaa aac tgg aat tca agt gac tat ctt cac ctc						1200
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu						
	385		390		395	400
aac cca gat aat ttt gct att caa ctt gag aaa ggt gga aag ttc aca						1248
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr						
		405		410		415
gta cgt gga aaa ccg aca ctt gaa gac ctg gag caa ttt tct gaa aaa						1296
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys						
		420		425		430
ttt tat tgc agc tgt tat agc acc ttg agt tgt aag gag aaa gct gat						1344
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp						
		435		440		445
gta aaa gac act gat gct gtt gat gtg tgt att gct gat ggt gtc tgt						1392
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys						
	450		455		460	
ata gat gct ttt cta aaa cct ccc atg gag aca gaa gaa cct caa att						1440
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile						
	465		470		475	480
ttc tac aat gct tca ccc tcc aca cta tct gcc aca atg ttc att gtt						1488
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val						
		485		490		495
agt att ttg ttt ctt atc att tct tct gta gcg agt ttg taa						1530
Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu *						
	500		505			

5 <210> 7
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

10 <221> CARBOHYD
 <222> 82, 166, 235, 254, 368, 393, 490
 <400> 7

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys															
1				5				10					15		
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys															
			20					25					30		
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro															
		35					40						45		

ES 2 557 818 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 Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
 500 505

ES 2 557 818 T3

<210> 8
<211> 34
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador inverso para generar ancla de GPI que carece de N483 y que termina en Y482 con sitio BamHI en el extremo 5'
<400> 8
10 aattggatcc atttgagggt tcagtagaaa cttc 34

<210> 9
<211> 33
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador inverso para generar ancla de GPI que carece de Y482 y que termina en F481 con sitio BamHI en el extremo 5'
<400> 9
20 aattggatcc tcagaaaatt tgagggtctt ctg 33

<210> 10
<211> 34
<212> ADN
25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador inverso para generar ancla de GPI que carece de F481 y que termina en I480 con sitio BamHI en el extremo 5'
<400> 10
30 aattggatcc tcaaattga ggttctctg tctc 34

<210> 11
<211> 32
<212> ADN
35 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador inverso para generar ancla de GPI que carece de I480 y que termina en Q479 con sitio BamHI en el extremo 5'
<400> 11
40 aattggatcc tcttctgtct tcattgaggt cc 32

<210> 12
<211> 32
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador inverso para generar ancla de GPI que carece de Q479 y que termina en P478 con sitio BamHI en el extremo 5'
<400> 12
50 aattggatcc tcaaggttct tctgtctcca tg 32

<210> 13
<211> 31
<212> ADN
55 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador inverso para generar ancla de GPI que carece de P478 y que termina en E477 con sitio BamHI en el extremo 5'
<400> 13
60 aattggatcc gtctccatgg tcattctct g 31

<210> 14
<211> 32
<212> ADN

ES 2 557 818 T3

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo con sitio de restricción NheI en el extremo 5 '
 <400> 14

5 aattgctagc atgggagtg ctaaaattcaa gc 32

<210> 15
 <211> 1473
 <212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) ... (1473)

15 <223> sHASEGPup hasta P478 e etiquetado con His

<400> 15

atg gga gtg cta aaa ttc aag cac atc ttt ttc aga agc ttt gtt aaa 48
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15

tca agt gga gta tcc cag ata gtt ttc acc ttc ctt ctg att cca tgt 96
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30

tgc ttg act ctg aat ttc aga gca cct cct gtt att cca aat gtg cct 144
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45

ttc ctc tgg gcc tgg aat gcc cca agt gaa ttt tgt ctt gga aaa ttt 192
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60

gat gag cca cta gat atg agc ctc ttc tct ttc ata gga agc ccc cga 240
 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80

ES 2 557 818 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

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

5

10

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 Gly Ser
 465 470 475 480
 Gly Ser Gly Ala His His His His His His
 485 490

<210> 17
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

5

ES 2 557 818 T3

<223> Cebador SpacerHisFor
<400> 17
ataattggat cgggttctgg tgctcacat caccatcac 39

5 <210> 18
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

10 <223> Cebador SpacerHisRev
<400> 18
tataattgcg gccgcctaataat ggtgatggg atggtgag 38

15 <210> 19
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

20 <223> Cebador inverso 3' sin codón de parada para generar producto de truncamiento HIS-sHASEGP que carece de ancla de GPI y termina en N 483
<400> 19
aatggatcca ttgtagaaaa tttgaggttc 30

25 <210> 20
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

30 <223> Cebador inverso 3' sin codón de parada para generar producto de truncamiento HIS-sHASEGP que carece de ancla de GPI y que termina en Y 482
<400> 20
aatggatccg tagaaaattt gaggttcttc 30

35 <210> 21
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

40 <223> Cebador inverso 3' sin codón de parada para generar producto de truncamiento HIS-sHASEGP que carece de ancla de GPI y que termina en F 481
<400> 21
aattggatcc gaaaatttga ggttctctg 30

45 <210> 22
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

50 <223> Cebador inverso 3' sin codón de parada para generar producto truncamiento HIS-sHASEGP que carece de ancla de GPI y que termina en I 480
<400> 22
attggatcca attgaggtt ctctgtctc 30

55 <210> 23
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

60 <223> Cebador inverso 3' sin codón de parada para generar producto truncamiento HIS-sHASEGP que carece de ancla de GPI y que termina en Q 479
<400> 23
aattggatcc ttgaggttct tctgtctcc 29

