

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 582**

51 Int. Cl.:

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

C12N 9/26 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2012 PCT/US2012/072182**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13102144**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2012 E 12816624 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2797622**

54 Título: **Variantes de polipéptidos de PH20, formulaciones y usos de los mismos**

30 Prioridad:

30.12.2011 US 201161631313 P
01.11.2012 US 201261796208 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WEI, GE;
SHEPARD, H. MICHAEL;
ZHAO, QIPING y
CONNOR, ROBERT JAMES

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

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

ES 2 609 582 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

Variantes de polipéptidos de PH20, formulaciones y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

Se proporcionan polipéptidos de hialuronidasa de PH20 modificados, incluyendo polipéptidos modificados que muestran estabilidad aumentada y/o actividad aumentada. También se proporcionan composiciones y formulaciones y usos de los mismos.

10

Antecedentes

El hialuronano (ácido hialurónico; HA) es un polipéptido que se encuentra en la matriz extracelular de muchas células, especialmente en tejidos conectivos blandos. HA también se encuentra predominantemente en piel, cartílago y en líquido sinovial en mamíferos. El hialuronano también es el constituyente principal del vítreo del ojo. HA tiene un papel en diversos procesos fisiológicos, tales como en homeostasis de proteínas en plasma y agua (Laurent TC *et al.* (1992) FASEB J 6: 2397-2404). Ciertas enfermedades están relacionadas con la expresión y/o producción de hialuronano. Las enzimas degradantes de hialuronano, tales como hialuronidasas, son enzimas que degradan hialuronano. Catalizando la degradación de HA, las enzimas degradantes de hialuronano (por ejemplo, hialuronidasas) pueden usarse para tratar enfermedades o trastornos asociados con la acumulación de HA u otros glucosaminoglucanos. Además, ya que HA es un componente importante de la barrera intersticial, las enzimas degradantes de hialuronano (por ejemplo, hialuronidasas) aumentan la permeabilidad tisular y por lo tanto pueden usarse para aumentar la dispersión y el suministro de agentes terapéuticos. Se han usado terapéuticamente diversas hialuronidasas (por ejemplo, Hydase™, Vitrase™ y Wydase™), típicamente como agentes de dispersión y propagación en combinación con otros agentes terapéuticos. Muchos de estos son formas ovinas o bovinas, que pueden ser inmunogénicas para tratamiento de seres humanos. Se necesitan enzimas degradantes de hialuronano mejoradas, tales como hialuronidasas, y composiciones de las mismas que puedan usarse para el tratamiento.

15

20

25

30

El documento WO2009/128917 describe polipéptidos de hialuronidasa solubles que se modifican por conjugación con un polímero, tal como un resto de PEG, para su uso en el tratamiento de tumores o cánceres. La hialuronidasa puede ser un polipéptido de PH20 soluble.

35

El documento US20100143457 describe polipéptidos truncados en el extremo C terminal particulares de PH20 humana, y polipéptidos de PH20 parcialmente desglucosilados y usos de los mismos.

Arming *et al.* (Eur. J. Biochem. 1997, 247: 810-814) describe la mutagénesis *in vitro* de hialuronidasa PH20 humana de longitud completa para descubrir aminoácidos ácidos y restos de arginina requeridos para actividad enzimática.

40

Sumario

La presente invención proporciona un polipéptido de PH20 modificado, que comprende un reemplazo de aminoácidos en un polipéptido de PH20 no modificado, en el que: el polipéptido de PH20 no modificado consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7 o 32-36; el reemplazo de aminoácidos está en una posición de aminoácido correspondiente a una posición 10, 12, 20, 22, 26, 34, 36, 46, 50, 52, 58, 68, 70, 74, 82, 83, 84, 86, 97, 127, 138, 142, 143, 144, 166, 169, 174, 193, 195, 196, 204, 205, 206, 213, 234, 237, 238, 240, 249, 261, 267, 277, 279, 291, 309, 310, 314, 315, 317, 318, 347, 367, 375, 376, 399, 401, 407, 416, 419, 421, 431, 433, 439, 440, 443 o 445 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3, a condición de que si el polipéptido de PH20 incluye solamente un único reemplazo de aminoácido, el reemplazo no corresponde a los reemplazos de aminoácidos V12A o E249Q en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3; se identifican posiciones de aminoácidos correspondientes por alineamiento del polipéptido de PH20 con el polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 3; el polipéptido de PH20 modificado muestra estabilidad aumentada en presencia de un conservante o conservantes fenólicos en comparación con el polipéptido de PH20 no modificado que no contiene el reemplazo de aminoácidos; la estabilidad aumentada se manifiesta como actividad hialuronidasa aumentada en presencia del conservante o los conservantes fenólicos en comparación con la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 no modificado que no contiene el reemplazo de aminoácidos en presencia del mismo conservante o los mismos conservantes fenólicos, y la actividad se compara en las mismas condiciones.

45

50

55

60

65

Se describen además en el presente documento polipéptidos de PH20 modificados que tienen una propiedad o propiedades alteradas en comparación el polipéptido de PH20 que no tiene la modificación o las modificaciones. Las modificaciones incluyen reemplazo, supresión y/o inserciones de aminoácidos. Se proporcionan en el presente documento estructura/función detallada de prácticamente cada aminoácido en un polipéptido de PH20, así como la identificación de restos y loci que contribuyen a la alteración de una propiedad, tal como estabilidad en condiciones particulares. Por lo tanto, se describen polipéptidos de PH20 modificados que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos que dan como resultado un polipéptido de PH20 que conserva la actividad y/o muestra estabilidad aumentada o alterada en una diversidad de condiciones. La actividad conservada puede ser, por ejemplo, actividad hialuronidasa que es al menos aproximadamente 40 % o menos del polipéptido de PH20 que no incluye el

reemplazo. Son modificaciones ejemplares los reemplazos de aminoácidos. Para fines del presente documento, los reemplazos de aminoácidos se indican por la letra de aminoácido individual seguido de la posición de aminoácido correspondiente en SEQ ID NO: 3 en la que se produce el reemplazo. Los expertos en la materia conocen bien abreviaturas de aminoácidos individuales para restos de aminoácidos (véase, por ejemplo Tabla 1) y se usan en el presente documento a lo largo de la descripción y los ejemplos. Por ejemplo, el reemplazo con P en una posición correspondiente a la posición 204 en un polipéptido de PH20 en referencia a las posiciones de restos de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3 significa que el reemplazo abarca F204P en un polipéptido de PH20 expuesto en SEQ ID NO: 3, o el mismo reemplazo en la posición correspondiente en otro polipéptido de PH20.

Se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 que contienen al menos un reemplazo de aminoácido en un polipéptido de PH20, por el que el polipéptido de PH20 modificado muestra estabilidad aumentada en comparación con el polipéptido de PH20 que no contiene el reemplazo de aminoácidos. La estabilidad aumentada puede manifestarse como resistencia aumentada a una o más condiciones proteicas que son desnaturizantes para proteínas. La estabilidad de PH20 modificada y no modificada se compara en las mismas condiciones. Las condiciones de desnaturización de proteínas ejemplares incluyen, pero sin limitación, temperatura elevada mayor de 30 °C o aproximadamente 30 °C, agitación, baja salinidad, incluyendo esencialmente o sustancialmente o nada de sal, y presencia de excipientes que tienden a desnaturizar proteínas. Son ejemplos de dichos excipientes antiadherente o antiadherentes, aglutinante o aglutinantes, recubrimiento o recubrimientos, carga o cargas y diluyente o diluyentes, saporífero o saporíferos, colorante o colorantes, lubricante o lubricantes, emoliente o emolientes, conservante o conservantes, detergente o detergentes, sorbente o sorbentes y combinaciones de los mismos.

El polipéptido de PH20 modificado puede ser uno en el que la forma no modificada del mismo tiene al menos aproximadamente 68 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 y contiene además modificaciones que alteran la estabilidad y/o pueden ser un polipéptido de PH20 que incluye hasta aproximadamente 100, 110, 120, 130, 150 diferencias de aminoácidos con respecto a PH20 pero conservan la actividad enzimática, particularmente, al menos aproximadamente 40 % de la actividad del polipéptido de PH20 no modificado y muestra estabilidad aumentada, tal como estabilidad en condiciones desnaturizantes. Por lo tanto, se incluyen polipéptidos de PH20 modificados que tienen al menos 68 % o aproximadamente 68 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3. Se incluyen polipéptidos de PH20 modificados que tienen al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3. Son ejemplos de dichos polipéptidos de PH20 modificados polipéptidos que contienen reemplazo o reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de PH20 que contiene la secuencia de restos de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 10, 12, 14, 24, 32-66, 69, 72, 857, 859, 861, 870 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 10, 12, 14, 24, 32-66, 69, 72, 857, 859, 861 u 870.

Por ejemplo, se describe en el presente documento un polipéptido de PH20 modificado que muestra estabilidad aumentada que contiene un reemplazo de aminoácidos en un polipéptido de PH20 que confiere la estabilidad aumentada, en el que la estabilidad aumentada se manifiesta como resistencia aumentada a la desnaturización en presencia de una o más condiciones de desnaturización de proteínas, la estabilidad se aumenta en comparación con el polipéptido de PH20 que no contiene el reemplazo de aminoácidos, y el polipéptido de PH20 no modificado consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 o es un fragmento truncado C terminal del mismo que es un polipéptido de PH20 soluble o tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con el mismo. Como antes, el polipéptido de PH20 modificado que muestra estabilidad aumentada muestra estabilidad aumentada frente a una condición de desnaturización que es temperatura mayor de o aproximadamente 30 °C, agitación; baja o ninguna sal; o presencia de un excipiente o un agente desnaturizante, tal como un antiadherente o antiadherentes, aglutinante o aglutinantes, recubrimiento o recubrimientos, carga o cargas y diluyente o diluyentes, saporífero o saporíferos, colorante o colorantes, lubricante o lubricantes, emoliente o emolientes, conservante o conservantes, detergente o detergentes, sorbente o sorbentes o edulcorante o edulcorantes y una combinación de los mismos, y en particular un conservante. En algunos ejemplos de dichos polipéptidos de PH20 modificados que muestran estabilidad aumentada, la condición de desnaturización es una temperatura mayor de 30 °C, y el polipéptido de PH20 modificado muestra mayor actividad hialuronidasa a la temperatura comparada con el polipéptido de PH20 no modificado que no contiene el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos en los que las actividades se comparan en las mismas condiciones. En otros ejemplos, la condición de desnaturización de proteínas es la presencia de bajas concentraciones de sal de menos de 100 mM, y el polipéptido de PH20 modificado muestra actividad hialuronidasa aumentada en presencia de las concentraciones bajas de sal en comparación con el polipéptido de PH20 no modificado que no contiene el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos donde las actividades se comparan en las mismas condiciones.

En cualquiera de los ejemplos anteriores de un polipéptido de PH20 modificado que muestra estabilidad aumentada, la estabilidad puede evaluarse basándose en una diversidad de parámetros incluyendo actividad hialuronidasa, solubilidad, agregación y/o cristalización. La estabilidad puede evaluarse en presencia de una condición desnaturizante. Cuando se compara la estabilidad de dos o más polipéptidos, la estabilidad se evalúa en las mismas condiciones. En algunos casos, entre los polipéptidos de PH20 proporcionados en el presente documento,

el polipéptido de PH20 modificado muestra al menos 120 %, 130 %, 135 %, 140 %, 145 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 500 %, 1500 %, 2000 %, 3000 %, 4000 %, 5000 % o más de la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 que no contiene el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos.

5 En cualquiera de los ejemplos anteriores de un polipéptido de PH20 modificado que muestra estabilidad aumentada, las condiciones desnaturalizantes incluyen la presencia de excipientes que desnaturalizan proteínas. Es ejemplar de dichas condiciones la presencia de un conservante, tal como un conservante fenólico. Se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 modificados que muestran estabilidad aumentada en presencia de una cantidad antimicrobiana eficaz de uno o más conservantes fenólicos. Una cantidad antimicrobiana eficaz es la cantidad total de uno o más agentes conservantes fenólicos, que pueden expresarse como un porcentaje (%) de la concentración en masa (p/v) que es o está entre (o al menos aproximadamente o aproximadamente) de 0,05 % a 0,6 %, 0,1 % a 0,4 %, 0,1 % a 0,3 %, 0,15 % a 0,325 %, 0,15 % a 0,25 %, 0,1 % a 0,2 %, 0,2 % a 0,3 % o 0,3 % a 0,4 %, inclusive. Los conservantes fenólicos ejemplares incluyen, pero sin limitación, fenol, metacresol (m-cresol), alcohol bencílico y un parabeno, tal como metilparabeno, propilparabeno, m-cresol, fenol o m-cresol y fenol. Son ejemplos de la estabilidad obtenida mediante polipéptidos de PH20 modificados proporcionados que muestran al menos 15 % o aproximadamente 15 % de la actividad hialuronidasa durante al menos 4 horas en presencia de conservante o conservantes en comparación con el polipéptido de PH20 modificado en ausencia de conservante. La actividad se compara en las mismas condiciones excepto por la presencia de conservante o conservantes. Por ejemplo, se proporcionan polipéptidos de PH20 modificados que muestran al menos (o al menos aproximadamente) 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de la actividad hialuronidasa en presencia de un conservante o conservantes fenólicos en comparación con la ausencia del mismo conservante o los mismos conservantes. Por lo tanto, se proporcionan, entre los polipéptidos de PH20 modificados proporcionados en el presente documento, polipéptidos de PH20 que, en virtud del reemplazo o los reemplazos de aminoácidos, son fenofílicos en comparación con polipéptidos de PH20 sin dicho reemplazo. Se incluyen polipéptidos de PH20 modificados en los que la actividad hialuronidasa se muestra después de al menos 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 3 semanas, 4 semanas o más en presencia del conservante o conservantes en comparación con la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 modificado en ausencia de conservante durante el mismo periodo de tiempo y en las mismas condiciones excepto por la presencia de conservante o conservantes.

En ejemplos de un polipéptido de PH20 modificado que muestra estabilidad aumentada frente a un conservante fenólico, puede mostrarse estabilidad aumentada en un conservante fenólico en condiciones de temperatura que incluyen cualquier temperatura entre, por ejemplo, 0 °C y 40 °C, tal como entre o aproximadamente entre 0 °C y 40 °C, 2 °C y 6 °C, 24 °C y 32 °C y 35 °C y 40 °C. Los polipéptidos ejemplares muestran estabilidad aumentada a temperaturas de entre o aproximadamente entre 30 °C y 45 °C, 35 °C y 45 °C, 30 °C y 37 °C, 35 °C y 37 °C y 42 °C, cada uno inclusive. El polipéptido de PH20 modificado particular y las condiciones dependen de la formulación pretendida, las condiciones a las que se expondrá la formulación y/o la aplicación pretendida.

40 Los polipéptidos de PH20 modificados ejemplares y particulares que muestran estabilidad aumentada, tal como estabilidad aumentada frente a un conservante fenólico, incluyen los que contienen una única modificación de aminoácido, tal como un reemplazo, y combinaciones de modificaciones, tales como al menos 1 o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y más modificaciones. Estas incluyen polipéptidos de PH20 modificados que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos, donde al menos un reemplazo está en una posición de aminoácido correspondiente (es decir, por alineamiento) a una posición seleccionada de entre 10, 12, 20, 22, 26, 34, 36, 46, 50, 52, 58, 68, 70, 74, 82, 83, 84, 86, 97, 127, 131, 138, 142, 143, 144, 166, 169, 174, 193, 195, 196, 204, 205, 206, 213, 219, 234, 237, 238, 240, 249, 261, 267, 277, 279, 291, 309, 310, 314, 315, 317, 318, 347, 367, 375, 376, 399, 401, 407, 416, 419, 421, 431, 433, 439, 440, 443 o 445 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3, en las que se identifican posiciones de aminoácidos correspondientes por alineamiento del polipéptido de PH20 con el polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 3. Son ejemplos de dichas modificaciones al menos un reemplazo de aminoácido seleccionado de entre reemplazo con: glicina (G) en una posición correspondiente a la posición 10; K en una posición correspondiente a la posición 12; S en una posición correspondiente a la posición 20; T en una posición correspondiente a la posición 22; M en una posición correspondiente a la posición 26; W en una posición correspondiente a la posición 34; N en una posición correspondiente a la posición 36; L en una posición correspondiente a la posición 46; M en una posición correspondiente a la posición 50; T en una posición correspondiente a la posición 52; S en una posición correspondiente a la posición 52; C en una posición correspondiente a la posición 58; K en una posición correspondiente a la posición 58; R en una posición correspondiente a la posición 58; N en una posición correspondiente a la posición 58; Y en una posición correspondiente a la posición 58; P en una posición correspondiente a la posición 58; H en una posición correspondiente a la posición 58; P en una posición correspondiente a la posición 68; V en una posición correspondiente a la posición 70; E en una posición correspondiente a la posición 74; L en una posición correspondiente a la posición 82; N en una posición correspondiente a la posición 82; V en una posición correspondiente a la posición 83; Q en una posición correspondiente a la posición 83; S en una posición correspondiente a la posición 83; G en una posición correspondiente a la posición 83; N en una posición correspondiente a la posición 84; A en una posición correspondiente a la posición 86; K en una posición correspondiente a la posición 86; E en una posición

correspondiente a la posición 97; L en una posición correspondiente a la posición 97; R en una posición correspondiente a la posición 127; R en una posición correspondiente a la posición 131; L en una posición correspondiente a la posición 138; K en una posición correspondiente a la posición 142; N en una posición correspondiente a la posición 142; P en una posición correspondiente a la posición 142; S en una posición correspondiente a la posición 142; T en una posición correspondiente a la posición 142; G en una posición correspondiente a la posición 143; K en una posición correspondiente a la posición 143; T en una posición correspondiente a la posición 144; Q en una posición correspondiente a la posición 166; T en una posición correspondiente a la posición 166; L en una posición correspondiente a la posición 169; G en una posición correspondiente a la posición 174; N en una posición correspondiente a la posición 174; Q en una posición correspondiente a la posición 193; T en una posición correspondiente a la posición 195; N en una posición correspondiente a la posición 195; E en una posición correspondiente a la posición 196; R en una posición correspondiente a la posición 196; P en una posición correspondiente a la posición 204; A en una posición correspondiente a la posición 205; E en una posición correspondiente a la posición 205; I en una posición correspondiente a la posición 206; A en una posición correspondiente a la posición 213; I en una posición correspondiente a la posición 219; M en una posición correspondiente a la posición 234; T en una posición correspondiente a la posición 237; H en una posición correspondiente a la posición 238; Q en una posición correspondiente a la posición 240; V en una posición correspondiente a la posición 249; A en una posición correspondiente a la posición 261; K en una posición correspondiente a la posición 261; T en una posición correspondiente a la posición 267; K en una posición correspondiente a la posición 277; H en una posición correspondiente a la posición 279; V en una posición correspondiente a la posición 279; V en una posición correspondiente a la posición 291; E en una posición correspondiente a la posición 309; Q en una posición correspondiente a la posición 310; Y en una posición correspondiente a la posición 314; Y en una posición correspondiente a la posición 315; N en una posición correspondiente a la posición 317; W en una posición correspondiente a la posición 317; D en una posición correspondiente a la posición 318; G en una posición correspondiente a la posición 347; A en una posición correspondiente a la posición 367; R en una posición correspondiente a la posición 375; R en una posición correspondiente a la posición 376; V en una posición correspondiente a la posición 399; E en una posición correspondiente a la posición 401; A en una posición correspondiente a la posición 407; L en una posición correspondiente a la posición 416; K en una posición correspondiente a la posición 419; H en una posición correspondiente a la posición 421; E en una posición correspondiente a la posición 431; T en una posición correspondiente a la posición 433; V en una posición correspondiente a la posición 433; C en una posición correspondiente a la posición 439; P en una posición correspondiente a la posición 440; G en una posición correspondiente a la posición 443; N en una posición correspondiente a la posición 445, en referencia a posiciones de restos de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, el polipéptido de PH20 modificado puede contener al menos un reemplazo de aminoácido seleccionado den entre el reemplazo con: T en una posición correspondiente a la posición 52, K en una posición correspondiente a la posición 58, R en una posición correspondiente a la posición 58, P en una posición correspondiente a la posición 68, V en una posición correspondiente a la posición 83, P en una posición correspondiente a la posición 204, A en una posición correspondiente a la posición 261, T en una posición correspondiente a la posición 267, K en una posición correspondiente a la posición 277 and H en una posición correspondiente a la posición 421, en referencia a posiciones de restos de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3. Un polipéptido de PH20 modificado ejemplar es uno que incluye P (o un aminoácido conservativo del mismo) en una posición correspondiente a la posición 204 en un polipéptido de PH20 en referencia a las posiciones de restos de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3.

45 Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de PH20 modificados que muestran estabilidad aumentada en presencia de un conservante fenólico que contiene un reemplazo de aminoácido en un polipéptido de PH20 que confiere la estabilidad aumentada, en el que la estabilidad aumenta en comparación con el polipéptido no modificado sin el reemplazo de aminoácido, y el polipéptido de PH20 no modificado tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 o es un fragmento truncado en el extremo C terminal del mismo que es un polipéptido de PH20 soluble o tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con el mismo. Por ejemplo, el polipéptido de PH20 no modificado es un polipéptido de PH20 soluble que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de la SEQ ID NO: 3 o 32-66. En ejemplos particulares, el polipéptido de PH20 modificado tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3. En cualquiera de dichos ejemplos de un polipéptido de PH20 modificado, el polipéptido contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 o más reemplazos de aminoácidos. En ejemplos del presente documento, el polipéptido de PH20 modificado es un PH20 humano.

El polipéptido de PH20 modificado muestra estabilidad en presencia de conservantes fenólicos si muestra al menos 15 % de la actividad hialuronidasa en presencia de un conservante o conservantes durante al menos 4 horas en comparación con la actividad hialuronidasa en ausencia del conservante o los conservantes fenólicos, donde la actividad se compara en las mismas condiciones excepto por la presencia del conservante o los conservantes fenólicos. En cualquiera de los ejemplos anteriores, el polipéptido de PH20 modificado es estable en presencia de una cantidad antimicrobiana eficaz de uno o más conservantes fenólicos, tal como una cantidad total de uno o más agentes conservantes fenólicos como un porcentaje (%) de la concentración en masa (p/v) que es de o de aproximadamente 0,05 % a 0,6 %, 0,1 % a 0,4 %, 0,1 % a 0,3 %, 0,15 % a 0,325 %, 0,15 % a 0,25 %, 0,1 % a 0,2 %, 0,2 % a 0,3 % o 0,3 % a 0,4 %, inclusive. El conservante fenólico puede ser un fenol, metacresol (m-cresol),

alcohol bencílico o un parabeno, tal como m-cresol, fenol, o m-cresol y fenol. El reemplazo de aminoácidos puede ser en el resto de aminoácido 204, 58, 10, 12, 20, 22, 26, 34, 36, 46, 50, 52, 68, 70, 74, 82, 83, 84, 86, 97, 127, 131, 138, 142, 143, 144, 166, 169, 174, 193, 195, 196, 205, 206, 213, 219, 234, 237, 238, 240, 249, 261, 267, 277, 279, 291, 309, 310, 314, 315, 317, 318, 347, 367, 375, 376, 399, 401, 407, 416, 419, 421, 431, 433, 439, 440, 443 o 445

5 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3, donde las posiciones de aminoácidos correspondientes se identifican por el alineamiento del polipéptido de PH20 con el polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, el reemplazo de aminoácido es G en una posición correspondiente a la posición 10; K en una posición correspondiente a la posición 12; S en una posición correspondiente a la posición 20; T en una posición correspondiente a la posición 22; M en una posición correspondiente a la posición 26; W en una posición correspondiente a la posición 34; N en una posición correspondiente a la posición 36; L en una posición correspondiente a la posición 46; M en una posición correspondiente a la posición 50; T en una posición correspondiente a la posición 52; S en una posición correspondiente a la posición 52; C en una posición correspondiente a la posición 58; K en una posición correspondiente a la posición 58; R en una posición correspondiente a la posición 58; Y en una posición correspondiente a la posición 58; P en una posición correspondiente a la posición 58; H en una posición correspondiente a la posición 58; P en una posición correspondiente a la posición 68; V en una posición correspondiente a la posición 70; E en una posición correspondiente a la posición 74; L en una posición correspondiente a la posición 82; N en una posición correspondiente a la posición 82; V en una posición correspondiente a la posición 83; Q en una posición correspondiente a la posición 83; S en una posición correspondiente a la posición 83; G en una posición correspondiente a la posición 83; N en una posición correspondiente a la posición 84; A en una posición correspondiente a la posición 86; K en una posición correspondiente a la posición 86; E en una posición correspondiente a la posición 97; L en una posición correspondiente a la posición 97; R en una posición correspondiente a la posición 127; R en una posición correspondiente a la posición 131; L en una posición correspondiente a la posición 138; K en una posición correspondiente a la posición 142; N en una posición correspondiente a la posición 142; P en una posición correspondiente a la posición 142; S en una posición correspondiente a la posición 142; T en una posición correspondiente a la posición 142; G en una posición correspondiente a la posición 143; K en una posición correspondiente a la posición 143; T en una posición correspondiente a la posición 144; Q en una posición correspondiente a la posición 166; T en una posición correspondiente a la posición 166; L en una posición correspondiente a la posición 169; G en una posición correspondiente a la posición 174; N en una posición correspondiente a la posición 174; Q en una posición correspondiente a la posición 193; T en una posición correspondiente a la posición 195; N en una posición correspondiente a la posición 195; E en una posición correspondiente a la posición 196; R en una posición correspondiente a la posición 196; P en una posición correspondiente a la posición 204; A en una posición correspondiente a la posición 205; E en una posición correspondiente a la posición 205; I en una posición correspondiente a la posición 206; A en una posición correspondiente a la posición 213; I en una posición correspondiente a la posición 219; M en una posición correspondiente a la posición 234; T en una posición correspondiente a la posición 237; H en una posición correspondiente a la posición 238; Q en una posición correspondiente a la posición 240; V en una posición correspondiente a la posición 249; A en una posición correspondiente a la posición 261; K en una posición correspondiente a la posición 261; T en una posición correspondiente a la posición 267; K en una posición correspondiente a la posición 277; H en una posición correspondiente a la posición 279; V en una posición correspondiente a la posición 291; E en una posición correspondiente a la posición 309; Q en una posición correspondiente a la posición 310; Y en una posición correspondiente a la posición 314; Y en una posición correspondiente a la posición 315; N en una posición correspondiente a la posición 317; W en una posición correspondiente a la posición 317; D en una posición correspondiente a la posición 318; G en una posición correspondiente a la posición 347; A en una posición correspondiente a la posición 367; R en una posición correspondiente a la posición 375; R en una posición correspondiente a la posición 376; V en una posición correspondiente a la posición 399; E en una posición correspondiente a la posición 401; A en una posición correspondiente a la posición 407; L en una posición correspondiente a la posición 416; K en una posición correspondiente a la posición 419; H en una posición correspondiente a la posición 421; E en una posición correspondiente a la posición 431; T en una posición correspondiente a la posición 433; V en una posición correspondiente a la posición 433; C en una posición correspondiente a la posición 439; P en una posición correspondiente a la posición 440; G en una posición correspondiente a la posición 443; o N en una posición correspondiente a la posición 445, en referencia a las

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

posiciones de restos de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 3. En particular, el reemplazo de aminoácido es T en una posición correspondiente a la posición 52, K en una posición correspondiente a la posición 58, R en una posición correspondiente a la posición 58, P en una posición correspondiente a la posición 68, V en una posición correspondiente a la posición 83, P en una posición correspondiente a la posición 204, A en una posición correspondiente a la posición 261, T en una posición correspondiente a la posición 267, K en una posición correspondiente a la posición 277 o H en una posición correspondiente a la posición 421, en referencia a las posiciones de restos de aminoácidos expuestos en la SEQ ID NO: 3, tal como el reemplazo con P en una posición correspondiente a la posición 204 o R en una posición correspondiente a la posición 58. El polipéptido de PH20 modificado que muestra estabilidad aumentada frente a conservantes fenólicos puede estar sustancialmente purificado o aislado. El polipéptido de PH20 modificado que muestra estabilidad aumentada frente a conservantes fenólicos puede modificarse por glucosilación, sialación, albuminación, farnisilación, carboxilación, hidroxilación y fosforilación y generalmente está glucosidado, por lo que el polipéptido comprende al menos un resto de N-

acetilglucosamina unido a cada uno de al menos tres restos de asparagina (N), tal como en restos de aminoácidos correspondientes a los restos de aminoácidos 200, 333 y 358 de SEQ ID NO: 3. El polipéptido de PH20 modificado que muestra estabilidad aumentada frente a conservantes fenólicos puede conjugarse con un polímero, tal como PEG o dextrano y/o puede conjugarse con un resto que es un dominio de multimerización, una toxina, un marcador detectable o un fármaco.

5

Entre los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento que muestran estabilidad aumentada están los que muestran actividad hialuronidasa aumentada a la temperatura elevada en comparación con el polipéptido de PH20 que no contiene el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos, tales como al menos 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más actividad hialuronidasa durante al menos 4 horas en comparación con el polipéptido de PH20 que no contiene el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos. Además, entre los polipéptidos están los que muestran actividad, pero también típicamente muestran estabilidad aumentada u otra propiedad a temperaturas elevadas, tal como un polipéptido de PH20 modificado que muestra al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % de la actividad hialuronidasa durante al menos 4 horas a una temperatura de entre o aproximadamente entre 32 °C y 37 °C en comparación con la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 modificado a una temperatura de entre o aproximadamente entre 2 °C y 8 °C, donde la actividad se compara en las mismas condiciones excepto por las diferencias de temperatura. La actividad hialuronidasa puede mostrarse después de al menos 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 3 semanas, 4 semanas o más a temperaturas elevadas de entre o aproximadamente entre 32 °C y 37 °C en comparación con la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 modificado a una temperatura entre o aproximadamente entre 2 °C y 8 °C, donde la actividad se compara durante el mismo periodo de tiempo y en las mismas condiciones excepto por la diferencia de temperatura. Son ejemplos de dichos polipéptidos modificados los que contienen al menos un reemplazo de aminoácido en una posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre 1, 11, 12, 14, 20, 26, 29, 34, 50, 58, 70, 82, 83, 84, 86, 87, 140, 142, 143, 147, 152, 166, 167, 172, 174, 178, 193, 195, 206, 212, 213, 219, 233, 237, 240, 267, 277, 291, 292, 309, 313, 314, 317, 318, 347, 367, 368, 371, 374, 389, 392, 395, 396, 406, 419, 421, 439 y 443 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3, donde las posiciones de aminoácidos correspondientes se identifican por alineamiento del polipéptido de PH20 con el polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 3. Las mutaciones ejemplares incluyen, por ejemplo, reemplazo con R en una posición correspondiente a la posición 1; S en una posición correspondiente a la posición 11; I en una posición correspondiente a la posición 12; V en una posición correspondiente a la posición 14; S en una posición correspondiente a la posición 20; M en una posición correspondiente a la posición 26; con R en una posición correspondiente a la posición 29; W en una posición correspondiente a la posición 34; M en una posición correspondiente a la posición 50; K en una posición correspondiente a la posición 58; Q en una posición correspondiente a la posición 58; Q en una posición correspondiente a la posición 58; V en una posición correspondiente a la posición 70; L en una posición correspondiente a la posición 82; Q en una posición correspondiente a la posición 83; R en una posición correspondiente a la posición 84; A en una posición correspondiente a la posición 86; S en una posición correspondiente a la posición 87; K en una posición correspondiente a la posición 140; S en una posición correspondiente a la posición 142; T en una posición correspondiente a la posición 142; K en una posición correspondiente a la posición 143; S en una posición correspondiente a la posición 147; T en una posición correspondiente a la posición 152; T en una posición correspondiente a la posición 166; D en una posición correspondiente a la posición 167; A en una posición correspondiente a la posición 172; G en una posición correspondiente a la posición 174; N en una posición correspondiente a la posición 174; R en una posición correspondiente a la posición 178; Q en una posición correspondiente a la posición 193; T en una posición correspondiente a la posición 195; I en una posición correspondiente a la posición 206; S en una posición correspondiente a la posición 212; A en una posición correspondiente a la posición 213; I en una posición correspondiente a la posición 219; G en una posición correspondiente a la posición 233; T en una posición correspondiente a la posición 237; A en una posición correspondiente a la posición 240; Q en una posición correspondiente a la posición 240; T en una posición correspondiente a la posición 267; E en una posición correspondiente a la posición 277; S en una posición correspondiente a la posición 291; H en una posición correspondiente a la posición 292; V en una posición correspondiente a la posición 292; S en una posición correspondiente a la posición 309; H en una posición correspondiente a la posición 313; S en una posición correspondiente a la posición 314; I en una posición correspondiente a la posición 317; T en una posición correspondiente a la posición 317; W en una posición correspondiente a la posición 317; R en una posición correspondiente a la posición 318; G en una posición correspondiente a la posición 347; A en una posición correspondiente a la posición 367; R en una posición correspondiente a la posición 368; S en una posición correspondiente a la posición 371; P en una posición correspondiente a la posición 374; A en una posición correspondiente a la posición 389; V en una posición correspondiente a la posición 392; A en una posición correspondiente a la posición 395; H en una posición correspondiente a la posición 396; N en una posición correspondiente a la posición 406; H en una posición correspondiente a la posición 419; K en una posición correspondiente a la posición 419; R en una posición correspondiente a la posición 421; S en una posición correspondiente a la posición 421; A en una posición correspondiente a la posición 439; C en una posición correspondiente a la posición 439; y G en una posición correspondiente a la posición 443, en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3. En ejemplos particulares proporcionados en el presente documento, cualquiera de dichos polipéptidos de PH20

65

modificados contienen una única modificación de aminoácido, tal como un reemplazo, y combinaciones de modificaciones, tales como al menos o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y más modificaciones. La modificación, tal como reemplazo, puede estar en un polipéptido de PH20 no modificado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 o es un fragmento truncado C terminal del mismo que es un polipéptido de PH20 soluble, tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 3 o 32-66, o tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con el mismo. Por ejemplo, cualquiera de dichos polipéptidos de PH20 modificados tienen al menos 85 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

También se describen polipéptidos de PH20 modificados que muestran estabilidad aumentada en condiciones de baja salinidad, tales como, por ejemplo, concentraciones de NaCl de menos de 100 mM, tales como, pero sin limitación, concentraciones de NaCl menores de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 25 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM o menos. Entre los polipéptidos de PH20 modificados están los que muestran actividad hialuronidasa aumentada a concentraciones menores de sal en comparación con el polipéptido de PH20 que no contienen el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos. Dicha actividad incluye, por ejemplo, al menos más de 100 %, o al menos 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más actividad hialuronidasa en comparación con el polipéptido de PH20 que no contiene el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos. Son ejemplos de dichos polipéptidos de PH20 los que muestran al menos 60 % de la actividad hialuronidasa en bajas concentraciones de sal, tal como entre o aproximadamente entre NaCl 10 mM y NaCl 100 mM, inclusive (o concentraciones comparables de otras sales o mezclas de sales), en comparación con la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 modificado en NaCl 150 mM, donde las actividades se comparan en las mismas condiciones excepto por la diferencia de la concentración salina. En ejemplos particulares proporcionados en el presente documento, cualquiera de dichos polipéptidos de PH20 modificados contienen una única modificación de aminoácido, tal como un reemplazo y combinaciones de aminoácidos, tales como al menos o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y más modificaciones. La modificación, tal como reemplazo, puede estar en un polipéptido de PH20 no modificado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 o es un fragmento truncado C terminal del mismo que es un polipéptido de PH20 soluble, tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 3 o 32-66, o tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con el mismo. Por ejemplo, cualquiera de dichos polipéptidos de PH20 modificados tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

También se describen polipéptidos de PH20 modificados que contienen al menos un reemplazo de aminoácido en un polipéptido de PH20, donde el polipéptido de PH20 modificado muestra actividad hialuronidasa aumentada en comparación con el polipéptido de PH20 que no contiene el reemplazo de aminoácidos. Cuando se compara la actividad entre polipéptidos, la actividad se compara en las mismas condiciones. Entre estos están polipéptidos, donde el PH20 no modificado muestra al menos 68 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, o el PH20 modificado resultante muestra dicha identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3. Son ejemplos de dichos polipéptidos de PH20 modificados cualquiera que contenga un reemplazo o reemplazos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 10, 12, 14, 24, 32-66, 69 o 72, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 10, 12, 14, 24, 32-66, 69 o 72. El reemplazo o los reemplazos de aminoácidos también pueden realizarse en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 857, 859, 861 u 870, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 857, 859, 861 u 870. En particular, se describen polipéptidos de PH20 modificados que contienen un reemplazo de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72. Entre los polipéptidos de PH20 modificados están los que muestran al menos 120 %, 130 %, 135 %, 140 %, 145 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 500 %, 1500 %, 2000 %, 3000 %, 4000 %, 5000 % o más de la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 que no contiene el reemplazo de aminoácidos. La actividad puede evaluarse a cualquier temperatura, en particular dicha actividad está presente cuando la hialuronidasa se expone a una temperatura que es una temperatura entre o aproximadamente entre 2 °C y 8 °C. Estos polipéptidos de PH20 modificados contienen al menos un reemplazo de aminoácido en una posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre 1, 12, 15, 24, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 39, 46, 48, 52, 58, 63, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 84, 86, 87, 92, 93, 94, 97, 118, 120, 127, 131, 135, 141, 142, 147, 148, 150, 151, 152, 155, 156, 163, 164, 165, 166, 169, 170, 174, 198, 206, 209, 212, 213, 215, 219, 233, 234, 236, 238, 247, 257, 259, 260, 261, 263, 269, 271, 272, 276, 277, 278, 282, 291, 293, 305, 308, 309, 310, 313, 315, 317, 318, 320, 324, 325, 326, 328, 347, 353, 359, 371, 377, 380, 389, 392, 395, 399, 405, 407, 409, 410, 418, 419, 421, 425, 431, 433, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 445, 446 y 447 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3, donde las posiciones de aminoácidos correspondientes se identifican por alineamiento del polipéptido de PH20 con el polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 3. Las modificaciones ejemplares incluyen al menos un reemplazo de aminoácido seleccionado de entre reemplazo con: histidina (H) en una posición correspondiente a la posición 1; Q en una posición correspondiente a la posición 1; E en una posición correspondiente a la posición 12; T en una posición correspondiente a la posición 15; E en una posición correspondiente a la posición 24; H en una posición correspondiente a la posición 24; E en una posición correspondiente a la posición 26; K en una posición correspondiente a la posición 26; K en una posición

correspondiente a la posición 431; H en una posición correspondiente a la posición 431; K en una posición correspondiente a la posición 431; Q en una posición correspondiente a la posición 431; R en una posición correspondiente a la posición 431; S en una posición correspondiente a la posición 431; V en una posición correspondiente a la posición 431; L en una posición correspondiente a la posición 433; R en una posición correspondiente a la posición 433; T en una posición correspondiente a la posición 433; V en una posición correspondiente a la posición 433; K en una posición correspondiente a la posición 436; I en una posición correspondiente a la posición 437; M en una posición correspondiente a la posición 437; T en una posición correspondiente a la posición 438; V en una posición correspondiente a la posición 439; H en una posición correspondiente a la posición 440; R en una posición correspondiente a la posición 440; F en una posición correspondiente a la posición 441; R en una posición correspondiente a la posición 442; A en una posición correspondiente a la posición 443; M en una posición correspondiente a la posición 443; M en una posición correspondiente a la posición 445; P en una posición correspondiente a la posición 445; A en una posición correspondiente a la posición 446; D en una posición correspondiente a la posición 447; N en una posición correspondiente a la posición 447; y/o con Q en una posición correspondiente a la posición 447, en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3.

Entre los polipéptidos que muestran actividad hialuronidasa aumentada están los que muestran al menos 2,0 veces la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 que no contiene el reemplazo de aminoácidos. Por ejemplo, entre estos están los polipéptidos de PH20 modificados que contienen al menos un reemplazo de aminoácido en una posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre 24, 29, 31, 48, 58, 69, 70, 75, 84, 97, 165, 166, 271, 278, 317, 320, 325 y 326 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3, donde las posiciones de aminoácidos correspondientes se identifican por alineamiento del polipéptido de PH20 con el polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 3, tal como polipéptidos de PH20 modificados que contienen al menos un reemplazo de aminoácido seleccionado de entre el reemplazo con: E en una posición correspondiente a la posición 24; E en una posición correspondiente a la posición 29; V en una posición correspondiente a la posición 31; N en una posición correspondiente a la posición 48; K en una posición correspondiente a la posición 58; Q en una posición correspondiente a la posición 58; A en una posición correspondiente a la posición 69; F en una posición correspondiente a la posición 69; G en una posición correspondiente a la posición 69; P en una posición correspondiente a la posición 69; R en una posición correspondiente a la posición 69; A en una posición correspondiente a la posición 70; F en una posición correspondiente a la posición 70; G en una posición correspondiente a la posición 70; H en una posición correspondiente a la posición 70; H en una posición correspondiente a la posición 70; N en una posición correspondiente a la posición 70; R en una posición correspondiente a la posición 70; T en una posición correspondiente a la posición 70; V en una posición correspondiente a la posición 70; L en una posición correspondiente a la posición 75; T en una posición correspondiente a la posición 75; G en una posición correspondiente a la posición 84; G en una posición correspondiente a la posición 97; D en una posición correspondiente a la posición 165; L en una posición correspondiente a la posición 166; R en una posición correspondiente a la posición 166; T en una posición correspondiente a la posición 166; L en una posición correspondiente a la posición 271; H en una posición correspondiente a la posición 278; R en una posición correspondiente a la posición 278; K en una posición correspondiente a la posición 317; K en una posición correspondiente a la posición 320; E en una posición correspondiente a la posición 325, con G en una posición correspondiente a la posición 325; K en una posición correspondiente a la posición 325; N en una posición correspondiente a la posición 325; Q en una posición correspondiente a la posición 325; y V en una posición correspondiente a la posición 326; en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3.