<210> 24

ES 2 557 818 T3

<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
5 <223> Cebador inverso 3' sin codón de parada para generar producto truncamiento HIS-sHASEGP que carece de ancla de GPI y que termina en P 478
<400> 24
aattggatcc aggttcttct gctccatg 29

10 <210> 25
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
15 <223> Cebador inverso 3' sin codón de parada para generar producto de truncamiento HIS-sHASEGP que carece de ancla de GPI y que termina en E 477
<400> 25
aattggatcc ttcttctgtc tccatggg 28

20 <210> 26
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
25 <223> Cebador inverso para amplificar el mutante por delección de sHASEGP que termina en A 467
<400> 26
aattggatcc ctaagcatct atacagacac catcag 36

30 <210> 27
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador inverso para amplificar sHASEGP mutante de delección que termina en A 447
35 <400> 27
aattggatcc ctaagcttct tcctacaac tcaag 35

40 <210> 28
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador inverso para amplificar el mutante por delección sHASEGP que termina en S 430
<400> 28
45 aattggatcc ctaagaaaat tgctccaggt ctcc 34

50 <210> 29
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador inverso para amplificar el mutante por delección de sHASEGP que termina en G 413
<400> 29
aattggatcc ctatccacct ttctcaagtt gaatag 36

55 <210> 30
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
60 <223> Cebador inverso para amplificar el mutante por delección de sHASEGP que termina en S 394
<400> 30
aattggatcc ctatgaattc cagttttcc ttatac 36

ES 2 557 818 T3

<210> 31
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> Cebador inverso para amplificar el mutante por delección de sHASEGP que termina en A 372
<400> 31
aattggatcc ctatgctagt gtgacgttga ttatg 35

10 <210> 32
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
15 <223> Cebador inverso para amplificar mutante por delección de sHASEGP que termina en S 347
<400> 32
aattggatcc ctaactcgc attatactga ggg 33

20 <210> 33
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
25 <223> Cebador directo LN para la mutagénesis dirigida al sitio para generar la fusión de sHASEGP con el líder
kappa con L 36 como primer aminoácido de sHASEGP después del líder kappa
<400> 33
ctgaatttca gacacctcc tgttattcc 29

30 <210> 34
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
35 <223> Cebador directo FR para la mutagénesis dirigida al sitio para generar la fusión de sHASEGP con el líder
kappa con F 38 como primer aminoácido de sHASEGP después del líder kappa
<400> 34
ttcagagcac ctctgttat tccaaatg 28

40 <210> 35
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
45 <223> Cebador inverso Asp para la mutagénesis dirigida al sitio para generar la fusión sHASEGP con el líder kappa
con Asp como último aminoácido líder Kappa antes de 36 L o F 38 de PH-20
<400> 35
gtcaccagtg gaacctgaa ccc 23

50 <210> 36
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
55 <223> Cebador inverso Gly para la mutagénesis dirigida al sitio para generar la fusión sHASEGP con el líder kappa
con Gly como último aminoácido líder Kappa antes de 36 L o F 38 de PH-20
<400> 36
accagtggaa Agag cctggaacc 24

60 <210> 37
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador directo para el primer fragmento del líder kappa

<400> 37
gagacagaca cactcctgct atgggtactg 30

5 <210> 38
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador inverso para el primer fragmento del líder kappa

10 <400> 38
cccagagcag cagtacccat agcaggagtg 30

<210> 39
<211> 30
15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador directo por el segundo fragmento del líder kappa

20 <400> 39
ggtactgctg ctctgggttc caggtccac 30

<210> 40
<211> 27
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador inverso para el segundo fragmento del líder kappa

30 <400> 40
gcgtcaccag tggaacctgg aaccag 27

<210> 41
<211> 30
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador directo Nhe para el líder kappa

<400> 41
attgctagca tggagacaga cacactcctg 30

40 <210> 42
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

45 <223> Cebador inverso EcoR1 para el líder kappa
<400> 42
aattgaattc gtcaccagtg gaacctgg 28

<210> 43
50 <211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia líder de la cadena IgK de ratón

55 <400> 43
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Asp
20

<210> 44
<211> 30
60 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

ES 2 557 818 T3

<220>
<223> Cebador directo SPE 1 líder K
<400> 44
actcactagt gctagcatgg agacagacac 30

5

<210> 45
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Cebador INV MLU1 líder K
<400> 45
aattacgcgt gaattcgta ccagtggaac 30

15

<210> 46
<211> 462
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Proteína de fusión con el líder Kappa de sHASEGP con F 38 como primer aminoácido de la supuesta sHASEGP secretada madura (hasta P478)
<400> 46

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

ES 2 557 818 T3

```

<210> 47
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> Cebador 3' BAM REV sHASEGP con ancla de GPI hasta L 509 incluyendo PARADA
<400> 47
aattggatcc aatgataaga ctacagaaga aacaaaatac 40

10 <210> 48
<211> 1449
<212> de ADN
<213> Homo sapiens
<400> 48
atggggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaate aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcttc tgggcctgga atgccccaaag tgaattttgt 180
cttgaaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccga 240
ataaacgccca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatctt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatggtt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaaaca gaatttgaag aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcaactataag aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa 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 ctacgagcca aaatgtgtag ccaagtgtt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatcttct gaaaaatctt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
15 ttctactaa 1449

<210> 49
<211> 467
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens
<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
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe

```

ES 2 557 818 T3

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															
465																	

ES 2 557 818 T3

<210> 50
 <211> 1.536
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 50
 atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtggagta 60
 tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
 cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgcccacag tgaattttgt 180
 cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccga 240
 ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
 tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
 caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatctt atatgccagt agacaatttg 420
 ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
 aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttgggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
 ctacagaggg ccaactgagaa agcaaaaaca gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
 gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatcct 660
 tttccggatt gttacaacca tcactataag aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
 gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tgggtgtgga atgaaagcac tgetctttac 780
 ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
 cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttcgggtt 900
 tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
 cttgtgtata catttggcga aactgttgcct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
 accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgccttgcctc tagacaatta catggagact 1080
 atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aatgtgtag ccaagtgcct 1140
 tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
 aaccagata attttgcctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
 ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatctt attgacagctg ttatagcacc 1320
 ttgagttgta aggagaaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
 gatgggtgct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaat 1440
 ttctacaatg cttcacctc cacactatct gccacaatgt tcatttggag gctggaagtc 1500
 tgggatcaag gtattagcag aattggtttc ttctga 1536

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

10 <220>
 <223> vector plasmídico HZ24
 <400> 51
 tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
 ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
 aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttaa taatagtaat caattacggg 180
 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
 gcctggctga ccgccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
 ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcg cccctattg acgtcaatga 420
 cggtaaatgg cccgctggc attatgcccc gtacatgacc ttacgggact ttctacttg 480
 gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcgggttt ggcagtacac 540
 caatgggctg ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccatgacgt 600
 caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataacce 660
 cgcccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc 720
 tcgtttagtg aaccgtcaga toactagaag ctttattgcg gtagtattac acagttaaat 780
 tgctaacgca gtcagtgcct ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc 840
 gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa 900
 actgggcttg tcgagacaga gaagactcct gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac 960
 tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020
 aggctagagt acttaatacg actcaactata ggctagcatg ggagtgctaa aattcaagca 1080
 catctttttc agaagctttg ttaaatacaag tggagatcct cagatagttt tcaccttct 1140
 totgattcca tgttgattga ctctgaattt cagaccct cctgttattc caaatgtgcc 1200
 tttcctctgg ccctggaatg ccccaagtga atttgtctt ggaaaatttg atgagccact 1260
 15 agatagagc ctcttctctt tcataggaag cccccgaata aacgccaccg ggcaagggtg 1320