Entre cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento que muestran actividad hialuronidasa aumentada, cualquiera de dichos polipéptidos de PH20 contienen una única modificación de aminoácido, tal como un reemplazo, y combinaciones de modificaciones, tales como al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y más modificaciones. La modificación, tal como reemplazo, puede ser en un polipéptido de PH20 no modificado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 o es un fragmento truncado en el extremo C terminal del mismo que es un polipéptido de PH20 soluble, tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 3 o 32-66, o tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con el mismo. Por ejemplo, cualquiera de dichos polipéptidos de PH20 modificados tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

También se describen polipéptidos de PH20 modificados que contienen al menos un reemplazo de aminoácido en el polipéptido de PH20 cuya secuencia se expone en SEQ ID NO: 7, un fragmento truncado en el extremo C terminal del mismo, un fragmento soluble del mismo, o en un polipéptido de PH20 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7, donde al menos un reemplazo o reemplazos de aminoácidos están en una posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 58, 59, 60, 61, 63, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 110, 114, 117, 118, 119, 120, 122, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 186, 192,

193, 195, 196, 197, 198, 200, 202, 204, 205, 206, 208, 209, 211,212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221,222, 224, 226, 230, 231,232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 242, 245, 247, 248, 251,253, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 271,272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291,292, 293, 294, 297, 298, 300, 301,302, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311,312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 320, 321,323, 324, 325, 326, 327, 328, 331,334, 335, 338, 339, 342, 343, 347, 348, 349, 351,353, 356, 357, 358, 359, 360, 361,367, 368, 369, 371,373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381,383, 385, 387, 388, 389, 391,392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 401,403, 404, 405, 406, 407, 409, 410, 411,412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421,422, 425, 426, 427, 428, 431,432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441,442, 443, 444, 445, 446 y 447 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 3 o 7, donde las posiciones de aminoácidos correspondientes se identifican por alineamiento del polipéptido de PH20 con el polipéptido expuestos en SEQ ID NO: 3; y siempre que si el polipéptido de PH20 modificado contiene un reemplazo en una posición correspondiente a la posición 13, 47, 131 o 219 el reemplazo no es reemplazo con una alanina (A). Entre estos polipéptidos de PH20 modificados están los que muestran al menos 40 % de la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 que no contiene el reemplazo de aminoácido, donde, como en todos los casos del presente documento la actividad se compara en las mismas condiciones.

Se incluyen entre estos polipéptidos los que contienen un reemplazo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 y 72, o en una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 91 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72. En particular, el polipéptido de PH20 modificado contiene reemplazos de aminoácidos en SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72, que son polipéptidos que son un fragmento truncado en el extremo C terminal de SEQ ID NO: 7, o un polipéptido de PH20 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7. En particular, entre cualquiera de dichos polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento están cualquiera incluyendo en los que el reemplazo de aminoácido es un reemplazo de aminoácido expuesto en la Tabla 3 posterior. Por ejemplo, dichos polipéptidos de PH20 modificados incluyen los que tienen al menos un reemplazo de aminoácido en una posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre 1, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 58, 59, 63, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 79, 82, 83, 84, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 94, 97, 102, 104, 107, 114, 118, 120, 127, 128, 130, 131, 132, 135, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 155, 156, 158, 160, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 169, 170, 172, 173, 174, 175, 178, 179, 193, 195, 196, 198, 204, 205, 206, 209, 212, 213, 215, 219, 220, 221, 222, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 240, 247, 248, 249, 257, 258, 259, 260, 261, 263, 267, 269, 271, 272, 273, 274, 276, 277, 278, 279, 282, 283, 285, 287, 289, 291, 292, 293, 298, 305, 307, 308, 309, 310, 313, 314, 315, 317, 318, 320, 321, 324, 325, 326, 328, 335, 347, 349, 351, 353, 356, 359, 367, 368, 369, 371, 373, 374, 375, 376, 377, 380, 381, 383, 385, 389, 392, 393, 395, 396, 399, 401, 404, 405, 406, 407, 409, 410, 412, 416, 418, 419, 421, 425, 427, 428, 431, 433, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446 o 447 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3. Son ejemplos de dichos reemplazos los que contienen al menos un reemplazo de aminoácido seleccionado de entre reemplazo con: histidina (H) en una posición correspondiente a la posición 1; A en una posición correspondiente a la posición 1; E en una posición correspondiente a la posición 1; G en una posición correspondiente a la posición 1; K en una posición correspondiente a la posición 1; Q en una posición correspondiente a la posición 1; R en una posición correspondiente a la posición 1; A en una posición correspondiente a la posición 6; M en una posición correspondiente a la posición 8; Q en una posición correspondiente a la posición 9; G en una posición correspondiente a la posición 10; H en una posición correspondiente a la posición 10; S en una posición correspondiente a la posición 11; E en una posición correspondiente a la posición 12; I en una posición correspondiente a la posición 12; K en una posición correspondiente a la posición 12; T en una posición correspondiente a la posición 12; V en una posición correspondiente a la posición 14; V en una posición correspondiente a la posición 15; M en una posición correspondiente a la posición 15; S en una posición correspondiente a la posición 20; T en una posición correspondiente a la posición 22; E en una posición correspondiente a la posición 24; H en una posición correspondiente a la posición 24; R en una posición correspondiente a la posición 24; A en una posición correspondiente a la posición 26; E en una posición correspondiente a la posición 26; K en una posición correspondiente a la posición 26; M en una posición correspondiente a la posición 26; Q en una posición correspondiente a la posición 26; R en una posición correspondiente a la posición 26; D en una posición correspondiente a la posición 27; K en una posición correspondiente a la posición 27; R en una posición correspondiente a la posición 27; R en una posición correspondiente a la posición 28; E en una posición correspondiente a la posición 29; I en una posición correspondiente a la posición 29; K en una posición correspondiente a la posición 29; L en una posición correspondiente a la posición 29; M en una posición correspondiente a la posición 29; P en una posición correspondiente a la posición 29; R en una posición correspondiente a la posición 29; S en una posición correspondiente a la posición 29; T en una posición correspondiente a la posición 29; V en una posición correspondiente a la posición 29; G en una posición correspondiente a la posición 30; H en una posición correspondiente a la posición 30; K en una posición correspondiente a la posición 30; L en una posición correspondiente a la posición 30; M en una posición correspondiente a la posición 30; R en una posición correspondiente a la posición 30; S en una posición correspondiente a la posición 30; A en una posición correspondiente a la posición 31; C en una posición correspondiente a la posición 31; G en una posición correspondiente a la posición 31; H en una posición correspondiente a la posición 31; I en una posición correspondiente a la posición 31; K en una posición correspondiente a la posición 31; L en una posición correspondiente a la posición 31;

correspondiente a la posición 433; K en una posición correspondiente a la posición 433; L en una posición correspondiente a la posición 433; R en una posición correspondiente a la posición 433; T en una posición correspondiente a la posición 433; V en una posición correspondiente a la posición 433; W en una posición correspondiente a la posición 433; K en una posición correspondiente a la posición 436; I en una posición correspondiente a la posición 437; M en una posición correspondiente a la posición 437; A en una posición correspondiente a la posición 438; D en una posición correspondiente a la posición 438; E en una posición correspondiente a la posición 438; L en una posición correspondiente a la posición 438; N en una posición correspondiente a la posición 438; T en una posición correspondiente a la posición 438; A en una posición correspondiente a la posición 439; C en una posición correspondiente a la posición 439; K en una posición correspondiente a la posición 439; P en una posición correspondiente a la posición 439; Q en una posición correspondiente a la posición 439; T en una posición correspondiente a la posición 439; V en una posición correspondiente a la posición 439; D en una posición correspondiente a la posición 440; H en una posición correspondiente a la posición 440; M en una posición correspondiente a la posición 440; P en una posición correspondiente a la posición 440; R en una posición correspondiente a la posición 440; S en una posición correspondiente a la posición 440; A en una posición correspondiente a la posición 441; F en una posición correspondiente a la posición 441; C en una posición correspondiente a la posición 442; G en una posición correspondiente a la posición 442; R en una posición correspondiente a la posición 442; A en una posición correspondiente a la posición 443; E en una posición correspondiente a la posición 443; F en una posición correspondiente a la posición 443; G en una posición correspondiente a la posición 443; M en una posición correspondiente a la posición 443; N en una posición correspondiente a la posición 443; E en una posición correspondiente a la posición 444; V en una posición correspondiente a la posición 444; H en una posición correspondiente a la posición 444; M en una posición correspondiente a la posición 445; N en una posición correspondiente a la posición 445; P en una posición correspondiente a la posición 445; Q en una posición correspondiente a la posición 445; S en una posición correspondiente a la posición 445; T en una posición correspondiente a la posición 445; V en una posición correspondiente a la posición 445; W en una posición correspondiente a la posición 445; A en una posición correspondiente a la posición 446; M en una posición correspondiente a la posición 446; W en una posición correspondiente a la posición 446; D en una posición correspondiente a la posición 447; E en una posición correspondiente a la posición 447; G en una posición correspondiente a la posición 447; I en una posición correspondiente a la posición 447; N en una posición correspondiente a la posición 447; P en una posición correspondiente a la posición 447; Q en una posición correspondiente a la posición 447; T en una posición correspondiente a la posición 447, y/o reemplazo con V en una posición correspondiente a la posición 447, cada uno en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3. Entre estos polipéptidos de PH20 modificados están los que muestran al menos 40 % de la actividad de la PH20 que no contiene el reemplazo de aminoácido particular. La actividad puede variar entre, por ejemplo, 40 % y 5000 %, 40 % y 2000 %, 40 % y 1000 %, 40 % y 500 %, 40 % y 100 %, 80 % y 2000 %, 80 % y 600 %, 80 % y 200 %, 80 % y 300 %, de la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 que no contiene el reemplazo de aminoácido. Dicha actividad incluye al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1000 %, 2000 %, 3000 % o más de la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 que no contiene el reemplazo de aminoácido, donde, como en todos los casos del presente documento, las actividades se comparan en las mismas condiciones.

En particular, se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 modificados que contienen al menos un reemplazo de aminoácido en un polipéptido de PH20 expuesto en SEQ ID NO: 7, un fragmento truncado en el extremo C terminal del mismo, o en un polipéptido de PH20 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 o un fragmento truncado correspondiente, donde: los polipéptidos de PH20 modificados muestran menos del 20 % de la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 que no contiene el reemplazo de aminoácido, donde las actividades se comparan en las mismas condiciones; el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos están en una posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 94, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 143, 144, 145, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 161, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 331, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 408, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 419, 420, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 434, 437, 438, 439, 440, 441, 442,

443, 444 o 447 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3 o 7; las posiciones de aminoácidos correspondientes se identifican por el alineamiento del polipéptido de PH20 con el polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 3; y siempre que:

- 5 (i) si el polipéptido de PH20 modificado contiene un reemplazo de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 200, 333, 358 o 393 el reemplazo no es reemplazo con una alanina (A);
- (ii) si el polipéptido de PH20 modificado contiene un reemplazo de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 111 o 249 el reemplazo no es reemplazo con una asparagina (N);
- 10 (iii) si el polipéptido de PH20 modificado contiene un reemplazo de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 113 el reemplazo no es reemplazo con una glutamina (Q);
- (iv) si el polipéptido de PH20 modificado contiene un reemplazo de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 176 el reemplazo no es reemplazo con una glicina (G); y
- (v) si el polipéptido de PH20 modificado contiene un reemplazo de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 252 el reemplazo no es reemplazo con una treonina (T).

15 Son ejemplos de dichos polipéptidos de PH20 modificados cualquiera que contenga un reemplazo o reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de PH20 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72, o en una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 91 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72. Por ejemplo, el polipéptido de PH20 modificado
 20 contiene un reemplazo o reemplazos de aminoácidos en SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72, que son polipéptidos que son un fragmento truncado en el extremo C terminal de SEQ ID NO: 7, o un polipéptido de PH20 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7. En ejemplos de dichos polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento, los polipéptidos de PH20 modificados pueden mostrar actividad similar o igual a la PH20 sin la modificación, o pueden mostrar actividad
 25 aumentada o actividad que es menor del 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 % o menos de la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 que no contiene el reemplazo de aminoácido. Son ejemplos de dichos polipéptidos de PH20 modificados cualquiera expuesto en la Tabla 5.

30 Entre todos y cada uno de los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento y anteriormente, el polipéptido de PH20 modificado es uno que no consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 6-66, 69-72, 856-861, 869 u 870. En particular, entre cualquiera de los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento anteriormente o en otra parte del presente documento están cualquiera que contenga un reemplazo o reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de PH20
 35 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 69 o 72 siempre que: (i) cuando el polipéptido de PH20 modificado incluya solamente un único reemplazo de aminoácido el reemplazo no corresponde a los reemplazos de aminoácidos V12A, N47A, D111N, E113Q, N131A, R176G, N200A, N219A, E249Q, R252T, N333A o N358A, en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3; (ii) donde el polipéptido de PH20 modificado incluye solamente dos reemplazos de aminoácidos los reemplazos no corresponden a los reemplazos de aminoácidos P13A/L464W, N47A/N131A, N47A/N219A, N131A/N219A o N333A/N358A en referencia a las posiciones expuestas en SEQ ID NO: 3; y (iii) donde el polipéptido de PH20 modificado incluye solamente tres reemplazos de aminoácidos los reemplazos no corresponden a los reemplazos de aminoácidos N47A/N131A/N219A, en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3.

45 Cualquiera de los polipéptidos de PH20 modificados anteriores y cualquiera descrito en el presente documento y descrito anteriormente y posteriormente puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, o más de los reemplazos de aminoácidos. Los polipéptidos de PH20 modificados
 50 pueden incluir una secuencia señal, incluyendo la secuencia nativa o una secuencia heteróloga o una secuencia modificada, y también incluyen un polipéptido de PH20 maduro que carece de la secuencia señal.

Entre cualquiera de los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento anteriormente o descritos posteriormente están los polipéptidos de PH20 modificados que contienen o tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 73-855 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 75 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 73-855 y que contiene al menos un reemplazo de aminoácido, tal como cualquiera descrito anteriormente o en otra parte del presente documento, en referencia a posiciones comparadas con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3. En cualquiera de los ejemplos de los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento, el polipéptido de PH20 modificado no tiene o contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 8-31, 69-72, 856-861, 869 u 870.

65 Los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento pueden estar sustancialmente purificados o aislados, pueden mostrar actividad catalítica a pH neutro, pueden secretarse tras expresión de células y son solubles en el sobrenadante y/o pueden incluir aminoácidos modificados, tales como una modificación seleccionada

de entre glucosilación, sialación, albuminación, farnisilación, carboxilación, hidroxilación, conjugación con un polímero, tal como PEGilación o conjugación con dextrano, conjugación con otro resto, tal como un dominio de multimerización, toxina, marcador o fármaco detectable y fosforilación. El polipéptido de PH20 modificado puede estar glucosilado, tal como conteniendo al menos un resto de N-acetilglucosamina unido a cada uno de al menos tres restos de asparagina (N), donde, por ejemplo, los tres restos de asparagina corresponden a los restos de aminoácidos 200, 333 y 358 de SEQ ID NO: 3. Los dominios de multimerización incluyen dominios Fc.

También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de los polipéptidos de PH20 modificados proporcionados en el presente documento. Se proporcionan vectores, eucariotas y procariotas, que contienen las moléculas de ácido nucleico. Los vectores incluyen vectores de expresión e incluyen vectores de mamífero, incluyendo vectores virales. Los vectores virales incluyen vectores de adenovirus, vectores de retrovirus, vectores de virus vaccinia, virus de herpes simple y vectores de citomegalovirus, y otros vectores virales similares. Son de interés vectores oncolíticos que se acumulan en o se dirigen a tumores. También se proporcionan células que contienen las moléculas de ácido nucleico y células que contienen los vectores. Las células pueden ser procariotas o eucariotas, particularmente células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO).

También se proporciona en el presente documento un polipéptido de PH20 modificado que se produce por cualquiera de las células proporcionadas. Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento métodos para producir un polipéptido de PH20 modificado cultivando cualquiera de las células proporcionadas en el presente documento en condiciones por las que se produce un polipéptido de PH20 modificado codificado y se secreta por la célula, y recuperando el polipéptido expresado. También se proporciona en el presente documento un método para producir un polipéptido de PH20 modificado introduciendo cualquiera de los ácidos nucleicos proporcionados en el presente documento o cualquiera de los vectores proporcionados en el presente documento en una célula capaz de incorporar restos de azúcar ligados a N en el polipéptido, cultivando la célula en condiciones en las que se produce un polipéptido de PH20 modificado codificado y se secreta por la célula, y recuperando el polipéptido expresado. En dichos ejemplos, el ácido nucleico está unido operativamente con un promotor. La célula cultivada puede ser una célula eucariota, tal como una célula de mamífero, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO).

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen cualquiera de los polipéptidos de PH20 modificados de acuerdo con las presentes reivindicaciones o cualquiera de los ácidos nucleicos o vectores proporcionados en el presente documento. Las composiciones pueden formularse con otros agentes y/o con otros componentes, tales como conservantes. Las composiciones pueden formularse de modo que los componentes, particularmente el PH20 y cualquier otro agente activo, permanezcan activos o sean estables en condiciones preseleccionadas. Además, como se describe en el presente documento, los polipéptidos de PH20 se modifican de modo que muestren estabilidad aumentada en diversas condiciones. Por ejemplo, se describen composiciones en las que el polipéptido de PH20 modificado es estable (es decir, conserva actividad como se describe en el presente documento) a una temperatura de o de aproximadamente 2 °C a 8 °C, inclusive, durante al menos 1 mes o es estable a una temperatura de o de aproximadamente 30 °C a 42 °C, inclusive, durante al menos 3 días. Se describen composiciones en las que el polipéptido de PH20 modificado en la composición es estable a una temperatura de o de aproximadamente 2 °C a 8 °C, inclusive, durante al menos 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, 13 meses, 14 meses, 15 meses, 16 meses, 17 meses, 18 meses, 19 meses, 20 meses, 21 meses, 22 meses, 23 meses, 24 meses, 25 meses, 26 meses, 27 meses, 28 meses, 29 meses o 30 meses. También se describen composiciones en las que el polipéptido de PH20 modificado en la composición es estable a una temperatura de o de aproximadamente 30 °C a 42 °C, inclusive, durante al menos 3 días, al menos 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 20 días, 21 días, 22 días, 23 días, 24 días, 25 días, 26 días, 27 días, 28 días, 29 días, 30 días, 35 días, 40 días, 45 días, 50 días, 60 días o más. Las composiciones farmacéuticas pueden contener un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las condiciones, formulaciones, componentes y polipéptido de PH20 modificado se seleccionan para conseguir una estabilidad deseada. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración directa o pueden requerir dilución. Pueden formularse para administración de dosificación múltiple o individual. Las composiciones ejemplares incluyen concentraciones de PH20 modificado entre o entre aproximadamente 0,1 µg/ml y 100 µg/ml, 1 µg/ml y 50 µg/ml o 1 µg/ml y 20 µg/ml, o 10 U/ml y 5000 U/ml, 50 U/ml y 4000 U/ml, 100 U/ml y 2000 U/ml, 300 U/ml y 2000 U/ml, 600 U/ml y 2000 U/ml, o 100 U/ml y 1000 U/ml. Las sales ejemplares incluyen NaCl a una concentración, por ejemplo, de menos de o aproximadamente o 200 mM, 180 mM, 150 mM, 140 mM, 130 mM, 120 mM, 110 mM, 100 mM, 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 25 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM o menos, o entre o aproximadamente entre 0,1 mM y 200 mM, 0,1 mM y 100 mM, 120 mM y 200 mM, 10 mM y 50 mM, 10 mM y 90 mM, 80 mM y 200 mM, 80 mM y 140 mM, 50 mM y 100 mM, 80 mM y 100 mM, 50 mM y 80 mM, 100 mM y 140 mM o 120 mM y 140 mM.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener una cantidad antimicrobiana eficaz de un conservante o una mezcla de conservantes, tal como uno, dos, tres, cuatro o más de un conservante o conservantes fenólicos, un conservante o conservantes no fenólicos o un conservante o conservantes fenólicos y un conservante o conservantes no fenólicos, tales como, pero sin limitación, fenol, m-cresol, metilparabeno, alcohol bencílico,