tacaatattt	tatggtgata	gacttggeta	ctatccttac	atagattcaa	tcacaggagt	1380
aactgtgaat	ggaggaatcc	cccagaagat	ttccttacia	gaccatctgg	acaagctaa	1440
gaaagacatt	acattttata	tgccagtaga	caatttgga	atggctgta	ttgactggga	1500
agaatggaga	cccacttggg	caagaaactg	gaaacctaaa	gatgtttaca	agaataggtc	1560
tattgaattg	gttcagcaac	aaaatgtaca	acttagctctc	acagaggcca	ctgagaaagc	1620
aaaacaagaa	tttgaaaagg	caggggaagga	tttcctggta	gagactataa	aattgggaaa	1680
attacttcgg	ccaaatcact	tgtgggggta	ttatcttttt	ccggattggt	acaaccatca	1740
ctataagaaa	cccggttaca	atggaagttg	cttcaatgta	gaaataaaaa	gaaatgatga	1800
tctcagctgg	ttgtggaatg	aaagcactgc	tctttaccca	tccattttatt	tgaacactca	1860
gcagctctct	gtagctgeta	cactctatgt	gcgcaatcga	gttcgggaag	ccatcagagt	1920
ttocaaaata	cctgatgcaa	aaagtccact	tccggttttt	gcatataacc	gcatagtttt	1980
tactgatcaa	gttttgaaat	tcctttctca	agatgaactt	gtgtatacat	ttggcgaaac	2040
tgttgctctg	gggtgctctg	gaattgtaat	atggggaaacc	ctcagtataa	tgcgaagtat	2100
gaaatcttgc	ttgctcctag	acaattacat	ggagactata	ctgaatcctt	acataatcaa	2160
cgtcacacta	gcagccaaaa	tgtgtagcca	agtgtcttgc	caggagcaag	gagtgtgtat	2220
aaggaaaaac	tgggaattcaa	gtgactatct	tcacctcaac	ccagataatt	ttgctattca	2280
acttgagaaa	gggtggaaagt	tcacagtagc	tggaaaaccg	acacttgaag	acctggagca	2340
attttctgaa	aaattttatt	gcagctgta	tagcaccttg	agttgtaagg	agaaagctga	2400
tgtaaaagac	actgatgctg	ttgatgtgtg	tattgtctgt	gggtgctgta	tagatgcttt	2460
tctaaaacct	cccattggaga	cagaagaacc	tcaaattttc	tactgaggat	ccatagctaa	2520
cgccccctctc	cctccccccc	ccctaacggt	actggccgaa	gccgcttggg	ataaaggccg	2580
tgtgctgttg	tctatatggt	attttccacc	atattgccc	cttttggcaa	tgtgagggcc	2640
cggaaaacctg	gccctgtctt	cttgacgagc	attcctaggg	gtctttcccc	tctcgccaaa	2700
ggaatgcaag	gtctgttgaa	tgtcgtgaag	gaagcagttc	ctctggaagc	ttcttgaaga	2760
caaacaacgt	ctgtagcgac	cctttgcagg	cagcggaaacc	ccccacctgg	cgacaggtgc	2820
ctctgcccggc	aaaagccacg	tgtataagat	acacctgcaa	aggcggcaca	accccagtg	2880
cacgttgtga	gttggatagt	tgtggaaaga	gtcaaatggc	tctcctcaag	cgtattcaac	2940
aaggggctga	aggatgcccc	gaaggtagcc	cattgtatgg	gatctgatct	ggggcctcgg	3000
tgcacatgct	ttacatgtgt	ttagtgcagg	ttaaaaaaac	gtctaggccc	cccgaaccac	3060
ggggcagctg	ttttcctttg	aaaaacacga	tgataagctt	gccacaacc	acagcggccg	3120
ctgccatcat	gggttcgacca	ttgaactgca	tcgtgcctgt	gtcccaaat	atggggattg	3180
gcaagaacgg	agacctacc	tggcctccgc	tcaggaacga	gttcaagtac	ttccaaagaa	3240
tgaccacaac	ctcttcagtg	gaaggtaaac	agaatctggt	gattatgggt	aggaaaacct	3300
ggttctccat	tcttgagaag	aatcgacctt	taaaggacag	aattaatata	gttctcagta	3360
gagaactcaa	agaaccacca	cgaggagctc	attttcttgc	caaaagtttg	gatgatgcct	3420
taagacttat	tgaacaaccg	gaattggcaa	gtaaagtaga	catggtttgg	atagtcggag	3480
gcagttctgt	ttaccaggaa	gccatgaatc	aaccaggcca	cctcagactc	tttgtgacaa	3540
ggatcatgca	ggaatttgaa	agtgcacagt	ttttcccaga	aattgatttg	gggaaatata	3600
aacttctccc	agaataccca	ggcgtcctct	ctgaggtcca	ggaggaaaaa	ggcatcaagt	3660
ataagtttga	aagtaaccag	aagaaagact	aaacgcgtgg	tacctctaga	gtcgaccggg	3720
gcggccgctt	cgagcagaca	tgataagata	cattgatgag	tttgacaaaa	ccacaactag	3780
aatgcagtga	aaaaaatgct	ttatttgtga	aatttgtgat	gctattgctt	tatttghtaac	3840
cattataagc	tgcaataaac	aagttaacaa	caacaattgc	attcatttta	tgtttcaggt	3900
tcagggggag	atgtggggag	ttttttaaag	caagtaaaac	ctctacaaat	gtggtaaaat	3960
cgataaaggat	ccgggctggc	gtaatagcga	agaggcccgc	accgatcgcc	cttcccaaca	4020
gttgcgcagc	ctgaaatggc	aatggacgcg	ccctgtagcg	gcgcatatag	cgcgggcggt	4080
gtggtgggta	cgcgcagcgt	gaccgctaca	cttgccagcg	ccctagcgcc	cgtccttttc	4140
gctttcttcc	cttcttttct	cgccacgctc	gcccgttttc	cccgtcaage	tctaaatcgg	4200
gggctccctt	tagggttccg	atttagtgct	ttacggcacc	tcgaccccaa	aaaacttgat	4260
taggtgatg	gttcacgtag	tgggcatcg	ccctgataga	cggtttttcg	ccctttgacg	4320
ttggagtcca	cgctctttaa	tagtggactc	ttgttccaaa	ctggaacaac	actcaacctt	4380
atctcggctc	attcttttga	tttataaggg	attttgccga	tttcggccta	ttggttaaaa	4440
aatgagctga	tttaacaaaa	athtaacgcg	aattttaaca	aaatattaac	gcttacaatt	4500
tctgatgctg	gtattttctc	cttacgcctc	tgtgcgggat	ttcacaccgc	atatgggtgca	4560
ctctcagtac	aatctgctct	gatgccgat	agttaagcca	gccccgacac	ccgccaacac	4620
ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccggcatc	cgcttacaga	caagctgtga	4680
ccgtctccgg	gagctgcatg	tgtcagaggt	tttcaaccgtc	atcacccgaaa	cgcgcgagac	4740
gaaagggcct	cgtgatacgc	ctatttttat	aggttaatgt	catgataata	atggtttctt	4800
agacgtcagg	tggcactttt	cggggaaatg	tgcgcggaac	ccctatttgt	ttatttttct	4860
aaatacattc	aaatatglat	ccgctcatga	gacaataacc	ctgataaatg	cttcaataat	4920

attgaaaaag	gaagagtatg	agtattcaac	atctccgtgt	cgcccttatt	cccttttttg	4980
cggcattttg	ccttcctggt	tttgetcacc	cagaaacgct	ggtgaaagta	aaagatgctg	5040
aagatcagtt	gggtgcacga	gtgggttaca	togaactgga	tctcaacagc	ggtaagatcc	5100
ttgagagttt	tgcgcccgaa	gaacgttttc	caatgatgag	cactttttaa	gttctgctat	5160
gtggcgcggt	attatcccgt	attgacgccg	ggcaagagca	actcggtcgc	cgcatacact	5220
attctcagaa	tgacttgggt	gagtactcac	cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	5280
tgacagtaag	agaattatgc	agtgctgcca	taaccatgag	tgataaacact	gcggccaaact	5340
tacttctgac	aacgatcggg	ggaccgaagg	agctaaccgc	ttttttgcac	aacatggggg	5400
atcatgtaac	tgccttgat	cgttgggaac	cggagctgaa	tgaagccata	ccaaacgacg	5460
agcgtgacac	cacgatgcct	gtagcaatg	caacaacggt	gcgcaaaacta	ttaactggcg	5520
aactacttac	tctagcttcc	cggcaacaat	taatagactg	gatggaggcg	gataaagtgt	5580
caggaccact	tctgcctcgc	gcccttccgg	ctggctgggt	tattgctgat	aaatctggag	5640
ccggtgagcg	tgggtctcgc	ggtatcattg	cagcactggg	gccagatggt	aagccctccc	5700
gtatcgtagt	tatctacacg	acggggagtc	aggcaactat	ggatgaacga	aatagacaga	5760
tcgctgagat	aggtgcctca	ctgattaagc	attggtaact	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	aaaaaaaaacca	ccgctaccag	cggtggtttg	tttgccggat	caagagctac	6060
caactctttt	tccgaaggta	actggcttca	gcagagcgca	gataccaaat	actgttcttc	6120
tagtgtagcc	gtagttaggc	caccacttca	agaactctgt	agcaccgcct	acatacctcg	6180
ctctgctaag	cctgttacca	gtggctgctg	ccagtggcga	taagtctgtg	cttaccgggt	6240
tggactcaag	acgatagtta	ccggataaag	cgcagcggtc	gggctgaacg	gggggttcgt	6300
gcacacagcc	cagcttggag	cgaacgacct	acaccgaact	gagataccta	cagcgtgagc	6360
tatgagaaag	cgccacgctt	cccgaaggga	gaaaggcggg	caggtatccg	gtaagcggca	6420
gggtcggaac	aggagagcgc	acgagggagc	ttccaggggg	aaacgcctgg	tatctttata	6480
gtcctgtcgg	gtttcgccac	ctctgacttg	agcgtcgatt	tttgtgatgc	tcgtcagggg	6540
ggcggagcct	atggaaaaac	gccagcaacg	cggccttttt	acggttctctg	gccttttgct	6600
ggccttttgc	tcacatggct	cgacagatct				6630

- <210> 52
- <211> 2009
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 52

5

atgtggctca	cataaattca	gaaagtatga	tagcagtgta	ggtgggttagc	agcacctcat	60
aaggtccttc	ctagcaaggc	aaagggatgc	taatgactag	ccaatgctct	aggaagacat	120
tgagaccagc	caacttcttg	ccttgataac	tactgaagag	acattgggtg	gctggatttt	180
gaaagcagac	ttctggttat	aggtgatgca	acttgaaaaa	caatcctgaa	acatgaaaca	240
agaataataa	tatttaaagt	taacttaatc	attatacctc	tttatccatc	aaagtgaatt	300
cattccattc	cctttcatct	gtgctcatac	tttgcacag	atattgggta	aaccaaagtg	360
tgtaggaaga	aataaatggt	ttcatagtca	ttactcttta	caatgggagt	gctaaaattc	420
aagcacatct	ttttcagaag	ctttgttaa	tcaagtggag	tatcccagat	agttttcacc	480
ttccttctga	ttccatgttg	cttgactctg	aatttcagag	cacctcctgt	tattccaaat	540
gtgcctttcc	tctgggcctg	gaatgcccc	agtgaatttt	gtccttgaaa	at ttgatgag	600
ccactagata	tgagcctctt	ctctttcata	ggaagcccc	gaataaacgc	caccgggcaa	660
ggtgttacia	tattttatgt	tgatagactt	ggctactatc	cttacctaga	ttcaatcaca	720
ggagtaactg	tgaatggagg	aatccccag	aagatttctt	tacaagacca	tctggacaaa	780
gctaagaaag	acattacatt	ttatatgcca	gtagacaatt	tgggaatggc	tgttattgac	840
tgggaagaat	ggagaccac	ttgggcaaga	aactggaaac	ctaaagatgt	ttacaagaat	900
aggtctattg	aattggttca	gcaacaaaat	gtacaactta	gtctcacaga	ggccactgag	960
aaagcaaac	aagaatttga	aaaggcaggg	aaggatttcc	tggtagagac	tataaaattg	1020
ggaaaattac	ttcggccaaa	tcacttgtgg	ggttattatc	ttttccggga	ttgttacaac	1080
catcactata	agaaaccggg	ttacaatgga	agttgcttca	atgtagaaat	aaaaagaaat	1140
gatgatctca	gctgggtgtg	gaatgaaagc	actgctcttt	acccatccat	ttat ttgaaac	1200
actcagcagt	ctcctgtagc	tgctacactc	tatgtgcgca	atcgagttcg	ggaagccatc	1260
agagtttcca	aaatacctga	tgcaaaaagt	ccacttccgg	tttttgcata	taccgcgata	1320
gtttttactg	atcaagtttt	gaaattcctt	tctcaagatg	aacttgtgta	tacatttggc	1380

ES 2 557 818 T3

gaaactggtg	ctctgggtgc	ttctggaatt	gtaatatggg	gaaccctcag	tataatgcga	1440
agtatgaaat	cttgcttgct	cctagacaat	tacatggaga	ctatactgaa	tccttacata	1500
atcaacgtca	cactagcagc	caaaatgtgt	agccaagtgc	tttgccagga	gcaaggagtg	1560
tgtataagga	aaaactggaa	ttcaagtgc	tatcttcacc	tcaaccaga	taattttgct	1620
attcaacttg	agaaaggtgg	aaagttcaca	gtacgtggaa	aaccgacact	tgaagacctg	1680
gagcaatfff	ctgaaaaatt	ttattgcagc	tgttatagca	ccttgagttg	taaggagaaa	1740
gctgatgtaa	aagacactga	tgctgtgat	gtgtgtattg	ctgatggtgt	ctgtatagat	1800
gcttttctaa	aacctcccat	ggagacagaa	gaacctcaaa	ttttctacaa	tgcttcaccc	1860
tccacactat	ctgccacaat	gttcattggt	agtatfctgt	ttcttatcat	ttcttctgta	1920
gcgagtttgt	aattgcgcag	gtagctgaa	atgaacaata	tgtccatctt	aaagtgtgct	1980
ttttcgacta	attnaatctt	tgaaaagaa				2009