5 timerosal, cloruro de benzalconio, 4-cloro-1-butanol, diclorhidrato de clorhexidina, digluconato de clorhexidina, L-fenilalanina, EDTA, bronopol, acetato fenilmercúrico, glicerol, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato sódico, o-cresol, p-cresol, clorocresol, cetrimida, cloruro de bencetonio, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno y cualquier combinación de los mismos. Los fenoles incluyen, por ejemplo, fenol, metacresol (m-cresol), alcohol
 10 bencílico y parabenos, tales como metilparabeno o propilparabeno. Las concentraciones antimicrobianas eficaces de uno o más agentes conservantes (como un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v)) pueden estar entre 0,05 % y 0,6 %, 0,1 % y 0,4 %, 0,1 % y 0,3 %, 0,15 % y 0,325 %, 0,15 % y 0,25 %, 0,1 % y 0,2 %, 0,2 % y 0,3 % o 0,3 % y 0,4 % inclusive. Son ejemplos de los mismos composiciones farmacéuticas donde los conservantes son fenol, m-cresol o fenol y m-cresol y la cantidad como un % de concentración en masa (p/v) en la formulación está
 15 entre o aproximadamente entre 0,1 % y 0,25 % de fenol y entre o aproximadamente entre 0,05 % y 0,2 % de m-cresol, está entre o aproximadamente entre 0,10 % y 0,2 % de fenol y entre o aproximadamente entre 0,6 % y 0,8 % de m-cresol, entre o aproximadamente entre 0,1 % y 0,15 % de fenol y 0,8 % y 0,15 % de m-cresol, está entre o aproximadamente entre 0,10 % y 0,15 % de fenol y entre o aproximadamente entre 0,06 y 0,09 % de m-cresol o está entre o aproximadamente entre 0,12 % y 0,18 % de fenol y entre o aproximadamente entre 0,14 y 0,22 % de m-cresol.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener un agente terapéuticamente activo adicional. El agente activo puede formularse en la composición o proporcionarse como una combinación con la composición que contiene PH20, pero en una composición separada para administración por separado, secuencialmente, intermitentemente, simultáneamente o juntas. Los agentes terapéuticamente activos incluyen, por ejemplo, un agente seleccionado de entre un agente quimioterapéutico, un agente analgésico, un agente antiinflamatorio, un agente antimicrobiano, un agente amebicida, un agente tricomonacida, un agente antiparkinsoniano, un agente antimalárico, un agente anticonvulsionante, un agente antidepressivo, un agente antiartrítico, un agente antifúngico, un agente antihipertensivo, un agente antipirético, un agente antiparasitario, un agente antihistamínico, un agente agonista alfa
 20 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 de canales de calcio, un agente farmacológico cardiovascular, un agente anticonceptivo, un agente descongestionante, un agente diurético, un agente depresivo, un agente de diagnóstico, un agente de electrolito, un agente hipnótico, un agente hormonal, un agente hiperglucémico, un agente relajante muscular, un agente contractor muscular, un agente oftálmico, un agente parasimpatomimético, un agente energizante psíquico, un agente sedante, un agente simpatomimético, un agente tranquilizante, un agente urinario, un agente vaginal, un agente viricida, un agente vitamínico, un agente antiinflamatorio no esteroideo, un agente inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un polipéptido, una proteína, un ácido nucleico, un fármaco, una molécula orgánica y un inductor de sueño. Son ejemplos de dichos agentes anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, una preparación de inmunoglobulina, un bisfosfonato, una citocina, un agente quimioterapéutico, un factor de coagulación y una insulina. Las insulinas incluyen, por ejemplo, insulinas basales e insulinas de acción rápida, tales como insulina regular, particularmente insulina humana recombinante, y análogos de insulina, tales como insulina lispro, insulina aspart o insulina glulisina. Son insulinas de acción rápida particulares las que tienen una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 862 y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 863 o una insulina con una cadena A con una secuencia de aminoácidos expuesta como las posiciones de restos de aminoácidos 88-108 de SEQ ID NO: 864 y una cadena B con una secuencia de aminoácidos expuesta como las posiciones de restos de aminoácidos 25-54 de SEQ ID NO: 864 o un análogo de insulina que se selecciona de entre una insulina que tiene una cadena A con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 862 y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ NOS: 865-867. La cantidad de insulina de acción rápida en las composiciones puede determinarse de forma empírica, pero típicamente puede ser de 10 U/ml a 1000 U/ml, 50 U/ml a 500 U/ml, 100 U/ml a 1000 U/ml o 500 U/ml a 1000 U/ml, inclusive.

En ejemplos particulares, se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que contiene cualquiera de los polipéptidos de PH20 modificados de acuerdo con las presentes reivindicaciones que muestran estabilidad aumentada frente a un conservante fenólico y una insulina, tal como una insulina de acción rápida. Los polipéptidos de PH20 modificados e insulina pueden proporcionarse en cantidades terapéuticamente eficaces. Por ejemplo, se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que contiene cualquiera de los polipéptidos de PH20 modificados de acuerdo con las presentes reivindicaciones que muestra estabilidad aumentada frente a un conservante fenólico en una cantidad que es de aproximadamente 100 U/ml a 1000 U/ml y una insulina de acción rápida en una cantidad que es de o de aproximadamente 10 U/ml a 1000 U/ml. Por ejemplo, la insulina de acción rápida puede ser un análogo de insulina, tal como insulina lispro, insulina aspart o insulina glulisina u otro análogo. Cualquiera de dichas composiciones farmacéuticas puede formularse a un pH que es de o de aproximadamente 7,0 a 7,6. Cualquiera de dichas composiciones farmacéuticas también puede formularse para contener sal, tal como NaCl, a una concentración que es de o de aproximadamente 0,1 mM a 200 mM y/o una cantidad antimicrobiana eficaz de al menos un conservante donde la composición contiene en general al menos un conservante fenólico. La cantidad antimicrobiana eficaz es una cantidad total de uno o más agentes conservantes como un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) que es o es entre 0,05 % y 0,6 %. El conservante o los conservantes fenólicos pueden ser un fenol, metacresol (m-cresol), alcohol bencílico o un parabeno. En cualquiera de los ejemplos anteriores de una composición farmacéutica, la composición también puede contener un tensioactivo, tal como un polipropilenglicol, polietilenglicol, glicerina, sorbitol, poloxámero o polisorbato, en una

cantidad como un % de concentración en masa (p/v) en la formulación que es al menos o al menos aproximadamente 0,001 %; un agente tamponante que es un agente de unión no metálico o es un agente de unión metálico, tal como Tris, histidina, fosfato o citrato, donde la concentración del agente tamponante es entre o entre aproximadamente 1 mM y 100 mM; glicerina en una concentración menor de 60 mM; un antioxidante, tal como

5 cisteína, triptófano o metionina, a una concentración entre o de aproximadamente entre 2 mM y 50 mM, inclusive; y/o cinc a una concentración de entre o aproximadamente entre 0,001 y 0,1 mg por 100 unidades de insulina (mg/100U). También se describen en el presente documento sistemas de bucle cerrado, bombas de insulina incluyendo bombas de insulina de infusión subcutánea continua (CSII) y bolígrafos de insulina que contienen

10 cualquiera de las composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas pueden usarse en métodos o usos para tratar diabetes, tales como diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 o diabetes gestacional.

Otros agentes terapéuticos en cualquiera de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con las reivindicaciones incluyen, pero sin limitación adalimumabs, agalsidasas beta, alefacepts, ampicilinas, anakinras, vacunas antipoliomielíticas, antitomicitos, azitromicinas, becaperlinas, caspofunginas, caspofunginas, cefepimas, cefotetans,

15 ceftazidimas, ceftriaxonas, cetuximabs, cilastatinas, ácidos clavulánicos, clindamicinas, darbepoetinas alfa, daclizumabs, differia, antitoxinas diftéricas, toxoides diftéricos, efalizumabs, epinefrinas, eritropoyetinas alfa, etanercepts, filgrastims, fluconazoles, hormonas foliculoestimulantes, folitropinas alfa, folitropinas beta, fosfenitoínas, gadodiamidas, gadopentetatos, gatifloxacinas, glatirámeros, GM-CSF, goserelinas, acetatos de goserelina, granisetrones, *Haemophilus influenzae B*, haloperidoles, vacunas de la hepatitis, vacunas de la hepatitis A, vacunas de la hepatitis B, tiuxetanos de ibritumomab, ibritumomabs, tiuxetanos, inmunoglobulinas, vacunas de *Haemophilus influenzae*, vacunas de virus de la gripe, infliximabs, insulina lispro, protamina lispro neutra 75 % (NP)/insulina lispro 25 %, protamina neutra Hagedorn (NPH) 50 %/insulina regular 50 %, NP 70 %/insulina regular 30 %; insulina regular, insulina NPH, insulina ultra, insulina ultralenta e insulinas glargina, interferones, interferón alfa, interferones beta, interferones gamma, interferón alfa-2a, interferón alfa 2-b, interferón alfacon, interferón alfa-n, interferones beta, interferones beta-1a, interferones gamma, interferón alfa-con, iodixanoles, iohexoles, iopamidoles, ioversoles, quetorolacos, laronidasas, levofloxacinas, lidocainas, linezolidas, lorazepam, vacunas de sarampión, virus de sarampión, virus de paperas, vacunas de virus de sarampión-paperas-rubeola, vacunas de rubeola, medroxioprogesteronas, meropenems, metilprednisolonas, midazolams, morfina, octreotidas, omalizumabs, ondansetrones, palivizumabs, pantoprazoles, pegasparginas, pegfilgrastims, peg-interferón alfa-2a, peg-interferón

20 alfa-2b, pegvisomants, vacunas de *pertussis*, piperacilinas, vacunas pneumocócicas y vacunas conjugadas pneumocócicas, prometazinas, reteplazas, somatropinas, sulbactams, sumatriptanos, tazobactamas, tenecteplazas, toxoides purificados del tétanos, ticarcilinas, tositumomabs, triamcinolonas, acetonas de triamcinolona, hexacetonidas de triamcinolona, vancomicinas, inmunoglobulinas de varicela zóster, vacunas de varicela, otras vacunas, alemtuzumabs, alitretinoínas, alopurinoles, alretaminas, amifostinas, anastrozoles, arsénicos, trióxidos de arsénico, asparaginasas, vacunas de bacilo Calmette-Guerin (BCG), BCG vivo, beaxoratenos, bleomicinas, busulfanes, busulfán intravenoso, busulfanes orales, calusteronas, capecitabinas, carboplatinas, carmustinas, carmustinas con polifeprosanes, celecoxibs, clorambucilos, cisplatino, cladribinas, ciclofosfamidias, citarabinas, citarabinas liposomales, dacarbazinas, dactinomycinas, daunorubicinas liposomales, daunorubicinas, daunomicinas, diftotoxos de denileucina, dexrazoxanos, docetaxeles, doxorubicinas, doxorubicinas liposomales, propionatos de dromostanolona, soluciones B de Elliott, Epirubicinas, epoetinas alfa, estramustinas, etopósidos, fosfatos de etopósido, etopósidos VP-16, exemestanos, floxuridinas, fludarabinas, fluorouracilos, 5-fluorouracilos, fulvestrants, gemcitabinas, gemtuzumabs, ozogamicinas, ozogamicinas de gemtuzumab, hidroxioureas, idarubicinas, ifosfamidias, mesilatos de imatinib, irinotecanas, letrozoles, leucovorinas, levamisoles, lomustinas, CCNU, mecloretaminas, mostazas de nitrógeno, megestroles, acetatos de megestrol, melfalanes, L-PAM, mercaptopurinas, 6-mercaptopurinas, mesnas, metotrexatos, metoxsalenos, mitomicinas, mitomicinas C, mitotanos, mitoxantronas, nandrolonas, fenpropionatos de nandrolona, nifedipinas, oprelvekinas, oxaliplatinos, paclitaxeles, pamidronatos, pegademasas, pentostatinas, pipobromanes, plicamicinas, mitramicinas, porfimeros, porfimeros sódicos, procarbazonas, quinacinas, rasburicasas, rituximabs, sargramostimas, estreptozocinas, talcos, tamoxifeno, temozolomidas, tenipósidos, testolactonas, tioguaninas, 6-tioguaninas, trietiléniofosforamidias (tiotepas), topotecanos, toremifeno, trastuzumabs, tretinoínas, mostazas de uracilo, valrubicinas, vinblastinas, vincristinas, vinorelbina, zoledronatos, acivinas, aclarubicinas, acodazoles, acroninas, adozelesinas, aldesleucinas, ácidos retinoicos, alitretinoínas, ácidos 9-cis-retinoicos, alvocidib, ambazonas, ambomicinas, Ametantrona, Aminoglutetimidas, Amsacinas, Anaxironas, Ancitabinas, Antramycinas, Apaziquonas, Argimesnas, Asperlinas, Atriumustinas, Azacitidinas, Azetepas, Azotomicinas, Banoxantrona, Batabulinas, Batimastatos, Benaxibinas, Bendamustinas, Benzodepas, Bicalutamidas, Bietaserpinas, Biricodares, Bisantrenos, Dimesilatos de Bisnafida, Bizelesinas, Bortezomib, Brequinares, Bropiriminas, Budotitanos, Cactinomycinas, Canertinibs, Caracemidas, Carbetímeros, Carboquinonas, Carmofures, Carubicinas, Carzelesinas, Cedefingoles, Cemadotinas, Clorambucilos, Cioteroneles, Cirolemicinas, Clafenures, Clotarabinas, Crisnatoles, Decitabinas, Dexniguldipinas, Dexormaplatinos, Dezaguaninas, Diaziquonas, Dibrospidios, Dienogests, Dinalinas, Disermolidas, Dofequidares, Doxiluridinas, Droloxifeno, Duazomicinas, Ecomustinas, Edatrexatos, Edotecarinas, Eflornitinas, Elacridares, Elinafidas, Elsamitricinas, Emitefures, Enloplatinos, Enpromatos, Enzastaurinas, Epiropidinas, Eptaloprosts, Erbulozoles, Esorubicinas, Etanidazoles, Etoglúcidos, Etoprinas, Exisulindes, Fadrozoles, Fazarabinas, Fenretinidas, Fluoximesterona, Flurocitabinas, Fosquidonas, Fostriecinas, Fotretaminas, Galarrubicinas, Galocitabinas, Geroquinoles, Gimitecanos, Gimeracilos, Gloxazonas, Glufosfamidas, Ilmofosinas, Ilomastats, Imexones, Improsulfanes, Indisulams, Inproquinonas, Interleucinas, Interleucinas-2, Interleucinas recombinantes, Intoplicinas, Iobenguanos, Iproplatinos, Irsogladinas, Ixabepilonas, Quetotrexatos, L-Alanosinas, Lanreotidas, Lapatibins,

55 60 65

Ledoxantronas, Leuprolides, Leuprorelinas, Lexacalcitoles, Liarozoles, Lobaplatinos, Lometrexoles, Lonafarnibs, Losoxantronas, Lurtotecanes, Mafosfamidas, Mannosulfanes, Marimastats, Masoprocoles, Maitansinas, Mecloretaminas, Melengestroles, Melfalanes, Menogarilos, Mepitiostanos, Metesindes, Metomidatos, Metoprinas, Meturedepas, Miboplatinos, Miproxifenos, Misonidazoles, Mitindomidas, Mitocarcinas, Mitocrominas, Mitoflaxonas, Mitogillinas, Mitoguazonas, Mitomalquinas, Mitonafidas, Mitoquidonas, Mitosperes, Mitozolomidas, Mivobulinas, Mizoribinas, Mofarotenos, Mopidamoles, Mubritinibs, Ácidos Micofenólicos, Nedaplatinos, Neizarabinas, Nemorrubicinas, Nitracrinas, Nocodazoles, Nogalamincinas, Nolatrexedes, Nortopixantronas, Ormaplatinos, Ortataxeles, Oteracilos, Oxisuranos, Oxofenarsinas, Patupilonas, Peldesinas, Peliomicinas, Pelitrexoles, Pemetrexedes, Pentamustinas, Peplomicinas, Perfosfamidas, Perifosinas, Picoplatinos, Pinafides, Pipsulfanos, Pirfenidonas, Piroxantronas, Pixantronas, Plevitrexedes, Plomestanos, Porfiromincinas, Prednimustinas, Propamidinas, Prospidios, Pumitepas, Puromincinas, Pirazofurinas, Ranimustinas, Riboprinas, Ritrosulfanos, Rogletimidias, Roquinimexes, Rufocromomicinas, Sabarrubicinas, Safingoles, Satraplatinos, Sebriplatinos, Semustinas, Simtrazenos, Sizofiranos, Sobuzoxanos, Sorafenibs, Esparfosatos, Ácidos Esparfósicos, Esparsomicinas, Espirogermanios, Espiromustinas, Espiroplatinos, Esqualaminas, Estreptonigrinas, Estreptovaricinas, Sufosfamidas, Sulofenures, Tacedinalines, Talisomicinas, Talimustinas, Tariquidares, Tauromustinas, Tecogalanes, Tegafures, Teloxantronas, Temoporfinas, Teroxironas, Tiamiprinas, Tiamiprinas, Tiazofurinas, Tilomisoles, Tilorones, Timcodares, Timonacics, Tirapazaminas, Topixantronas, Trabectedinas, Ecteinascidina 743, Trestlonas, Triciribinas, Trilostanos, Trimetrexatos, Tetranitratos de Triplatino, Triptorelinas, Trofosfamidas, Tubulozoles, Ubenimexes, Uredepas, Valspodares, Vapreotidas, Verteporfinas, Vinblastinas, Vindesinas, Vinepidinas, Vinfluninas, Vinformidas, Vinglicinatos, Vinleucinoles, Vinleurosinas, Vinrosidinas, Vintriptoles, Vinzolidinas, Vorozoles, Xantomincinas A, Guameciclinas, Zeniplatinos, Zilascorbs [2-H], Zinostatinas, Zorubicinas, Zosuquidares, Acetazolamidas, Aciclovires, Adipiodonas, Alatrofloxacinas, Alfentanilos, extractos alérgicos, inhibidores de Alfa 1-proteínasa, Alprostadilos, Amicacinas, Aminoácidos, ácidos Aminocaproicos, Aminofilinas, Amitriptilinas, Amobarbitales, Amrinonas, Analgésicos, vacunas Antipoliomielíticas, sueros antirrábicos, inmunoglobulinas Antitetánicas, vacunas del tétanos, Antitrombinas III, sueros Antiveneno, Argatrobanes, Argininas, ácidos Ascórbicos, Atenololes, Atracurios, Atropinas, Aurotioglucosas, Azatioprinas, Aztreonams, Bacitracinas, Baclofenos, Basiliximabs, ácidos Benzoicos, Benzotropinas, Betametasonas, Biotinas, Bivalirudinas, antitoxinas de Botulismo, Bretilios, Bumetanidas, Bupivacaínas, Buprenorfinas, Butorfanoles, Calcitoninas, Calcitrioles, Calcio, Capreomicinas, Carboprostos, Carnitinas, Cefamandoles, Cefoperazonas, Cefotaximas, Cefoxitinas, Cefizoximas, Cefuroximas, Cloranfenicoles, Cloroprocaínas, Cloroquinas, Clortiazidas, Clorpromazinas, ácidos Condroitin-sulfúricos, Coriogonadotropinas alfa, Cromos, Cidofovires, Cimetidinas, Ciprofloxacinas, Cisatracurios, Clonidinas, Codeínas, Colchicinas, Colistinas, Colágenos, triflutatos ovinos de Corticorelina, Corticotrofinas, Cosintropinas, Cianocobalaminas, Ciclosporinas, Cisteínas, Dacliximabs, Dalfopristinas, Dalteparinas, Danaparoides, Dantrolenos, Deferoxaminas, Desmopresinas, Dexametasonas, Dexmedetomidinas, Dexpanthenoles, Dextrans, dextrans de hierro, ácidos Diatrizoicos, Diazepam, Diazóxidas, Diccilominas, Digibinds, Digoxinas, Dihidroergotaminas, Diltiazems, Difenhidraminas, Dipiridamoles, Dobutaminas, Dopaminas, Doxacurios, Doxaprams, Doxercalciferoles, Doxiciclinas, Droperidoles, Difilinas, ácidos Edéticos, Edrofonios, Enalaprilats, Efedrinas, Epoprostenoles, Ergocalciferoles, Ergonovinas, Ertapenems, Eritromincinas, Esmololes, Estradioles, Estrogénicos, ácidos Etacrínicos, Etanolaminas, Etanoles, aceites Etiodizados, ácidos Etidrónicos, Etomidatos, Famotidinas, Fenoldopams, Fentanilos, Flumazenilos, Fluoresceínas, Flufenazinas, ácidos Fólicos, Fomepizoles, Fomiviresens, Fondaparinuxes, Foscarens, Fosfenitoínas, Furosemidas, Gadoteridoles, Gadoversetamidas, Ganciclovires, Gentamicinas, Glucagones, Glucosas, Glicinas, Glicopirrolatos, Gonadorelinas, Gonadotropinas coriónicas, polisacáridos de *Haemophilus* B, Heminas, Herbales, Histaminas, Hidralazinas, Hidrocortisonas, Hidromorfonas, Hidroxocobalaminas, Hidroxizinas, Hiosciaminas, Ibutilidas, Imiglucerasas, carminas de Índigo, Indometacinas, yoduros, Iopromidas, ácidos Iotalámicos, ácidos Ioxálglicos, Ioxilanos, Isoniazidas, Isoproterenoles, vacunas de la encefalitis Japonesa, Kanamicinas, Ketaminas, Labetaloles, Lepirudinas, Levobupivacaínas, Levotiroxinas, Lincomincinas, Liotironinas, hormonas Luteinizantes, vacunas de enfermedad de Lyme, Mangafodipires, Mantoles, vacunas de polisacáridos Meningocócicos, Meperidinas, Mepivacaínas, Mesoridazinas, Metamaminoles, Metadonas, Metocarbamoles, Metohexitales, Metildopatos, Metilergonovinas, Metoclopramidas, Metoprololes, Metronidazoles, Minociclinas, Mivacurios, ácidos Morruicos, Moxifloxacinas, Muromonabs-CD3, mofetilos Micofenolatos, Nafcilinas, Nalbufinas, Nalmefenos, Naloxonas, Neostigminas, Niacinamidas, Niacardipinas, Nitroglicerinas, Nitroprúsidos, Norepinefrinas, Orfenadrinas, Oxacilinas, Oximorfonas, Oxitetraciclina, Oxitocinas, Pancuronios, Pantenoles, ácidos Pantoténicos, Papaverinas, Peginterferones alfa 2A, Penicilinas G, Pentamidinas, Pentazocinas, Pentobarbitales, Perflutrenos, Perfenazinas, Fenobarbitales, Fentolaminas, Fenilefrinas, Fenitoínas, Fisostigminas, Fitonadionas, Polimixina, Pralidoximas, Prilocaínas, Procaínas, Proclorperazinas, Progesteronas, Propranololes, hidróxidos de Piridostigmina, Piridoxinas, Quinidinas, Quinupristinas, inmunoglobulinas de Rabia, vacunas de Rabia, Ranitidinas, Remifentanilos, Riboflavinas, Rifampinas, Ropivacaínas, Samarios, Escopolaminas, Selenio, Sermorelinas, Sinclidas, Somatrem, Espectinomincinas, Estreptoquininas, Estreptomincinas, Succinilcolinas, Sufentanilos, Sulfametozoles, Tacrolimus, Terbutalinas, Teriparatides, Testosteronas, antitoxinas del Tétanos, Tetracaínas, Tetradecil sulfatos, Teofilinas, Tiaminas, Tietilperazinas, Tiopentales, hormonas estimulantes de Tiroides, Tinzaparinas, Tirofibanos, Tobramicinas, Tolazolinas, Tolbutamidas, Torsemidas, ácidos Tranexámicos, Treprostiniles, Trifluoperazinas, Trimetobenzamidas, Trimetoprim, Trometaminas, Tuberculinas, vacunas Tifoideas, Urofollitropinas, Uroquininas, ácidos Valproicos, Vasopresinas, Vecuronios, Verapamilos, Voriconazoles, Warfarinas, vacunas de la fiebre Amarilla, Zidovudinas, Zincs, clorhidratos de Ziprasidona, Aclacinomicinas, Actinomicinas, Adriamicinas, Azaserinas, 6-Azauridinas, Carzinofilinas, Cromomicinas, Denopterinas, 6 Diazo 5 Oxo-L-Norleucinas, Encitabinas, Floxuridinas, Olivomicinas, Pirarrubicinas, Piritrexims, Pteropterinas, Tegafures, Tubercidinas,

Alteplastas, Arcitumomabs, bevacizumabs, Toxinas Botulínicas de Tipo A, Toxinas Botulínicas de Tipo B, Pendetidas de Capromab, Daclizumabs, Dornasas alfa, Drotrecoginas alfa, Pentetatos de Imciromab, Yodo-131, un agente antibiótico; un inhibidor de angiogénesis; sustancias anti-cataratas y anti-retinopatía diabética; inhibidores de anhidrasa carbónica; midriáticos; agentes de terapia fotodinámica; análogos de prostaglandina; factor de crecimiento; antineoplásicos; antimetabolitos, antivirales; amebicidas y anti-protozoarios; anti-tuberculosis y anti-lepróticos; antitoxinas y antiveninas; factor antihemófilo, complejo coagulante anti-inhibidor, antitrombina III, Factor de coagulación V, Factor de coagulación IX, fracción de proteína del plasma, factor de von Willebrand; agente antiplaquetario, un factor estimulante de colonias (CSF); un estimulante de la eritropoyesis; hemostáticos y albúminas; Inmunoglobulinas, inhibidores de trombina; anticoagulantes; un fármaco antiinflamatorio esteroideo seleccionado de entre alclometasonas, algestonas, beclometasonas, betametasonas, budesonidas, clobetasoles, clobetasonas, clocortolonas, cloprednol, corticosteronas, cortisonas, cortivazoles, deflazacorts, desonidas, desoximetasonas, dexametasonas, diflorasonas, diflucortolonas, difluprednatos, enoxolonas, fluazacorts, flucoronidas, flumetasonas, flunisolidas, flucicilonas, flucicilonidas, flucortinas, flucortolonas, fluorometolonas, fluperolonas, fluprednidenos, fluprednisolonas, flurandrenolidas, fluticasonas, formocortales, halcinonidas, halobetasoles, halometasonas, halopredonas, hidrocortamatos, hidrocortisonas, etabonato de loteprednol, mazipredonas, medrisonas, meprednisonas, metilprednisolonas, furoato de mometasona, parametasonas, prednicarbatos, prednisolonas, prednisonas, prednivaes, prednilidenos, rimexolonas, tixocortoles y triamcinolonas; Docosanoles, prostaglandinas, análogos de prostaglandina, antiprostaglandinas y precursores de prostaglandina; mióticos, colinérgicos y anticolinesterasa; y anti-alérgicos.

Las composiciones y polipéptidos de PH20 modificados pueden usarse para tratar cualquier afección normalmente tratada por el polipéptido de PH20 o el agente terapéuticamente activo. Estas incluyen, por ejemplo, afecciones en las que el hialuronano desempeña un papel o está asociado con la etiología de la enfermedad debido, por ejemplo, a la acumulación o sobreproducción de hialuronano. Se proporcionan por lo tanto composiciones de acuerdo con las presentes reivindicaciones para tratar una enfermedad o afección asociada con hialuronano administrando cualquiera de los polipéptidos de PH20 modificados o composiciones reivindicadas. Las enfermedades o afecciones asociadas con hialuronano incluyen, por ejemplo, enfermedad inflamatoria y tumores o cánceres, incluyendo un cáncer de estadio tardío, cánceres metastáticos y cánceres indiferenciados, tales como cáncer ovárico, carcinoma *in situ* (ISC), carcinoma de células escamosas (SCC), cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama y cáncer de colon. El polipéptido de PH20 puede modificarse para mostrar semivida aumentada para dichos tratamientos. Por ejemplo, el polipéptido de PH20 puede modificarse con un polímero tal como un resto de PEG para dichos tratamientos.

También se describen métodos para aumentar el suministro de un agente terapéutico a un sujeto: administrando a un sujeto cualquiera de los polipéptidos de PH20 modificaciones o composiciones descritas en el presente documento y administrando el agente terapéutico. El agente terapéutico puede administrarse en la misma composición o por separado, y puede administrarse antes o después, simultáneamente o intermitentemente, con la administración del polipéptido o los polipéptidos de PH20. La administración incluye cualquier vía, incluyendo administración intravenosa y subcutánea tal como simultáneamente con, intermitentemente con, o después de la administración del agente terapéutico. Los agentes terapéuticos incluyen cualquiera de los expuestos anteriormente, en otra parte del presente documento y/o conocidos por los expertos en la materia.

También se describen métodos para tratar un exceso de glucosaminoglucanos; para tratar un tumor; para tratar la acumulación de glucosaminoglucano en el cerebro; para tratar un trastorno cardiovascular; para tratar un trastorno oftálmico; para tratar enfermedad pulmonar; para aumentar la penetración de agentes quimioterapéuticos en tumores sólidos; para tratar la celulitis; para tratar un trastorno proliferativo; o para aumentar la biodisponibilidad de fármacos y otros agentes terapéuticos administrando los polipéptidos de PH20 modificados o composiciones descritas en el presente documento.

También se describen composiciones farmacéuticas para su uso en el suministro de un agente terapéutico a un sujeto; para tratar un exceso de glucosaminoglucanos; para tratar un tumor; para tratar la acumulación de glucosaminoglucanos en el cerebro; para tratar un trastorno cardiovascular; para tratar un trastorno oftálmico; para tratar enfermedad pulmonar; para aumentar la penetración de agentes quimioterapéuticos en tumores sólidos; para tratar la celulitis; para tratar un trastorno proliferativo; o para aumentar la biodisponibilidad de fármacos y otros agentes terapéuticos; y para cualquier otro uso de composiciones que contienen polipéptidos de PH20.

Se describe en el presente documento un método para identificar o seleccionar una enzima degradante de hialuronano modificada que muestra estabilidad en una condición de desnaturalización que incluye las etapas de: a) ensayar la actividad de una enzima degradante de hialuronano modificada en una composición que contiene un agente desnaturalizante y/o en una condición desnaturalizante; b) ensayar la actividad de la enzima degradante de hialuronano modificada en la misma composición y/o en las mismas condiciones que a) excepto sin el agente o condición desnaturalizante; y c) seleccionar o identificar una enzima degradante de hialuronano modificada que muestra actividad en a) que es al menos 5 % de la actividad en b). En dicho ejemplo, la actividad es actividad hialuronidasa. En algunos ejemplos de los métodos, se selecciona o se identifica una enzima degradante de hialuronano modificada si la actividad en a) es al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de la actividad en b), por ejemplo, se selecciona o

identifica una enzima degradante de hialuronano modificada si la actividad en a) es al menos 40 % o más de la actividad en b). El método también puede incluir las etapas de: d) comparar la actividad de la enzima degradante de hialuronano modificada en a) con la actividad de la enzima degradante de hialuronano no modificada ensayada en las mismas condiciones; y e) identificar o seleccionar una enzima degradante de hialuronano modificada que muestra al menos 120 %, 130 %, 135 %, 140 %, 145 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 500 %, 1500 %, 2000 %, 3000 %, 4000 %, 5000 % o más de la actividad hialuronidasa en comparación con la enzima degradante de hialuronano no modificada.

También se describe en el presente documento un método para identificar o seleccionar una enzima degradante de hialuronano modificada que muestra estabilidad, tal como estabilidad aumentada, en una condición de desnaturalización, que incluye las etapas de: a) ensayar la actividad de una enzima degradante de hialuronano modificada en una composición que contiene un agente desnaturalizante y/o en una condición desnaturalizante; b) ensayar la actividad de la enzima degradante de hialuronano no modificada correspondiente en una composición que contiene el mismo agente desnaturalizante y/o en la misma condición desnaturalizante que a), por lo que la actividad se ensaya en las mismas condiciones que a); y c) seleccionar o identificar una enzima degradante de hialuronano modificada que muestra mayor actividad que la enzima degradante de hialuronano no modificada, identificando o seleccionando de este modo una enzima degradante de hialuronano modificada que muestra estabilidad aumentada en una condición desnaturalizante. En dicho ejemplo, la actividad puede ser una actividad hialuronidasa. En ejemplos del método, se selecciona o se identifica una enzima degradante de hialuronano modificada si la actividad es al menos 120 %, 130 %, 135 %, 140 %, 145 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 500 %, 1500 %, 2000 %, 3000 %, 4000 %, 5000 % o más de la actividad en comparación con la enzima degradante de hialuronano no modificada. En dicho ejemplo, el método también puede incluir las etapas adicionales de: d) ensayar la actividad de la enzima degradante de hialuronano modificada seleccionada o identificada en una composición que contiene un agente desnaturalizante y/o en una condición desnaturalizante; e) ensayar la actividad de la misma enzima degradante de hialuronano modificada seleccionada o identificada en la misma composición y/o en las mismas condiciones que d) excepto sin el agente o la condición desnaturalizante; y f) seleccionar o identificar una enzima degradante de hialuronano modificada que muestra actividad en d) que es al menos 5 % de la actividad en e). En dicho ejemplo, la actividad es actividad hialuronidasa. En algunos ejemplos de los métodos, se selecciona o identifica una enzima degradante de hialuronano modificada si la actividad en d) es al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de la actividad en e), por ejemplo, se selecciona o identifica una enzima degradante de hialuronano modificada si la actividad en d) es al menos 40 % o más de la actividad en e).

En cualquier de los métodos descritos en el presente documento para identificar o seleccionar una enzima degradante de hialuronano modificada, el agente o la condición desnaturalizante está causado por temperatura, agitación, ausencia de sal o baja salinidad o la presencia de un excipiente. Por ejemplo, el agente o la condición desnaturalizante está provocado por temperatura elevada que es de o de aproximadamente 30 °C a 42 °C, tal como más de o más de aproximadamente 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C o 42 °C. En otros ejemplos, el agente o la condición desnaturalizante es la ausencia de sal o baja salinidad menor de 100 mM, tal como baja salinidad menor de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 25 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM. En ejemplos adicionales, el agente o la condición desnaturalizante es un excipiente desnaturalizante seleccionado de entre antiadherentes, aglutinantes, recubrimientos, cargas y diluyentes, saporíferos, colorantes, lubricantes, emolientes, conservantes, sorbentes y edulcorantes.

En ejemplos particulares de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para identificar o seleccionar una enzima degradante de hialuronano modificada, el agente o la condición desnaturalizante es un conservante o conservantes, por ejemplo, un conservante o conservantes fenólicos. El conservante o conservantes fenólicos pueden ser un fenol, metacresol (m-cresol), alcohol bencílico o un parabeno. Por ejemplo, el agente o la condición desnaturalizante es un conservante o conservantes que son fenol y/o m-cresol. En dichos ejemplos, la cantidad total de conservante fenólico en la composición, como porcentaje (%) de concentración en masa (p/v), es de o de aproximadamente 0,05 % a 0,6 %, 0,1 % a 0,4 %, 0,1 % a 0,3 %, 0,15 % a 0,325 %, 0,15 % a 0,25 %, 0,1 % a 0,2 %, 0,2 % a 0,3 % o 0,3 % a 0,4 % inclusive.

En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para identificar o seleccionar una enzima degradante de hialuronano modificada, antes de ensayar la actividad de una composición de enzima degradante de hialuronano en a) y/o b), la enzima degradante de hialuronano se expone a la condición de desnaturalización o el agente desnaturalizante durante un tiempo predeterminado. El tiempo predeterminado es un periodo de tiempo que selecciona el usuario dependiendo de la enzima degradante de hialuronano particular que se hace evolucionar o se selecciona, la condición de desnaturalización o agente desnaturalizante particular, la cantidad o alcance de la condición de desnaturalización o agente desnaturalizante, la aplicación o uso de la enzima degradante de hialuronano y otros factores similares. Por ejemplo, el tiempo predeterminado puede ser de o de aproximadamente 1 minuto a 1 mes, 1 minuto a 3 semanas, 1 minuto a 2 semanas, 1 minuto a 1 semana, 1 minuto a 24 horas, 1 minuto a 12 horas, 30 minutos a 6 horas o 1 hora a 4 horas, tal como al menos o aproximadamente al menos 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 24 horas, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, 7 días, dos semanas o un mes.

En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para identificar o seleccionar una enzima degradante de hialuronano modificada, la enzima degradante de hialuronano modificada es una que contiene un reemplazo, una inserción o una supresión de aminoácidos en comparación con una enzima degradante de hialuronano no modificada. Por ejemplo, la enzima degradante de hialuronano modificada contiene un reemplazo de aminoácidos tal como un único reemplazo de aminoácido o dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más reemplazos de aminoácidos en comparación con una forma no modificada de la enzima degradante de hialuronano. En aspectos particulares del método, se explora una biblioteca o colección de enzimas degradantes de hialuronano modificadas para hacer evolucionar o identificar o solucionar una enzima degradante de hialuronano modificada que muestra estabilidad, tal como estabilidad aumentada, en una condición desnaturalizante. Por lo tanto, en ejemplos de los métodos del presente documento, se ensayan una pluralidad de enzimas degradantes de hialuronano modificadas en a) y/o b). En dichos ejemplos, la pluralidad de enzimas degradantes de hialuronano modificadas están modificadas en comparación con la enzima degradante de hialuronano no modificada correspondiente para generar una colección de enzimas degradantes de hialuronano modificadas, por lo que cada proteína modificada en la colección se ensaya en cada uno de a) y/o b). En la colección o biblioteca, cada enzima degradante de hialuronano modificada contiene un único reemplazo de aminoácido en comparación con la forma no modificada de la enzima degradante de hialuronano, de modo que la pluralidad de enzimas modificadas es tal que el aminoácido en cada posición modificada se reemplaza por hasta 1-19 otros aminoácidos distintos del aminoácido original en la posición, por lo que cada enzima degradante de hialuronano modificada contiene un reemplazo de aminoácido diferente, y cada aminoácido a lo largo de la longitud de la enzima degradante de hialuronano, o una parte seleccionada de la misma, se reemplaza.

En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la enzima degradante de hialuronano modificada está modificada en comparación con una enzima degradante de hialuronano no modificada mediante inserción, supresión o reemplazo de un aminoácido o aminoácidos. La enzima degradante de hialuronano no modificada puede ser una condroitinasa o puede ser una hialuronidasa. En ejemplos del presente documento, la hialuronidasa no modificada es una hialuronidasa PH20 o forma troncada de la misma que carece de un sitio de unión a anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) C terminal o una parte del sitio de unión a anclaje de GPI, por lo que la forma troncada muestra actividad hialuronidasa. La hialuronidasa PH20 puede ser una PH20 humana, de mono, bovina, ovina, de rata, de zorro, de ratón o de cobaya. En ejemplos particulares, la hialuronidasa PH20 es una PH20 humana o una forma troncada en el extremo C terminal de la misma. Por ejemplo, la enzima degradante de hialuronano no modificada es una que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 10, 12, 14, 24, 32-66, 69, 72, 857, 859, 861, 870 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 10, 12, 14, 24, 32-66, 69, 72, 857, 859, 861, 870, tal como al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 10, 12, 14, 24, 32-66, 69, 72, 857, 859, 861 u 870. En ejemplos particulares, la enzima degradante de hialuronano no modificada es una hialuronidasa PH20 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72, o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 85 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72, tal como una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72.

En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para identificar o seleccionar una enzima degradante de hialuronano modificada que muestra estabilidad, el método se realiza *in vitro*. También se describe cualquiera de los métodos que son por iteraciones, por lo que las etapas del método se repiten una pluralidad de veces, donde en cada repetición, se generan y ensayan más enzimas degradantes de hialuronano modificadas de una enzima degradante de hialuronano modificada seleccionada, por lo que la enzima degradante de hialuronano modificada evoluciona para mostrar estabilidad aumentada en una condición de desnaturalización. También se describe en el presente documento una enzima degradante de hialuronano modificada identificada por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** representa la secuencia de aminoácidos de PH20 humana de longitud completa (expuesta en SEQ ID NO: 7) y variantes troncadas en el extremo C terminal solubles de la misma. El resto de aminoácido C terminal de variantes troncadas en el extremo C terminal ejemplares de PH20 de longitud completa se indica en negrita. Las secuencias de aminoácidos completas de variantes troncadas en el extremo C terminal ejemplares de PH20 de longitud completa también se proporcionan en SEQ ID NO: 3 y 32-66. El resto de aminoácido C terminal de una PH20 soluble ejemplar, cuya secuencia completa se expone en SEQ ID NO: 3, también se indica por subrayado. Se indican mediante resaltado posiciones ejemplares, no limitantes, para reemplazos de aminoácidos. Las posiciones correspondientes pueden identificarse por alineamiento de una secuencia de interés con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7 o 32-66, y en particular con SEQ ID NO: 3.

La **Figura 2** representa alineamientos ejemplares de PH20 soluble humana expuesta en SEQ ID NO: 3 con otros polipéptidos de PH20. Un “*” significa que los restos alineados son idénticos, un “.” significa que los restos alineados no son idénticos, pero son similares y contienen restos de aminoácidos conservativos en la posición alineada, y un “~” Significa que los restos alineados son similares y contienen restos de aminoácidos

semiconservativos en la posición alineada. Se indican mediante resaltado posiciones correspondientes, ejemplares, no limitantes, para reemplazos de aminoácidos. Por ejemplo, la **Figura 2A** representa el alineamiento de una PH20 soluble humana expuesta en SEQ ID NO: 3 con PH20 de chimpancé expuesta en SEQ ID NO: 10. La **Figura 2B** representa el alineamiento de una PH20 soluble humana expuesta en SEQ ID NO: 3 con PH20 de mono Rhesus expuesta en SEQ ID NO: 12. La **Figura 2C** representa el alineamiento de una PH20 soluble humana expuesta en SEQ ID NO: 3 con PH20 de mono Cynomolgus expuesta en SEQ ID NO: 14. La **Figura 2D** representa el alineamiento de una PH20 soluble humana expuesta en SEQ ID NO: 3 con PH20 bovina expuesta en SEQ ID NO: 16. La **Figura 2E** representa el alineamiento de una PH20 soluble humana expuesta en SEQ ID NO: 3 con PH20 de ratón expuesta en SEQ ID NO: 20. La **Figura 2F** representa el alineamiento de una PH20 soluble humana expuesta en SEQ ID NO: 3 con PH20 de rata expuesta en SEQ ID NO: 22. La **Figura 2G** representa el alineamiento de una PH20 soluble humana expuesta en SEQ ID NO: 3 con PH20 de conejo expuesta en SEQ ID NO: 24. La **Figura 2H** representa el alineamiento de una PH20 soluble humana expuesta en SEQ ID NO: 3 con PH20 de cobaya expuesta en SEQ ID NO: 29. La **Figura 2I** representa el alineamiento de una PH20 soluble humana expuesta en SEQ ID NO: 3 con PH20 de zorro expuesta en SEQ ID NO: 31. La **Figura 2J** representa el alineamiento de una PH20 soluble humana expuesta en SEQ ID NO: 3 con PH20 de gibón expuesta en SEQ ID NO: 857. La **Figura 2K** representa el alineamiento de una PH20 soluble humana expuesta en SEQ ID NO: 3 con PH20 de tití expuesta en SEQ ID NO: 859. La **Figura 2L** representa el alineamiento de una PH20 soluble humana expuesta en SEQ ID NO: 3 con PH20 de orangután expuesta en SEQ ID NO: 861.