- <210> 53
- <211> 2395
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 53

5

atgtggctca	cataaattca	gaaagtatga	tagcagtgtg	ggtggtagc	agcacctcat	60
aaggctcttc	ctagcaaggg	atgctaata	ctagccaatg	ctctaggaag	acattgagac	120
cagccaactt	cttgcttga	taactactga	agagacattg	ggtggctgga	ttttgaaagc	180
agacttctgg	ttataggtga	tgcaacttga	aaaacaatcc	tgaaacatga	aacaagaata	240
ataatattta	aatgtaactt	aatcattata	cctctttatc	catcaaagtg	aattcattcc	300
attccctttc	atctgtgctc	atactttgca	tcagatattg	ggtaaaccac	agtgtgtagg	360
aagaaataaa	tgttttcata	gtcattactc	tttacaatgg	gagtgtctaa	attcaagcac	420
atctttttca	gaagctttgt	taaatcaagt	ggagtatccc	agatagtttt	caccttccct	480
ctgattccat	gttgcttgac	tctgaatttc	agagcacctc	ctgttattcc	aatgtgtcct	540
ttcctctggg	cctggaatgc	cccaagtga	ttttgtcttg	gaaaatttga	tgagccacta	600
gatatgagcc	tcttctcttt	cataggaagc	ccccgaataa	acgccaccgg	gcaagggtgt	660
acaatatttt	atgttgatag	acttggtctc	tatccttaca	tagattcaat	caacaggtgta	720
actgtgaatg	gaggaatccc	ccagaagatt	tccttacaag	accatctgga	caaagctaag	780
aaagacatta	cattttatat	gccagtagac	aatttgaggaa	tggtgtttat	tgactgggaa	840
gaatggagac	ccacttgggc	aagaaactgg	aaacctaaag	atgtttacaa	gaataggtct	900
attgaattgg	ttcagcaaca	aaatgtacaa	cttagtctca	cagaggccac	tgagaaagca	960
aaacaagaat	ttgaaaaggc	agggaaaggt	ttcctggtag	agactataaa	attgggaaaa	1020
ttacttccgc	caaatcactt	gtgggtttat	tatctttttc	cggattgtta	caaccatcac	1080
tataagaaac	ccggttacia	tggaagtgtc	ttcaatgtag	aaataaaaag	aatgatgat	1140
ctcagctggg	tggtgaaatga	aagcactgct	ctttaccat	ccatttattt	gaacactcag	1200
cagtctcctg	tagctgctac	actctatgtg	cgcaatcgag	ttcgggaagc	catcagagtt	1260
tccaaaatac	ctgatgcaaa	aagtccactt	ccggtttttg	catatacccg	catagttttt	1320
actgatcaag	ttttgaaatt	cctttctcaa	gatgaacttg	tgtatacatt	tgccgaaact	1380
gttgctctgg	gtgcttctgg	aattgttaata	tggggaacct	tcagtataat	gcgaagtatg	1440
aaatcttggc	tgctcctaga	caattacatg	gagactatac	tgaatcctta	cataatcaac	1500
gtcacactag	cagccaaaat	gtgtagccaa	gtgctttgcc	aggagcaagg	agtgtgtata	1560
aggaaaaact	ggaattcaag	tgactatctt	cacctcaacc	cagataattt	tgctattcaa	1620
cttgagaaag	gtggaaagt	cacagtacgt	ggaaaaccga	cacttgaaga	cctggagcaa	1680
ttttctgaaa	aattttattg	cagctgttat	agcaccttga	ggtgtaagga	gaaagctgat	1740
gtaaaagaca	ctgatgctgt	tgatgtgtgt	attgctgatg	gtgtctgtat	agatgctttt	1800
ctaaaacctc	ccatggagac	agaagaacct	caaattttct	acaatgcttc	accctccaca	1860
ctatctgcc	caatgttcat	ttggaggctg	gaagtctggg	atcaaggat	tagcagaatt	1920
ggtttctctt	gagagtcag	agggaaaaat	gtgtttcagg	cctcttccct	tggtttacag	1980
gaaatgaaaa	aacctagact	atcatcacca	acatccttgg	gtattaagtg	cagtcactct	2040
cctagatgct	gtggggagaa	ggcaagttac	aaagatagac	cttccctcaa	gataatcaga	2100
ttttcatggg	attatcctta	acctttttga	catcatggag	gctttgggaa	tctgatgaag	2160
cctatcaatt	ttcttccaga	agatatttat	ataagattat	aagaaaaatt	atgtacacag	2220
cttattttat	tgcatgggat	caaaatgcc	tttataaaga	attatgcctt	ttccatcaat	2280
tttagcatgg	aaaaataatt	tcaggcaata	tgcttaaaaa	ttgggggaag	acaaaagaaa	2340
tccatctcgt	gtaaaataaa	ataaattttg	gttttgctca	aaaaaaaaaa	aaaaa	2395