Descripción detallada

Esquema

- 25 A. Definiciones
- B. Hialuronidasa PH20
 - 1. Estructura
 - 2. Función
 - 30 3. Polipéptidos de PH20 solubles
- C. Polipéptidos de PH20 modificados
 - 1. Mutantes activos
 - 35 a. Actividad aumentada
 - b. Estabilidad aumentada
 - i. Fenófilos
 - 40 ii. Termófilos
 - iii. Ausencia de sal
 - 2. Mutantes Inactivos
 - 3. Modificaciones adicionales
 - 45 a. Inmunogenicidad reducida
 - b. Conjugación con polímeros
- D. Métodos para identificar enzimas degradantes de hialuronano modificadas con propiedades o actividades alteradas
 - 50 1. Enzimas degradantes de hialuronano y bibliotecas de enzimas degradantes de hialuronano modificadas
 - 2. Exploración o ensayo con respecto a una actividad o propiedad deseada
 - 3. Selección o identificación
 - 55 4. Métodos por iteraciones
- E. Producción de polipéptidos modificados y moléculas de ácido nucleico codificantes
 - 60 1. Aislamiento o preparación de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de PH20
 - 2. Generación de ácido nucleico mutante o modificado y que codifica polipéptidos
 - 3. Vectores y células
 - 4. Expresión
 - 65 a. Células procariotas
 - b. Células de levadura
 - c. Insectos y células de insectos

- d. Expresión de mamíferos
- e. Plantas y células vegetales

- 5. Purificación
- 6. Modificación de polipéptidos por PEGilación

F. Composiciones farmacéuticas y formulaciones, dosificaciones y administración

- 1. Formulaciones (líquidos, inyectables, soluciones y emulsiones)

- a. Liofilizadas
- b. Formulaciones ejemplares

- i. NaCl
- ii. pH y tampón
- iii. Conservantes
- iv. Estabilizadores

- 2. Composiciones para otras vías de administración
- 3. Dosificaciones y administración
- 4. Co-formulaciones de PH20-insulina ejemplares
- 5. Envasado, artículos de fabricación y kits

G. Métodos para evaluar la actividad hialuronidasa

- 1. Actividad hialuronidasa
- 2. Solubilidad
- 3. Pureza, cristalización o agregación
- 4. Farmacodinámica/farmacocinética

H. Métodos de tratamiento y terapia de combinación

- 1. Métodos de suministro de agentes terapéuticos y suministro de insulina
- 2. Métodos de tratamiento de enfermedades y afecciones asociadas con hialuronano
- 3. Otros usos
- 4. Anticoncepción

I. Ejemplos

40 A. DEFINICIONES

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la invención o las invenciones. En caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos del presente documento, prevalecerán los de esta sección. Cuando se hace referencia a una URL u otro de dichos identificadores o direcciones, se entenderá que dichos identificadores pueden cambiar y la información particular en internet puede aparecer y desaparecer, pero puede encontrarse información equivalente buscando en internet. La referencia a la misma demuestra la disponibilidad y diseminación pública de dicha información.

Como se usa en el presente documento, una enzima degradante de hialuronano se refiere a una enzima que cataliza la escisión de un polímero de hialuronano (también denominado ácido hialurónico o HA) en fragmentos de menor peso molecular. Son enzimas degradantes de hialuronano ejemplares hialuronidasas, y condroitinasas y liasas particulares que tienen la capacidad de despolimerizar hialuronano. Las condroitinasas ejemplares que son enzimas degradantes de hialuronano incluyen, pero sin limitación, condroitín ABC liasa (también conocida como condroitinasa ABC), condroitín AC liasa (también conocida como condroitín sulfato liasa o condroitín sulfato eliminasa) y condroitín C liasa. La condroitín ABC liasa contiene dos enzimas, condroitín sulfato-ABC endoliasa (EC 4.2.2.20) y condroitín sulfato-ABC exoliasa (EC 4.2.2.21). Unas condroitín sulfato-ABC endoliasas y condroitín sulfato-ABC exoliasas ejemplares incluyen, pero sin limitación, las de *Proteus vulgaris* y *Pedobacter heparinus* (la condroitín-sulfato-ABC endoliasa de *Proteus vulgaris* se expone en SEQ ID NO: 922; Sato *et al.* (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol. 41(1):39-46). Las enzimas de condroitinasa AC ejemplares de bacterias incluyen, pero sin limitación, las de *Pedobacter heparinus*, expuestas en SEQ ID NO: 923, *Victivallis vadensis*, expuesta en SEQ ID NO: 924 y *Arthrobacter aurescens* (Tkalec *et al.* (2000) Applied and Environmental Microbiology 66(1): 29-35; Ernst *et al.* (1995) Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30(5): 387-444). Las enzimas condroitinasa C ejemplares de bacterias incluyen, pero sin limitación, las de *Streptococcus* y *Flavobacterium* (Hibi *et al.* (1989) FEMS-Microbiol-Lett. 48(2): 121-4; Michelacci *et al.* (1976) J. Biol. Chem. 251:1154-8; Tsuda *et al.* (1999) Eur. J. Biochem. 262: 127-133).

Como se usa en el presente documento, hialuronidasa se refiere a una clase de enzimas que degradan hialuronano. Las hialuronidasas incluyen, pero sin limitación, hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.2.1 o EC 4.2.99.1), hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos (EC 3.2.1.36) y hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35). Las hialuronidasas incluyen cualquiera de origen no humano incluyendo, pero sin limitación, murinas, caninas, felinas, leporinas, aviares, bovinas, ovinas, porcinas, equinos, ícticas, de ranas, bacterianas y cualquiera de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas humanas ejemplares incluyen HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 y PH20. También se incluyen entre las hialuronidasas, hialuronidasas solubles, incluyendo PH20 ovina y bovina y PH20 soluble. Las hialuronidasas ejemplares incluyen cualquiera expuesta en SEQ ID NO: 6, 7-31, 69, 70, 71, 72, 856-861, 869-921, formas maduras de las mismas (que carecen de la secuencia señal) o variantes alélicas o de especie de las mismas. Las hialuronidasas también incluyen formas truncadas de las mismas que muestran actividad hialuronidasa, incluyendo variantes truncadas en el extremo C terminal que son solubles.

Como se usa en el presente documento, PH20 se refiere a un tipo de hialuronidasa que aparece en el espermatozoide y es activa neutra. PH20 aparece en la superficie del espermatozoide, y en el acrosoma derivado del lisosoma, donde se une con la membrana acrosómica interna. PH20 incluye las de cualquier origen incluyendo, pero sin limitación, humano, de chimpancé, de mono *Cynomolgus*, de mono Rhesus, murino, bovino, ovino, de cobaya, de conejo y de rata. Los polipéptidos de PH20 ejemplares, incluyendo formas precursoras y maduras, incluyen los de ser humano (SEQ ID NO: 6 y 7), chimpancé (SEQ ID NO: 8, 9, 10, 869 y 870), mono Rhesus (SEQ ID NO: 11 y 12), mono *Cynomolgus* (SEQ ID NO: 13 y 14), vaca (por ejemplo, SEQ ID NO: 15-18); ratón (SEQ ID NO: 19 y 20); rata (SEQ ID NO: 21 y 22); conejo (SEQ ID NO: 23 y 24); oveja (SEQ ID NO: 25-27), cobaya (SEQ ID NO: 28 y 29); zorro (SEQ ID NO: 30 y 31); gibón (SEQ ID NO: 856 y 857), tití (SEQ ID NO: 858 y 859) y orangután (SEQ ID NO: 860 y 861). La referencia PH20 incluye polipéptidos de PH20 precursores y polipéptidos de PH20 maduros (tales como en los que se ha retirado una secuencia señal), formas truncadas de los mismos que tienen actividad e incluye variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de corte y empalme y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con los polipéptidos precursores expuestos en SEQ ID NO: 7, o las formas maduras de los mismos. Los polipéptidos de PH20 también incluyen los que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y los que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, PEGilación, albuminación, glucosilación, farnisilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones de los polipéptidos conocidas en la técnica. Son ejemplos de hialuronidasas solubles bovinas u ovinas disponibles en el mercado hialuronidasa Vitrase® (hialuronidasa ovina) y hialuronidasa Amphadase® (hialuronidasa bovina).

Como se usa en el presente documento, una PH20 soluble se refiere a un polipéptido caracterizado por su solubilidad en condiciones fisiológicas. En general, una PH20 soluble carece de toda o una parte de una secuencia de unión a anclaje de glucosilfosfatidilo (GPI), o no se ancla de otro modo lo suficiente a la membrana celular. Por ejemplo, un PH20 soluble puede ser una variante truncada en el extremo C terminal de una PH20 que carece de una secuencia contigua de aminoácidos que corresponde a toda o a una parte de una secuencia de unión a anclaje de glucosilfosfatidilo (GPI). Por lo tanto, tras la expresión a partir de una célula, una PH20 soluble se secreta al medio. Las proteínas de PH20 solubles pueden distinguirse, por ejemplo, por su división en la fase acuosa de una solución de Triton X-114 calentada a 37 °C (Bordier *et al.*, (1981) *J. Biol. Chem.*, 256: 1604-7). Las hialuronidasas ancladas a membrana, tales como ancladas a lípidos, se dividirán en la fase rica en detergente, pero se dividirán en la fase pobre en detergente o acuosa después del tratamiento con Fosfolipasa-C. Se incluyen entre hialuronidasas PH20 solubles las hialuronidasas ancladas a membrana en las que una o más regiones asociadas con el anclaje de la hialuronidasa con la membrana se ha retirado o modificado, donde la forma soluble conserva actividad hialuronidasa. Las hialuronidasas solubles incluyen hialuronidasas recombinantes y las contenidas en o purificadas a partir de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, extractos de testículos de ovejas o vacas. Son ejemplos de dichas hialuronidasas solubles PH20 humana soluble (SEQ ID NO: 3 o 32-66). Otras hialuronidasas solubles incluyen PH20 ovina (SEQ ID NO: 25-27) y bovina (SEQ ID NO: 16 o 18).

Como se usa en el presente documento, PH20 humana soluble (sHuPH20) incluye polipéptidos de PH20 humanos que carecen de una secuencia contigua de aminoácidos del extremo C terminal de PH20 humana que incluye toda o una parte de la secuencia de anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) (polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C terminal) de modo que tras la expresión, los polipéptidos son solubles en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 humanos solubles son polipéptidos truncados en el extremo C terminal de PH20 humana expuestos como SEQ ID NO: 6 en su forma precursora o en SEQ ID NO: 7 en su forma madura que carece de la secuencia señal, o variantes alélicas de los mismos (por ejemplo, expuestas en cualquiera de las SEQ ID NO: 68-72). La solubilidad puede evaluarse por cualquier método adecuado que demuestre solubilidad en condiciones fisiológicas. Es un ejemplo de dichos métodos el ensayo de Triton® X-114, que evalúa la división en la fase acuosa y que se ha descrito anteriormente. Además, un polipéptido de PH20 humano soluble es, si se produce en células CHO, tales como células CHO-S, un polipéptido que se expresa y se secreta en el medio de cultivo celular. Los polipéptidos de PH20 humanos solubles, sin embargo, no se limitan a los producidos en células CHO, sino que pueden producirse en cualquier célula o por cualquier método, incluyendo expresión recombinante y síntesis de polipéptidos. La referencia a secreción de células CHO es de definición. Por lo tanto, si un polipéptido puede expresarse y secretarse en células CHO y es soluble en el medio, es decir, se divide en la fase acuosa cuando se extrae con Triton® X-114, es un polipéptido de PH20 soluble tanto si se produce así como si no. Los polipéptidos

precursores para polipéptidos de sHuPH20 pueden incluir una secuencia señal, tal como una secuencia señal heteróloga o no heteróloga (es decir, nativa). Son ejemplos de los precursores los que incluyen una secuencia señal, tal como la secuencia señal de 35 aminoácidos nativa en las posiciones de aminoácidos 1-35 (véase, por ejemplo, aminoácidos 1-35 de SEQ ID NO: 6).

5 Como se usa en el presente documento, "nativo" o "de tipo silvestre" en referencia a un polipéptido de PH20 se refiere a un polipéptido de PH20 codificado por un gen de PH20 de origen natural o nativo, incluyendo variantes alélicas, que está presente en un organismo, incluyendo un ser humano y otros animales, en la naturaleza. Se pretende que la referencia a PH20 de tipo silvestre sin referencia a una especie abarque cualquier especie de una PH20 de tipo silvestre. Se incluyen entre los polipéptidos de PH20 de tipo silvestre los polipéptidos precursores codificados, fragmentos de los mismos, y formas procesadas de los mismos, tales como una forma madura que carece del péptido señal así como cualquier forma procesada pre o postraduccionalmente o modificada del mismo. También se incluyen entre los polipéptidos de PH20 nativos los que se modifican postraduccionalmente incluyendo, pero sin limitación, los que se modifican por glucosilación, carboxilación y/o hidroxilación. Las secuencias de aminoácidos de PH20 humana de tipo silvestre ejemplar se exponen en SEQ ID NO: 6 y 7 y las de variantes alélicas, incluyendo formas maduras de las mismas, se exponen en SEQ ID NO: 68-72. Otros animales producen PH20 nativa, incluyendo, pero sin limitación, secuencias nativas o de tipo silvestre expuestas en cualquiera de las SEQ ID NO: 8-31, 856-861, 869 u 870.

20 Como se usa en el presente documento, la modificación es en referencia a modificación de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico e incluye supresiones, inserciones y reemplazos de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones postraduccionales u otros cambios a la molécula que puede producirse debido a conjugación o enlace, directa o indirectamente, con otro resto. Los métodos de modificación de un polipéptido son rutinarios para los expertos en la materia, tal como usando metodologías de ADN recombinante.

30 Como se usa en el presente documento, una "enzima degradante de hialuronano modificada" se refiere a una enzima degradante de hialuronano que contiene una modificación en comparación con una enzima degradante de hialuronano de referencia o no modificada. La modificación puede ser un reemplazo de aminoácido (sustitución), inserción (adición) o supresión de uno o más restos de aminoácidos. El resto de aminoácido puede ser un aminoácido natural o no natural. En algunos casos, la modificación puede ser una modificación postraduccional. Una enzima degradante de hialuronano modificada puede tener hasta 150 diferencias de aminoácidos en comparación con una enzima degradante de hialuronano de referencia o no modificada, siempre que la enzima degradante de hialuronano modificada resultante muestre actividad hialuronidasa. Típicamente, una enzima degradante de hialuronano modificada contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 modificaciones de aminoácidos.

40 Como se usa en el presente documento, una enzima degradante de hialuronano no modificada se refiere a un polipéptido de partida que se selecciona para modificación como se proporciona en el presente documento. El polipéptido de partida puede ser una forma de tipo silvestre, de origen natural, de un polipéptido. Además, el polipéptido de partida puede alterarse o mutarse, de modo que difiera de una isoforma de tipo silvestre nativa pero no obstante se hace referencia al él en el presente documento como un polipéptido no modificado de partida en relación con los polipéptidos modificados posteriormente producidos en el presente documento. Por lo tanto, las proteínas existentes conocidas en la técnica que se han modificado para tener un aumento o reducción deseados en una actividad o propiedad particular en comparación con una proteína de referencia no modificada pueden seleccionarse y usarse como el polipéptido no modificado de partida. Por ejemplo, una proteína que se ha modificado de su forma nativa por uno o más cambios de aminoácidos individuales y posee un aumento o una reducción de una propiedad deseada, tal como un cambio en un resto o restos de aminoácidos para alterar la glucosilación, puede seleccionarse para modificación, y por lo tanto, se denomina en el presente documento no modificada, para modificación adicional. Una enzima degradante de hialuronano no modificada incluye enzimas degradantes de hialuronano humanas y no humanas, incluyendo enzimas degradantes de hialuronano de mamíferos no humanos y bacterias. Son enzimas degradantes de hialuronano no modificadas ejemplares cualquiera de las expuestas en SEQ ID NO: 2, 3, 6, 7-66, 68-72, 856-861, 869-924 o formas truncadas en el extremo C terminal, maduras, de las mismas que muestran actividad hialuronidasa, o una enzima degradante de hialuronano que muestra al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de la SEQ ID NO: 2, 3, 6, 7-66, 68-72, 856-861, 869-924. Se entiende que una enzima degradante de hialuronano no modificada generalmente es una que no contiene la modificación o las modificaciones, tales como reemplazo o reemplazos de aminoácidos de una enzima degradante de hialuronano modificada.

65 Como se usa en el presente documento, "polipéptido de PH20 modificado" o "polipéptido de PH20 variante" se refiere a un polipéptido de PH20 que contiene al menos una modificación de aminoácido, tal como al menos un reemplazo de aminoácido como se describe en el presente documento, en su secuencia de aminoácidos en comparación con un polipéptido de PH20 no modificado de referencia. Un polipéptido de PH20 modificado puede tener hasta 150 reemplazos de aminoácidos, siempre que el polipéptido de PH20 modificado resultante muestre

actividad hialuronidasa. Típicamente, un polipéptido de PH20 modificado contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 reemplazos de aminoácidos. Se entiende que un polipéptido de PH20 modificado también puede incluir una cualquiera o más modificaciones adicionales, además de al menos un reemplazo de aminoácido como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, un polipéptido de PH20 no modificado se refiere a un polipéptido de PH20 de partida que se selecciona para modificación como se proporciona en el presente documento. El polipéptido de partida puede ser una forma de tipo silvestre, de origen natural, de un polipéptido. Además, el polipéptido de partida puede alterarse o mutarse, de modo que difiere de una isoforma de tipo silvestre nativa pero se hace referencia a él no obstante en el presente documento como un polipéptido no modificado de partida en relación con los polipéptidos modificados posteriormente producidos en el presente documento. Por lo tanto, las proteínas existentes conocidas en la técnica que se han modificado para tener un aumento o una reducción deseados en una actividad o propiedad particular en comparación con una proteína de referencia no modificada pueden seleccionarse y usarse como el polipéptido no modificado de partida. Por ejemplo, una proteína que se ha modificado a partir de su forma nativa por uno o más cambios de aminoácidos individuales y posee un aumento o una reducción de una propiedad deseada, tal como un cambio en un resto o restos de aminoácidos para alterar la glucosilación, pueden seleccionarse para modificación, y por lo tanto se hace referencia a ella en el presente documento como no modificada, para modificación adicional. Los polipéptidos de PH20 no modificados ejemplares son un polipéptido de PH20 humano o variante alélica o de especie del mismo u otras variantes, incluyendo polipéptidos maduros y precursores. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 de referencia ejemplares son un polipéptido de PH20 de longitud completa maduro expuesto en SEQ ID NO: 7, 69 o 72, o en formas truncadas en extremo C terminal del mismo tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 3 y 32-66, o en un polipéptido de PH20 que muestra al menos 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72. Un polipéptido de PH20 de referencia también puede incluir la forma precursora correspondiente tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 6, 68, 70, 71 u otras formas precursoras, o en un polipéptido de PH20 que muestra al menos 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 6, 68, 70, 71. Se entiende que una enzima degradante de hialuronano no modificada generalmente es una que no contiene la modificación o las modificaciones, tal como reemplazo o reemplazos de aminoácidos de una enzima degradante de hialuronano modificada.

Como se usa en el presente documento, un resto ligado a N se refiere a un resto de aminoácido de asparagina (N) de un polipéptido que es capaz de glucosilarse por modificación postraduccional de un polipéptido. Los restos ligados a N ejemplares de PH20 humana incluyen los aminoácidos N47, N131, N200, N219, N333, N358 y N365 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o 7 (correspondiente a los restos de aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, N393 y N490 de PH20 humana expuesta en SEQ ID NO: 6).

Como se usa en el presente documento, un polipéptido N-glucosilado se refiere a un polipéptido de PH20 que contiene enlace oligosacárido de al menos tres restos de aminoácidos con enlaces N, por ejemplo restos ligados a N correspondientes a los restos de aminoácidos N200, N333 y N358 de SEQ ID NO: 3 o 7. Un polipéptido N glucosilado puede incluir un polipéptido donde tres, cuatro, cinco y hasta todos los restos ligados a N se unen con un oligosacárido. Los oligosacáridos ligados a N pueden incluir oligomanosa, oligosacáridos complejos, híbridos o sulfatados, u otros oligosacáridos y monosacáridos.

Como se usa en el presente documento, un polipéptido N parcialmente glucosilado se refiere a un polipéptido que contiene mínimamente un N-acetilglucosamina glucano unido con al menos tres restos ligados a N. Un polipéptido parcialmente glucosilado puede incluir diversas formas de glucano, incluyendo monosacáridos, oligosacáridos y formas de azúcar ramificadas, incluyendo las formadas por tratamiento de un polipéptido con EndoH, EndoF1, EndoF2 y/o EndoF3.

Como se usa en el presente documento, "condiciones" se refiere a cualquier parámetro que pueda influir en la actividad o propiedades de una proteína o un agente. Para fines del presente documento, las condiciones se refieren en general a la presencia, incluyendo cantidad, de excipientes, vehículos u otros componentes en una formulación distinta del agente activo (por ejemplo, hialuronidasa PH20 modificada); temperatura; tiempo (por ejemplo, tiempo de almacenamiento o exposición); recipiente de almacenamiento; propiedades de almacenamiento (por ejemplo, agitación) y/u otras condiciones asociadas con exposición o uso.

Como se usa en el presente documento, "desnaturalización" o "desnaturalizar" o variaciones gramaticales de las mismas en referencia a una proteína se refieren a un cambio bioquímico en una proteína de modo que una propiedad o actividad de la proteína se reduzca o elimine. El cambio bioquímico puede ser un cambio en la estructura terciaria de la proteína para desplegar. La propiedad o actividad puede anularse completamente o puede reducirse en 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más.

Como se usa en el presente documento, la propiedad se refiere a una propiedad física o estructural, tal como la

estructura tridimensional, pl, semivida, conformación y otras características físicas tales. Por ejemplo, un cambio en una propiedad puede manifestarse como la solubilidad, agregación o cristalización de una proteína.

5 Como se usa en el presente documento, la actividad se refiere a una actividad o actividades funcionales de un polipéptido o parte del mismo asociado con una proteína de longitud completa (completa). Las actividades funcionales incluyen, pero sin limitación, actividad biológica, actividad catalítica o enzimática, antigenicidad (capacidad para unirse con o competir con un polipéptido por la unión con un anticuerpo anti-polipéptido), inmunogenicidad, capacidad de formar multímeros, y la capacidad de unirse específicamente con un receptor o ligando para el polipéptido.

10 Como se usa en el presente documento, la actividad hialuronidasa se refiere a la capacidad para catalizar enzimáticamente la escisión de ácido hialurónico. El ensayo XXII de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) para hialuronidasa determina la actividad hialuronidasa indirectamente midiendo la cantidad de sustrato de ácido hialurónico de mayor peso molecular, o hialuronano, (HA) que permanece después de permitir que la enzima reaccione con la HA durante 30 min a 37 °C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Puede usarse una solución de Patrón de Referencia en un ensayo para determinar la actividad relativa, en unidades, de cualquier hialuronidasa. Se conocen en la técnica y se describen en el presente documento ensayos *in vitro* para determinar la actividad hialuronidasa de hialuronidasas, tales como PH20, incluyendo polipéptidos de PH20 modificados. Los ensayos ejemplares incluyen el ensayo de microturbidez descrito en el presente documento que mide la escisión de ácido hialurónico por hialuronidasa indirectamente detectando el precipitado insoluble formado cuando el ácido hialurónico no escindido se une con albúmina de suero. Los Patrones de Referencia pueden usarse, por ejemplo, para generar una curva patrón para determinar la actividad en unidades de la hialuronidasa que se ensaya.

25 Como se usa en el presente documento, activo neutro se refiere a la capacidad de un polipéptido de PH20 para catalizar enzimáticamente la escisión de ácido hialurónico a pH neutro, tal como a un pH entre o aproximadamente entre pH 6,0 y pH 7,8.

30 Como se usa en el presente documento, "actividad aumentada" en referencia a una hialuronidasa PH20 modificada significa que, cuando se ensaya en las mismas condiciones, la hialuronidasa PH20 modificada muestra mayor actividad hialuronidasa en comparación con una hialuronidasa PH20 no modificada que no contiene el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos. Por ejemplo, una hialuronidasa PH20 modificada muestra al menos o aproximadamente al menos 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1000 % o más de la actividad de la hialuronidasa PH20 no modificada o de referencia.

40 Como se usa en el presente documento, "solubilidad" en referencia a una proteína se refiere a una proteína que es homogénea en una solución acuosa, por lo que las moléculas proteicas se difunden y no se sedimentan espontáneamente. Por lo tanto, una solución de proteína soluble es una en la que hay ausencia de una partícula visible o definida en una solución que contiene la proteína, de modo que las partículas no pueden filtrarse fácilmente. En general, una proteína es soluble si no hay ninguna partícula visible o definida en la solución. Por ejemplo, una proteína soluble si no contiene o contiene pocas partículas que puedan retirarse por un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm.

45 Como se usa en el presente documento, la agregación o cristalización en referencia a una proteína se refiere a la presencia de partículas visibles o definidas en una solución que contiene la proteína. Típicamente, las partículas son de más de 10 µm de tamaño, tal como mayores de 15 µm, 20 µm, 25 µm, 30 µm, 40 µm, 50 µm o mayores. Puede surgir agregación o cristalización debido a solubilidad reducida, desnaturalización aumentada de una proteína o la formación de enlaces covalentes.

50 Como se usa en el presente documento, "condición desnaturalizante" o "condición de desnaturalización" se refieren a cualquier condición o agente que, cuando se expone a una proteína, afecta a o influye en la degradación o desnaturalización de la proteína, en general como resultado de una pérdida o pérdida parcial de la estructura terciaria o secundaria de la proteína. Las condiciones de desnaturalización pueden dar como resultado efectos tales como pérdida o reducción de la actividad, pérdida o reducción de la solubilidad, agregación y/o cristalización. No es necesario que la condición desnaturalizante sea una que sea completamente letal para la proteína, pero no obstante es una que conduce a una reducción en la actividad de la proteína a lo largo del tiempo. Por lo tanto, una condición es desnaturalizante si la actividad de la proteína se reduce en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más en presencia de la condición que en su ausencia. Una condición desnaturalizante puede deberse a una tensión externa o condición física (por ejemplo, agitación, temperatura, tiempo de almacenamiento, ausencia de un estabilizante) o puede deberse a la presencia de un agente desnaturalizante. Por ejemplo, la condición desnaturalizante puede estar causada por calor, ácido o un desnaturalizante químico. Las condiciones desnaturalizantes ejemplares incluyen, pero sin limitación, la presencia de un ácido o una base fuerte, una sal inorgánica concentrada, un disolvente orgánico (por ejemplo, alcohol o cloroformo), urea, pH alto o bajo (extremos de pH), temperatura elevada (por ejemplo, calor), la presencia de excipientes que pueden ser desnaturalizantes (por ejemplo, conservantes fenólicos o detergentes) y agente estabilizante bajo o sustancialmente ausente que de otro

modo se requiere para estabilidad de la proteína (por ejemplo, NaCl).

Como se usa en el presente documento, “agente desnaturizante” o “desnaturizante” se refiere a cualquier sustancia, molécula o compuesto que provoque desnaturización. Por ejemplo, un agente desnaturizante puede incluir un ácido o una base fuerte, una sal inorgánica concentrada, un disolvente orgánico (por ejemplo, alcohol o cloroformo), un conservante, un detergente u otro excipiente.

Como se usa en el presente documento, “resistencia a una condición de desnaturización” se refiere a cualquier cantidad de reducción o eliminación reducida de una propiedad o actividad de la proteína asociada con o provocada por desnaturización. Por ejemplo, la desnaturización se asocia con o provoca cristalización o agregación aumentada, solubilidad reducida o actividad disminuida. Por lo tanto, la resistencia a desnaturización significa que la proteína muestra agregación o cristalización reducida, solubilidad aumentada o actividad aumentada o mayor (por ejemplo, actividad hialuronidasa) cuando se expone a una condición desnaturizante en comparación con una proteína de referencia (por ejemplo enzima no modificada). No es necesario que la resistencia a una condición de desnaturización sea absoluta o permanente, pero puede conseguirse porque la desnaturización de la enzima degradante de hialuronano modificada se produce más lentamente que la enzima no modificada en la condición de desnaturización de modo que se consigue una actividad o propiedad de la enzima degradante de hialuronano modificada durante más tiempo. Por ejemplo, una enzima degradante de hialuronano modificada, tal como una hialuronidasa PH20 modificada, muestra resistencia a una condición de desnaturización si muestra, por ejemplo, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, ... 20 %, ... 30 %, ... 40 %, ... 50 %, ... 60 %, ..., 70 %, ... 80 %, ... 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % más resistencia a desnaturización en presencia de una condición de desnaturización o agente desnaturizante que un polipéptido no modificado. En algunos casos, un polipéptido modificado muestra 105 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más resistencia aumentada a desnaturización en comparación con un polipéptido no modificado.

Como se usa en el presente documento, la estabilidad de una hialuronidasa PH20 modificada significa que muestra resistencia a desnaturización provocada por una condición de desnaturización o agente desnaturizante. Un polipéptido de PH20 modificado muestra estabilidad si conserva algo de actividad en presencia de una condición de desnaturización o agente desnaturizante, tal como al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de la actividad hialuronidasa original o inicial antes de exposición a la condición o las condiciones desnaturizantes. En general, una hialuronidasa PH20 modificada es estable si conserva al menos 50 % o más de la actividad hialuronidasa en una condición de desnaturización en comparación con la ausencia de la condición de desnaturización. Los expertos en la materia conocen ensayos para evaluar la actividad hialuronidasa y se describen en el presente documento. Se entiende que no es necesario que la estabilidad de la enzima sea permanente o a largo plazo, sino que se manifiesta durante un periodo de tiempo en el que se desea la actividad. Por ejemplo, una hialuronidasa PH20 modificada es estable si muestra una actividad durante al menos 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, un mes, seis meses o un año tras la exposición, o durante la exposición, a una o más condiciones o agentes desnaturizantes (por ejemplo, la presencia de un excipiente desnaturizante tal como un conservante). Por ejemplo, una hialuronidasa PH20 modificada es estable si muestra una actividad tras o durante la exposición a una o más condiciones o agentes desnaturizantes (por ejemplo, presencia de un excipiente desnaturizante tal como un conservante) durante al menos un mes a temperaturas de o de aproximadamente 2 °C a 8 °C, inclusive o durante al menos 3 días a una temperatura de o de aproximadamente 30 °C a 42 °C, inclusive.

Por lo tanto, “estable” o “estabilidad”, en referencia a una formulación o una co-formulación descrita en el presente documento, se refiere a una en la que una enzima degradante de hialuronano modificada, tal como una hialuronidasa PH20 modificada, en la misma es estable tras la exposición a una o más condiciones o agentes desnaturizantes en la misma (por ejemplo, presencia de un excipiente desnaturizante tal como un conservante) durante al menos un mes a temperaturas de o de aproximadamente 2 °C a 8 °C, inclusive o durante al menos 3 días a una temperatura de o de aproximadamente 30 °C a 42 °C, inclusive.

Como se usa en el presente documento, “estabilidad aumentada” en referencia a una hialuronidasa PH20 modificada significa que, en presencia de la misma condición o las mismas condiciones desnaturizantes o de desnaturización (por ejemplo, presencia de un excipiente desnaturizante tal como un conservante), la hialuronidasa PH20 modificada muestra mayor actividad hialuronidasa en comparación con una hialuronidasa PH20 no modificada que no contiene el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos. Por ejemplo, una hialuronidasa PH20 modificada muestra estabilidad aumentada si muestra al menos o aproximadamente al menos 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1000 % o más de la actividad de la hialuronidasa PH20 no modificada o de referencia en presencia de una condición o condiciones desnaturizantes o de desnaturización (por ejemplo, en presencia de un excipiente desnaturizante tal como un conservante).

Como se usa en el presente documento, “temperaturas elevadas” se refiere a temperaturas que son mayores que la temperatura ambiente. En general, una temperatura elevada es una temperatura que es al menos, mayor de, o aproximadamente 30 °C, tal como de 30 °C a 42 °C y en general de 32 °C a 37 °C o de 35 °C a 37 °C, inclusive.

Como se usa en el presente documento, la temperatura ambiente se refiere a un intervalo generalmente de aproximadamente o exactamente 18 °C hasta aproximadamente o exactamente 32 °C. Los expertos en la materia apreciarán que la temperatura ambiente varía según la localización y las condiciones predominantes. Por ejemplo, las temperaturas ambiente puede ser mayores en climas más cálidos tales como Italia o Texas.

5 Como se usa en el presente documento, la indicación de que las proteínas se “comparan en las mismas condiciones” significa que diferentes proteínas se tratan de forma idéntica o sustancialmente de forma idéntica de modo que una cualquiera o más condiciones que puedan influir en la actividad o propiedades de una proteína o agente no se varían o sustancialmente no se varían entre los agentes de ensayo. Por ejemplo, cuando la actividad hialuronidasa de un polipéptido de PH20 modificado se compara con un polipéptido de PH20 no modificado una cualquiera o más de las condiciones tales como la cantidad o concentración del polipéptido; presencia, incluyendo cantidad, de excipientes, vehículos u otros componentes en una formulación distintos del agente activo (por ejemplo, hialuronidasa PH20 modificada); temperatura; tiempo de almacenamiento; recipiente de almacenamiento; propiedades de almacenamiento (por ejemplo, agitación) y/u otras condiciones asociadas con exposición o uso son idénticas o sustancialmente idénticas entre los polipéptidos comparados.

20 Como se usa en el presente documento, “tiempo predeterminado” se refiere a un tiempo que se establece o se decide previamente. Por ejemplo, el tiempo predeterminado puede ser un tiempo elegido previamente que se asocia con la duración deseada de actividad de una enzima degradante de hialuronano dependiendo de la aplicación o el uso deseados de la proteína. Un tiempo predeterminado puede ser horas, días, meses o años. Por ejemplo, un tiempo predeterminado puede ser al menos aproximadamente o aproximadamente 2 horas, 3 horas, 4 horas, cinco horas, seis horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, seis meses, un año o más.

25 Como se usa en el presente documento, “almacenamiento” significa que una formulación no se administra inmediatamente a un sujeto una vez preparada, sino que se mantiene durante un periodo de tiempo en condiciones particulares (por ejemplo, temperatura, tiempo y/o forma (por ejemplo, forma líquida o liofilizada) particulares) antes de su uso. Por ejemplo, una formulación líquida puede mantenerse durante días, semanas, meses o años, antes de su administración a un sujeto a temperaturas variadas tales como refrigerada (0 °C a 10 °C, tal como 2 °C a 8 °C), temperatura ambiente (por ejemplo, temperatura hasta 32 °C, tal como 18 °C a aproximadamente o exactamente 32 °C), o temperatura elevada (por ejemplo, de 30 °C a 42 °C, tal como 32 °C a 37 °C o 35 °C a 37 °C).

30 Como se usa en el presente documento, un “excipiente” se refiere a un compuesto en una formulación de un agente activo que no proporciona el efecto biológico del agente activo cuando se administra en ausencia del agente activo. Los excipientes ejemplares incluyen, pero sin limitación, sales, tampones, estabilizantes, modificadores de la tonicidad, metales, polímeros, tensioactivos, conservantes, aminoácidos y azúcares.

40 Como se usa en el presente documento, un agente estabilizante se refiere a un compuesto añadido la formulación para proteger el polipéptido de PH20 modificado u otro agente activo de la degradación, si es necesario, tal como debido a condiciones de desnaturalización a las que se expone una formulación del presente documento cuando se manipula, se almacena o se usa. Por lo tanto, se incluyen agentes que evitan la degradación de proteínas de otros componentes en las composiciones. Son ejemplos de dichos agentes aminoácidos, derivados de aminoácidos, aminos, azúcares, polioles, sales y tampones, tensioactivos, inhibidores o sustratos y otros agentes como se describe en el presente documento.

45 Como se usa en el presente documento, un ensayo de eficacia antimicrobiana o ensayo de eficacia conservante (PET) demuestra la eficacia del sistema conservante en un producto. Un producto se inocula con una cantidad controlada de organismos específicos. El ensayo compara después el nivel de microorganismos hallados en una muestra de control frente a la muestra de ensayo durante un periodo de 28 días. En general, los mercados destinatarios tienen diferentes requisitos de PET. Por ejemplo, los requisitos de PET de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) y la Farmacopea Europea (EP) difieren. Los expertos en la materia conocen parámetros para realizar un ensayo de eficacia antimicrobiana, incluyendo en diferentes mercados, como se describe en el presente documento.

50 Como se usa en el presente documento, una cantidad antimicrobiana eficaz de un conservante se refiere a una cantidad del conservante que destruye o inhibe la propagación de organismos microbianos en una muestra que puede introducirse desde almacenamiento o uso. Por ejemplo, para recipientes de múltiples dosis, una cantidad antimicrobiana eficaz de un conservante inhibe el crecimiento de microorganismos que pueden introducirse a partir de dosis individuales de extracción repetida. Las USP y EP (EPA y EPB) tienen requisitos antimicrobianos que determinan la eficacia conservante, y que varían en su rigurosidad. Por ejemplo, una cantidad antimicrobiana eficaz de un conservante es una cantidad tal que se produzca al menos una reducción de 1,0 unidades \log_{10} en organismos bacterianos a los 7 días después de la inoculación en un ensayo de eficacia conservante antimicrobiana (APET). En un ejemplo particular, una cantidad antimicrobiana eficaz de un conservante es una cantidad tal que se produzca una reducción de al menos 1,0 unidades \log_{10} en organismos bacterianos a los 7 días después de inoculación, se produzca una reducción al menos 3,0 unidades \log_{10} de organismos bacterianos a los 14 días después de inoculación, al menos no se produzca aumento adicional en organismos bacterianos después de 28 días

después de la inoculación, y al menos no se produzca aumento en organismos fúngicos después de 7 días después de la inoculación. En un ejemplo adicional, una cantidad antimicrobiana eficaz de un conservante es una cantidad tal que se produzca al menos una reducción de 1,0 unidades \log_{10} de organismos bacterianos a las 24 horas después de la inoculación, se produzca una reducción de al menos 3,0 unidades \log_{10} de organismos bacterianos a los 7 días después de la inoculación, no se produzca ningún aumento adicional en organismos bacterianos después de 28 días después de la inoculación, se produzca una reducción de al menos 1,0 unidades \log_{10} de organismos fúngicos a los 14 días después de la inoculación, y no se produzca al menos un aumento adicional en organismos fúngicos después de 28 días después de la inoculación. En un ejemplo adicional, una cantidad antimicrobiana eficaz de un conservante es una cantidad tal que se produce una reducción de al menos 2,0 unidades \log_{10} de organismos bacterianos a las 6 horas después de la inoculación, se produzca una reducción de al menos 3,0 unidades \log_{10} de organismos bacterianos a las 24 horas después de la inoculación, no se produzca ninguna recuperación de organismos bacterianos después de 28 días después de la inoculación de la composición con el inóculo microbianos, se produzca una reducción de al menos 2,0 unidades \log_{10} de organismos fúngicos a los 7 días después de la inoculación, y no se produzca al menos ningún aumento adicional en organismos fúngicos después de 28 días después de la inoculación.

Como se usa en el presente documento, "conservante" se refiere a una sustancia de origen natural o producida de forma sintética o recombinante que, cuando se añade a una molécula o composición proteica, evita el crecimiento microbiano, incluyendo crecimiento bacteriano o fúngico, en la composición.

Como se usa en el presente documento, un "conservante fenólico" se refiere a un conservante que contiene un grupo hidroxilo unido a un anillo de carbono aromático, tal como un anillo de benceno. Los conservantes fenólicos ejemplares incluyen pero sin limitación, fenol, m-cresol, ácido p-hidroxibenzoico, metilparabeno, etilparabeno y propilparabeno. Por ejemplo, los cresoles, incluyendo meta-cresol (m-cresol), tienen un grupo metilo sustituido en el anillo de benceno de una molécula de fenol.

Como se usa en el presente documento, un "fenófilo" se refiere a una proteína, tal como un polipéptido de PH20 modificado, que muestra estabilidad en presencia de una cantidad antimicrobiana eficaz de un conservante o conservantes. El término "fenófilo" puede usarse indistintamente en el presente documento con "fenófilo" y tiene el mismo significado. Por ejemplo, un polipéptido de PH20 modificado que es un fenófilo o fenófilo muestra típicamente estabilidad aumentada en comparación con una hialuronidasa PH20 no modificada que no contiene el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos cuando se ensaya en la misma condición o condiciones desnaturizantes que contienen un conservante o conservantes fenólicos. Por ejemplo, una hialuronidasa PH20 modificada muestra al menos o aproximadamente al menos 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1000 % o más de la actividad de la hialuronidasa PH20 no modificada o de referencia en presencia de un conservante o conservantes fenólicos.

Como se usa en el presente documento, un "termófilo" se refiere a una proteína, tal como un polipéptido de PH20 modificado, que muestra estabilidad a temperaturas elevadas mayores de o aproximadamente 30 °C, tales como de 30 °C a 42 °C, y en general de 32 °C a 37 °C o de 35 °C a 37 °C. Por ejemplo, un polipéptido de PH20 modificado que es un termófilo típicamente muestra estabilidad aumentada en comparación con una hialuronidasa PH20 no modificada que no contiene el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos cuando se ensaya en la misma condición o las mismas condiciones desnaturizantes de temperatura elevada. Por ejemplo, una hialuronidasa PH20 modificada muestra al menos o aproximadamente al menos 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1000 % o más de la actividad de la hialuronidasa PH20 no modificada o de referencia a temperaturas elevadas.