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica, que comprende una glicoproteína hialuronidasa humana soluble PEGilada en un portador farmacéutico, en donde:
- 5 la composición farmacéutica se formula para su uso en la administración intravenosa;
 la hialuronidasa contiene de tres a seis radicales PEG por polipéptido;
 la hialuronidasa es activa a pH neutro;
 la hialuronidasa es soluble; y
 10 la hialuronidasa es una glicoproteína que contiene al menos un radical azúcar ligado a N, en donde el radical azúcar ligado a N está anclado covalentemente a un residuo de asparragina del polipéptido.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la hialuronidasa comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad de secuencia de al menos 95% con el SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, con la condición de que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 1.
- 15
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la hialuronidasa comprende una secuencia de aminoácidos que comprende mínimamente la secuencia de aminoácidos expuesta como los residuos de aminoácidos 36-464 del SEQ ID NO: 1, con la condición de que el polipéptido no consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 1.
- 20
4. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la hialuronidasa consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta como los aminoácidos 1-483 del SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad de secuencia al menos 95% con los aminoácidos 36-483 del SEQ ID NO: 1.
- 25
5. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la hialuronidasa comprende un residuo de aminoácido C-terminal que se selecciona entre los residuo de aminoácido 477, 478, 479, 480, 481 y 482 en la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 1.
- 30
6. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la hialuronidasa está codificada por una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta como los nucleótidos 106-1446 del SEQ ID NO: 6, o una porción de la misma que codifica un polipéptido catalíticamente activo.
- 35
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en donde la hialuronidasa comprende PH20 humana recombinante (rHuPH20) que es expresada y secretada a partir de células CHO.
- 40
8. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho radicales PEG son ramificados.
- 45
9. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho radicales PEG son el resultado de la reacción con un reactivo de PEG seleccionado entre mPEG-SBA (5 kDa), mPEG-SBA (20 kDa), mPEG-SBA (30 kDa), mPEG-SMB (20 kDa) mPEG-SMB (30 kDa), mPEG-butiraldehído (30 kDa), mPEG-SPA (20 kDa), mPEG-SPA (30 kDa), mPEG2-NHS (10 kDa ramificado), mPEG2-NHS (20 kDa ramificado), mPEG-NHS (40 kDa ramificado), mPEG2-NHS (60 kDa ramificado), PEG-NHS-biotina (5 kDa biotinilado), PEG-p-nitrofenil-carbonato (30 kDa) y PEG-propionaldehído (30 kDa).
- 50
10. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en el aumento del suministro o difusión de un agente farmacológico a un sujeto.
- 55
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en donde el Agente se selecciona entre un agente quimioterapéutico, un agente analgésico, un agente anti-inflamatorio, un agente antimicrobiano, un agente amebicida, un agente tricomonocida, un agente anti-parkinsoniano, un agente anti-malárico, un agente anticonvulsivo, un agente antidepresivo, un agente antiartrítico, un agente anti-fúngico, un agente antihipertensivo, un agente antipirético, un agente antiparasitario, un agente antihistamínico, un agente agonista alfa-adrenérgico, un agente bloqueador alfa, un agente anestésico, un agente dilatador bronquial, un agente biocida, un agente bactericida, un agente bacteriostático, un agente bloqueador beta-adrenérgico, un agente bloqueador del canal de calcio, un agente farmacológico cardiovascular, un agente anticonceptivo, un agente descongestivo, un agente diurético, un agente depresor, un agente de diagnóstico, un agente electrolítico, un agente hipnótico, un agente hormonal, un agente hiperglucémico, un agente relajante muscular, un agente de contracción muscular, un agente oftálmico, un agente parasimpaticomimético, un agente energizante psíquico, un agente sedante, un inductor del sueño, un agente simpaticomimético, un agente tranquilizante, un agente urinario, un agente vaginal, un agente viricida, un agente vitamínico, un agente anti-inflamatorio no esteroideo, un agente inhibidor de la enzima conversora de angiotensina, un polipéptido, una proteína, un ácido nucleico, un fármaco, y una molécula orgánica.
- 60
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en donde el agente se selecciona entre una molécula

detectable u otro agente de diagnóstico, o un agente farmacológica o farmacéuticamente eficaz.

13. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en donde el agente es un agente anti-canceroso o un agente anti-infeccioso.

14. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en donde el agente es un agente farmacológico de modificación de la sangre.

15. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en donde el agente es una molécula o complejo macromolecular de entre 20 nm y 200 nm de diámetro.

16. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en donde el agente se selecciona entre un Adalimumab, Agalsidasa Beta, Aldesleuquina, Alefacept, Ampicilina, Anakinra, Vacuna Antipoliomielítica, Anti-Timocito, Azitromicina, Becaplermina, Caspofungina, Cefazolina, Cefepima, Cefotetan, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cetuximab, Cilastatina, Ácido Clavulánico, Clindamicina, Darbeopetina Alfa, Deaclizumab, Toxoide Diftérico, Efalizumab, Epinefrina, Eritropoyetina Alfa, Etanercept, Filgrastim, Fluconazol, Hormonas estimuladoras del folículo tales como Folitropina Alfa y Folitropina Beta, Fosfenitoína, Fluconazol, Gadodiamida, Gadopentetato, Gatifloxacina, Glatirámicos, GM-CSF, Goserelina, Granisetron, Haemophilus Influenza B, Haloperidol, Vacuna contra Hepatitis A, Vacuna contra Hepatitis B, Ibritumomab Tiuxetano, Inmunoglobulina, Vacuna contra el Virus de la Influenza, Infliximab, Insulina, Insulina Glargina, Interferón Alfa-2a, Interferón Alfa 2b, Interferón Alfacon-1, Interferon Alfa-n3, Interferón Beta, Interferón Beta-la, Interferón Gamma, Iodixanol, Iohexol, Iopamidol, Ioversol, Cetorolaco, Laronidasa, Levofloxacina, Lidocaína, Linezolid, Lorazepam, Vacuna contra el Saerampión, Vacuna contra Virus de Sarampión-Paperas-Rubéola, Medroxiprogesterona, Meropenem, Metilprednisolona, Midazolam, Morfina, Octreotida, Omalizumab, Ondansetrón, Palivizumab, Pantoprazol, Pegaspargasa, Pegfilgrastim, Peg-Interferón Alfa-2a, Peg-Interferón Alfa-2b, Pegvisomant, Vacuna contra la Tosferina, Piperacilina, Vacuna neumocócica y Vacuna neumocócica conjugada, Prometazina, Reteplasa, Somatropina, Sulbactama, Sumatriptán, Tazobactam, Tenecteplasa, Toxoide Purificado del Tétanos, Ticarcilina, Tositumomab, Acetónido de Triamcinolona, Vancomicina, y Vacuna contra la varicela.

17. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, donde el agente es un agente antibiótico o una combinación de agentes seleccionados entre Aminoglucósidos; Anfenicoles; Ansamincinas; Carbacefemos; Carbapenémicos; Cefalosporinas o Cefemos; Cefamicinas; Clavam; Lipopéptidos cíclicos; Diaminopirimidinas; Cetólidos; Lincosamidas; Macrólidos; Monobactamas; Nitrofuranos; Oxacefemos; Oxazolidinonas; Penemos, tienamicinas y betalactamas diversas; Penicilinas; Antibióticos polipeptídicos; Quinolonas; Sulfonamidas; Sulfonas; Tetraciclinas; y otros antibióticos (tales como Clofocoles, Ácidos fusídicos, Hexedinas, Metenaminas, Nitrofurantoínas Nitroxolinas, Ritipenemos, Taurolidinas, Xibomoles).

18. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, donde el agente es un agente anticancerígeno o combinación de agentes seleccionados entre Aclacinomicinas, Actinomicinas, Adriamicinas, Ancitabinas, Antramincinas, Azacitidinas, Azaserinas, 6-Azauridinas, Bisantrenos, Bleomicinas, Cactinomicinas, Carmofur, Carmustinas, Carubicinas, Carzinofilinas, Cromomicinas, Cisplatinos, Cladribinas, Citarabinas, Dactinomicinas, Daunorubicinas, Denopterinas, 6-Díazo-5-Oxo-L-Norleucinas, Doxifluridinas, Doxorubicinas, Edatrexatos, Emitefur, Enocitabinas, Fepirubicinas, Fludarabinas, Fluorouracilos, Gemcitabinas, Idarrubicinas, Loxuridinas, Menogarilos, 6-Mercaptopurinas, Metotrexatos, Mitramincinas, Mitomicinas, Ácidos micofenólicos, Nogalamicinas, Olivomicinas, Peplomincinas, Pirarrubicinas, Piritrexim, Plicamicinas, Porfiromicina, Pteropterinas, Puromincinas, Ácidos retinoicos, Estreptonigrinas, Estreptozocinas, Tagafur, Tamoxifenos, Tiamiprinas, Tioguaninas, Triamcinolonas, Trimetrexatos, Tubercidinas, Vinblastinas, Vincristinas, Zinostatinas, y Zorrubicinas.

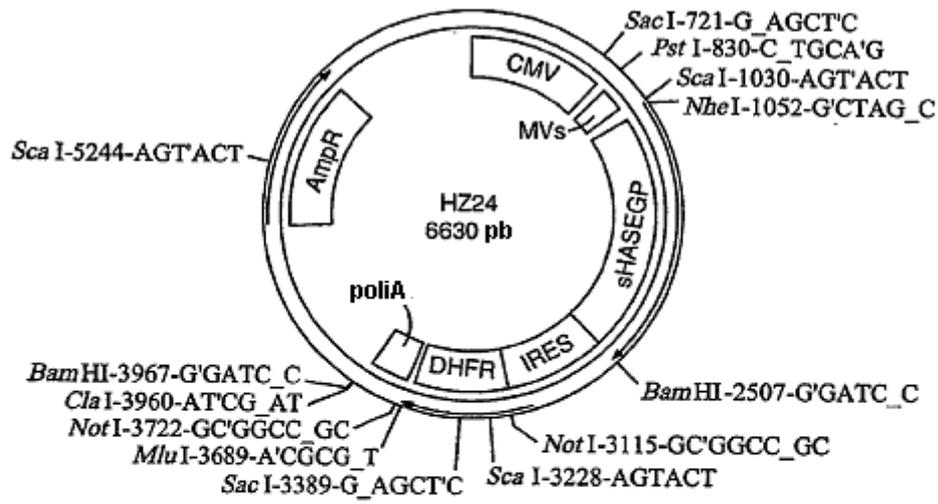
19. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en el tratamiento del cáncer.

20. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 19, donde el cáncer es un tumor invasivo.

21. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en el tratamiento de un trastorno del ojo de mamíferos mediante la inducción de licuefacción del humor vítreo; para su uso en el tratamiento de trastornos que implican un exceso de glicosaminoglicanos por medio de la eliminación de glicosaminoglicanos; o para su uso en el tratamiento de un mamífero que ha tenido un accidente cerebrovascular u otra lesión del SNC mediante el alivio de las consecuencias del accidente cerebrovascular u otra lesión del SNC.

22. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, donde el agente es un anticuerpo.

23. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, donde el agente es un anticuerpo monoclonal.



MAPA DEL VECTOR DEL VECTOR sHASEGP HZ24

FIG. 1