Como se usa en el presente documento, el término "detergente" se usa indistintamente con el término "tensioactivo" o "agente tensioactivo". Los tensioactivos son típicamente compuestos orgánicos que son anfifílicos, es decir, que contienen tanto grupos hidrófobos ("colas") como grupos hidrófilos ("cabezas"), que hacen a los tensioactivos solubles tanto en disolventes orgánicos como en agua. Un tensioactivo puede clasificarse por la presencia de grupos con carga formal en su cabeza. Un tensioactivo no iónico no tiene grupos de carga en su cabeza, mientras que un tensioactivo iónico porta una carga neta en su cabeza. Un tensioactivo zwitteriónico contiene una cabeza con dos grupos con carga opuesta. Algunos ejemplos de tensioactivos comunes incluyen: aniónico (basado en aniones sulfato, sulfonato o carboxilato): perfluorooctanoato (PFOA o PFO), sulfonato de perfluorooctano (PFOS), dodecil sulfato sódico (SDS), lauril sulfato de amonio y otras sales de alquil sulfato, laureth sulfato sódico (también conocido como lauril éter sulfato sódico o SLES), alquil benceno sulfonato; catiónicos (basados en cationes de amonio cuaternario): bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) también conocido como bromuro de hexadecil trimetil amonio, y otras sales alquiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio (CPC), amina de sebo polietoxilada (POEA), cloruro de benzalkonio (BAC), cloruro de benzetonio (BZT); Zwitteriónicos (anfotéricos): dodecil betaína; cocamidopropil betaína; coco anfo glicinato; no iónicos: alquil poli(etilen óxido), alhifenol poli(etilen óxido), copolímeros de poli(etilen óxido) y poli(propilen óxido) (conocidos comercialmente como Poloxámeros o Poloxaminas), alquil poliglucósidos, incluyendo octil glucósido, decil maltósido, alcoholes grasos (por ejemplo, alcohol cetílico y alcohol oleílico), cocamida MEA, cocamida DEA, polisorbatos (Tween 20, Tween 80, etc.), detergentes Triton y óxido de dodecil dimetilamina.

Como se usa en el presente documento, un “tampón” se refiere a una sustancia, generalmente una solución, que puede mantener su pH constante, a pesar de la adición de ácidos fuertes o bases fuertes e influencias externas de temperatura, presión, volumen o potencial redox. Un tampón evita un cambio en la concentración de otra sustancia química, por ejemplo, sistemas donantes y aceptores de protones que evitan cambios notables en la concentración de ion hidrógeno (pH). Los valores de pH de todos los tampones son dependientes de la temperatura y la concentración. La elección de tampón para mantener un valor o intervalo de pH puede determinarse empíricamente por un experto en la materia basándose en la capacidad de tamponamiento conocida de tampones conocidos. Los tampones ejemplares incluyen pero sin limitación, tampón de bicarbonato, tampón de cacodilato, tampón de fosfato o tampón Tris. Por ejemplo, el tampón Tris (trometamina) es un tampón basado en amina que tiene una pKa de 8,06 y tiene un intervalo de pH eficaz entre 7,9 y 9,2. Para tampones Tris, el pH aumenta aproximadamente 0,03 unidades por °C de reducción de temperatura, y se reduce de 0,03 a 0,05 unidades por dilución décuple.

Como se usa en el presente documento, los restos de α -aminoácidos de origen natural son los restos de los 20 α -aminoácidos hallados en la naturaleza que se incorporan en proteínas mediante el reconocimiento específico de la molécula de ARNt con carga con su codón de ARNm afín en seres humanos.

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

Como se usa en el presente documento, un péptido se refiere a un polipéptido que es de 2 a 40 aminoácidos de longitud.

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

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

Como se usa en el presente documento, “resto de aminoácido” se refiere a un aminoácido formado tras digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Se supone que los restos de aminoácido descritos en el presente documento están en la forma isomérica “L”. Los restos en la forma isomérica “D”, que se designan así, pueden sustituir cualquier resto de aminoácido L siempre que el polipéptido conserve la propiedad funcional deseada. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino terminal de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxilo libre presente en el extremo carboxilo terminal de un polipéptido. Manteniendo la nomenclatura de polipéptido convencional descrita en J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968), y adoptada en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, se muestran abreviaturas para restos de aminoácidos en la Tabla 1:

Tabla 1 – Tabla de Correspondencia

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

SÍMBOLO		AMINOACIDO
1-Letra	3-Letras	
E	Glu	Ácido Glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Ácido Aspártico
N	Asn	Asparagina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

Debería observarse que todas las secuencias de restos de aminoácidos representadas en el presente documento por fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de amino terminal a carboxilo terminal. Además, la expresión "resto de aminoácido" se define ampliamente para incluir los aminoácidos enumerados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 1) y aminoácidos modificados y poco habituales, tales como los indicados en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822. Además, debería observarse que un guion al comienzo o final de una secuencia de restos de aminoácidos indica un enlace peptídico con una secuencia adicional de uno o más restos de aminoácidos, con un grupo amino terminal tal como NH₂ o con un grupo carboxilo terminal tal como COOH.

10 Como se usa en el presente documento, "aminoácidos de origen natural" se refiere a los 20 aminoácidos L que aparecen en polipéptidos.

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

20 Como se usa en el presente documento, una mezcla isocinética es una en la que las relaciones molares de aminoácidos se han ajustado basándose en sus velocidades de reacción indicadas (véase, por ejemplo, Ostresh *et al.*, (1994) *Biopolymers* 34: 1681).

25 Como se usa en el presente documento, los expertos de la presente materia conocen sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas y estas pueden realizarse en general sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en materia 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.* *Molecular Biology of the Gene*, 4ª Edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p. 224). Dichas sustituciones pueden realizarse de acuerdo con las expuestas en la TABLA 2 a continuación:

30

TABLA 2

Resto original	Sustitución conservativa ejemplar
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
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
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Otras sustituciones también son permisibles y pueden determinarse empíricamente o de acuerdo con sustituciones conservativas conocidas.

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

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

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

25 Como se usa en el presente documento, "en una posición correspondiente a" o indicación de que los nucleótidos o las posiciones de aminoácidos "corresponden a" nucleótidos o posiciones de aminoácidos en una secuencia desvelada, tal como se expone en el listado de Secuencias, se refiere a nucleótidos o posiciones de aminoácidos identificados tras el alineamiento con la secuencia desvelada para maximizar la identidad usando un algoritmo de alineamiento convencional, tal como el algoritmo GAP. Para fines del presente documento, el alineamiento de una secuencia de PH20 es con la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7 o 32-66, y en particular SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, la referencia en el presente documento a que una posición o reemplazo de aminoácido corresponde a posiciones en referencia a SEQ ID NO: 3 también significa que la posición o el reemplazo de aminoácido corresponde a posiciones en referencia a cualquiera de las SEQ ID NO: 7 o 32-66, ya que las secuencias en las mismas son idénticas a los restos correspondientes como se expone en SEQ ID NO: 3. Alineando las secuencias, un experto en la materia puede identificar restos correspondientes, por ejemplo, usando restos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. En general, para identificar posiciones correspondientes, las secuencias de aminoácidos se alinean de modo que se obtiene la coincidencia de mayor orden (véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carrillo *et al.* (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073). La Figura 2 ejemplifica alineamientos ejemplares e identificación de restos correspondientes ejemplares para reemplazo.

45 Como se usa en el presente documento, "identidad de secuencia" se refiere al número de aminoácidos o bases nucleotídicas idénticos o similares en una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de ensayo y uno de referencia. La identidad de secuencia puede determinarse por alineamiento de secuencias de ácido nucleico o proteínas para identificar regiones de similitud o identidad. Para fines del presente documento, la identidad de secuencia se determina en general por alineamiento para identificar restos idénticos. El alineamiento puede ser local o global, pero para fines del presente documento el alineamiento es en general un alineamiento global donde se compara la longitud completa de cada secuencia. Pueden identificarse coincidencias, desapareamientos y huecos entre secuencias comparadas. Los huecos son aminoácidos o nucleótidos nulos insertados entre los restos de secuencias alineadas de modo que se alinean caracteres idénticos o similares. En general, puede haber huecos internos y terminales. La identidad de secuencia puede determinarse teniendo en cuenta los huecos como el número de restos idénticos/longitud de la secuencia más corta x 100. Cuando se usan penalizaciones de hueco, la identidad de secuencia puede determinarse sin penalización para huecos finales (por ejemplo, los huecos terminales no se penalizan). Como alternativa, la identidad de secuencia puede determinarse sin tener en cuenta huecos como el número de posiciones idénticas/longitud de la secuencia alineada total x 100.

60 Como se usa en el presente documento, un "alineamiento global" es un alineamiento que alinea dos secuencias de principio a fin, alineando cada letra en cada secuencia solamente una vez. Un alineamiento se produce, independientemente de si hay o no similitud o identidad entre las secuencias. Por ejemplo, la identidad de secuencia del 50 % basada en "alineamiento global" significa que en un alineamiento de la secuencia completa de dos secuencias comparadas cada una de 100 nucleótidos de longitud, el 50 % de los restos son iguales. Se entiende que el alineamiento global también puede usarse para determinar la identidad de secuencia incluso cuando la longitud de las secuencias alineadas no es igual. Las diferencias en los extremos terminales de las secuencias se tendrán en cuenta para determinar la identidad de secuencia, a no ser que se seleccione "sin penalización para huecos finales". En general, se usa un alineamiento global en secuencias que comparten similitud significativa sobre

la mayor parte de su longitud. Los algoritmos ejemplares para realizar alineamiento global incluyen el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman *et al.* J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)). Están disponibles públicamente programas ejemplares para realizar alineamiento global e incluyen la Herramienta de Alineamiento de Secuencia Global disponible en el sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (ncbi.nlm.nih.gov/), y el programa disponible en deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html.

Como se usa en el presente documento, un "alineamiento local" es un alineamiento que alinea dos secuencias, pero que solamente alinea las partes de las secuencias que comparten similitud o identidad. Por lo tanto, un alineamiento local determina si están presentes sub-segmentos de una secuencia en otra secuencia. Si no hay similitud, no se obtendrá ningún alineamiento. Los algoritmos de alineamiento local incluyen algoritmos de BLAST o Smith-Waterman (Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)). Por ejemplo, la identidad de secuencia del 50 % basada en "alineamiento local" significa que en un alineamiento de la secuencia completa de dos secuencias comparadas de cualquier longitud, una región de similitud o identidad de 100 nucleótidos de longitud tiene 50 % de los restos que son iguales en la región de similitud o identidad.

Para fines del presente documento, la identidad de secuencia puede determinarse por programas de algoritmo de alineamientos convencionales usados con penalizaciones de hueco por defecto establecidas por cada proveedor. 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.* Nuc. Acids Res. 14: 6745 (1986), como se describe en Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización de 0,10 adicional para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para huecos finales. Si dos moléculas de ácido nucleico cualesquiera tienen secuencias de nucleótidos o dos polipéptidos cualesquiera tienen secuencias de aminoácidos que son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % "idénticas" u otras variaciones similares que indican un porcentaje de identidad, puede determinarse usando algoritmos informáticos conocidos basados en alineamiento local o global (véase por ejemplo, wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment_software, que proporciona enlaces a docenas de bases de datos y programas de alineamiento disponibles públicamente y conocidos). En general, para fines del presente documento la identidad de secuencia se determina usando algoritmos informáticos basados en alineamiento global, tales como la Herramienta de alineamiento de secuencia Global de Needleman-Wunsch disponible de NCBI/BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&Page_TYPE=BlastHome); LAlign (William Pearson que implementa el algoritmo de Huang y Miller (Adv. Appl. Math. (1991) 12: 337-357)); y el programa de Xiaoqui Huang disponible en deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html. En general, cuando se comparan secuencias de nucleótidos en el presente documento, se usa un alineamiento con penalización para huecos finales. También puede usarse alineamiento local cuando las secuencias que se comparan son sustancialmente de la misma longitud.

Por lo tanto, como se usa en el presente documento, el término "identidad" representa una comparación o un alineamiento entre un polipéptido o polinucleótido de ensayo y uno de referencia. En un ejemplo no limitante, "al menos 90 % idéntico a" se refiere a porcentajes de identidad de 90 a 100 % en relación con el polipéptido o polinucleótido de referencia. La identidad a un nivel del 90 % o más es indicativa del hecho de que, suponiendo para fines de ejemplo que se compara una longitud de polipéptido o polinucleótido de ensayo y de referencia de 100 aminoácidos o nucleótidos, no más del 10 % (es decir, 10 de 100) de aminoácidos o nucleótidos en el polipéptido o polinucleótido de ensayo difieren de los de los polipéptidos de referencia. Pueden realizarse comparaciones similares entre un polinucleótido de ensayo y uno de referencia. Dichas diferencias pueden representarse como mutaciones puntuales distribuidas aleatoriamente sobre la longitud completa de una secuencia de aminoácidos o pueden agruparse en una o más localizaciones de diversa longitud hasta la máxima permisible, por ejemplo, 10/100 diferencias de aminoácidos (aproximadamente el 90 % de identidad). Las diferencias también pueden deberse a supresiones o truncamientos de restos de aminoácidos. Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácidos nucleicos o aminoácidos. Dependiendo de la longitud de las secuencias comparadas, en el nivel de homología o identidades por encima de aproximadamente 85-90 %, el resultado puede ser independiente del programa y los parámetros de hueco establecidos; dichos altos niveles de identidad pueden evaluarse fácilmente, con frecuencia sin basarse en el software.

Como se usa en el presente documento, una variante alélica o variación alélica se refiere a dos o más formas alternativas cualesquiera de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de forma natural mediante mutación, y puede dar como resultado polimorfismo fenotípico dentro de poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencia de aminoácidos alterada. La expresión "variante alélica" también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen. Típicamente la forma de referencia del gen codifica una forma de tipo silvestre y/o forma predominante de un polipéptido de una población o un único miembro de referencia de una especie. Típicamente, las variantes alélicas, que incluyen variantes entre especies típicamente tienen al menos 80 %, 90 % o más identidad de aminoácidos con una forma de tipo silvestre y/o predominante de la misma especie; el grado de identidad depende del gen y si la comparación es interespecies o intraespecies. En general, las variantes alélicas intraespecie tienen al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad o más con una forma de tipo silvestre y/o predominante, incluyendo 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad con una forma de tipo silvestre y/o predominante de un polipéptido. La referencia a una variante

alélica en el presente documento se refiere en general a variaciones en proteínas entre miembros de la misma especie.

5 Como se usa en el presente documento, "alelo", que se usa indistintamente en el presente documento con "variante alélica" se refiere a formas alternativas de un gen o partes del mismo. Los alelos ocupan el mismo locus o la misma posición en cromosomas homólogos. Cuando un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es homocigoto para ese gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterocigoto para el gen. Los alelos de un gen específico pueden diferir entre sí en un único nucleótido o varios nucleótidos, y pueden incluir modificaciones tales como sustituciones, supresiones e inserciones de nucleótidos. Un
10 alelo de un gen también puede estar en forma de un gen que contiene una mutación.

15 Como se usa en el presente documento, las variantes de especies se refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamífero, tales como ratón y ser humano. Son ejemplos de variantes de especie descritas en el presente documento PH20 de primate, tal como, pero sin limitación, ser humano, chimpancé, macaco, mono cynomolgus, gibón, orangután o tití. En general, las variantes de especie tienen 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad de secuencia. Los restos correspondientes entre y dentro de variantes de especie pueden determinarse comparando y alineando secuencias para maximizar el número de nucleótidos o restos coincidentes, por ejemplo, de modo que la identidad entre las secuencias sea igual a o mayor de 95 %, igual a o mayor de 96 %, igual a o mayor de 97 %, igual a o mayor de 98 %, o igual a o mayor de 99 %. Después se proporciona a la posición de interés el número asignado en la molécula de ácido nucleico de referencia. El alineamiento puede efectuarse manualmente o visualmente, particularmente cuando la identidad de secuencia es mayor del 80 %.

25 Como se usa en el presente documento, sustancialmente puro significa suficientemente homogéneo para parecer libre de impurezas fácilmente detectables, como se determina por métodos convencionales de análisis, tales como cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), usados por los expertos en la materia para evaluar dicha pureza, o suficientemente puro de modo que la purificación adicional no alteraría de forma detectable las propiedades físicas y químicas, tales como actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los expertos en la materia conocen métodos para purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros. Un compuesto sustancialmente químicamente puro puede, sin embargo, ser una mezcla de esteroisómeros o isómeros. En dichos casos, la purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

35 Como se usa en el presente documento, el polipéptido o la proteína aislado o purificado o parte biológicamente activa del mismo está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido del que deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Puede determinarse que las preparaciones son sustancialmente libres si parecen libres de impurezas fácilmente detectables como se determina por métodos convencionales de análisis, tales como cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), usados por los expertos en la materia para evaluar dicha pureza, o suficientemente pura de modo que la purificación adicional no alteraría de forma detectable las propiedades físicas y químicas, tales como actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los expertos en la materia conocen métodos para purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros. Un compuesto sustancialmente químicamente puro, sin embargo, puede ser una mezcla de esteroisómeros. En dichos casos, la purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

50 Por lo tanto, la referencia a un polipéptido sustancialmente purificado, tal como un polipéptido de PH20 sustancialmente purificado se refiere a preparaciones de proteínas de PH20 que están sustancialmente libres de este material celular, incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína está separada de componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de forma recombinante. En un ejemplo, la expresión sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) de proteínas no enzimáticas (también denominadas en el presente documento proteínas contaminantes), en general menos de aproximadamente 20 % de proteínas no enzimáticas o 10 % de proteínas no enzimáticas o menos de aproximadamente 5 % de proteínas no enzimáticas. Cuando la proteína enzimática se produce de forma recombinante, también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio cultivo representa menos de aproximadamente o exactamente 20 %, 10 % o 5 % del volumen de la preparación de proteína enzimática.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos incluye preparaciones de proteínas enzimáticas en las que la proteína se separa de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. El término incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso seco), 20 %, 10 %, 5 % o menos de precursores químicos o productos químicos o componentes no enzimáticos.

65 Como se usa en el presente documento, sintético, en referencia a, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico sintética o un gen sintético o un péptido sintético se refiere a una molécula de ácido nucleico o molécula

polipeptídica que se produce por métodos recombinantes y/o por métodos de síntesis química.

5 Como se usa en el presente documento, la producción por medio recombinante o usando métodos de ADN recombinante significa el uso de métodos bien conocidos de biología molecular para expresar proteínas codificadas por ADN clonado.

10 Como se usa en el presente documento, vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se usan para introducir un ácido nucleico heterólogo en células para expresión o replicación del mismo. Los vectores típicamente permanecen episómicos, pero pueden diseñarse para efectuar integración de un gen o parte del mismo en un cromosoma del genoma. También se contemplan vectores que son cromosomas artificiales tales cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de mamífero. La selección y uso de dichos vehículos se conocen bien por los expertos en la materia.

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

25 Como se usa en el presente documento, vector también incluye “vectores de virus” o “vectores virales”. Los vectores virales son virus modificados técnicamente que se unen operativamente con genes exógenos para transferencia (como vehículos o lanzaderas) de los genes exógenos a células. Los vectores virales incluyen, pero sin limitación, vectores adenovirales, vectores retrovirales y vectores de virus vaccinia.

30 Como se usa en el presente documento, “operativamente” o “unido operativamente” cuando se hace referencia a segmentos de ADN significa que los segmentos se disponen de modo que actúen en concierto para sus fines pretendidos, por ejemplo, la transcripción se inicia cadena abajo de promotor y cadena arriba de cualquier secuencia transcrita. El promotor es habitualmente el dominio con el que se une la maquinaria transcripcional para iniciar la transcripción y continúa por el segmento codificante hasta el terminador.

35 Como se usa en el presente documento, un conjugado se refiere a un polipéptido de PH20 modificado unido directa o indirectamente con uno o más polipéptidos o restos químicos adicionales. Dichos conjugados incluyen proteínas de fusión, las producidas por conjugados químicos y las producidas por cualquier otro método por el que se una al menos un polipéptido de PH20, directa o indirectamente con otro polipéptido o resto químico siempre que el conjugado conserve actividad hialuronidasa. Los ejemplos de conjugados descritos en el presente documento incluyen polipéptidos de PH20 unidos directa o indirectamente con un dominio de multimerización (por ejemplo, un resto Fc), una toxina, un marcador o un fármaco.

45 Como se usa en el presente documento, una proteína de fusión se refiere a un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que contiene una secuencia codificante de una molécula de ácido nucleico y la secuencia codificante de otra molécula de ácido nucleico en la que las secuencias codificantes están en la misma fase de lectura de modo que cuando la construcción de fusión se transcribe y traduce en una célula hospedadora, se produce la proteína que contiene las dos proteínas. Las dos moléculas pueden estar adyacentes en la construcción o separadas por un polipéptido enlazador que contiene 1, 2, 3 o más, pero típicamente menos de 10, 9, 8, 7 o 6 aminoácidos. El producto proteico codificado por una construcción de fusión se denomina polipéptido de fusión. Los ejemplos de polipéptidos de fusión incluyen fusiones de Fc.

50 Como se usa en el presente documento, un polímero que está conjugado con un polipéptido de PH20 modificado se refiere a cualquier polímero que está unido covalentemente o de otro modo de forma estable, directamente o mediante un enlazador, con dicho polipéptido. Dichos polímeros típicamente aumentan la semivida en suero e incluyen, pero sin limitación, restos siálicos, restos de polietilenglicol (PEG), dextrano y azúcar y otros restos, tal como para glucosilación.

55 Como se usa en el presente documento, se pretende que el término evaluar o determinar incluya determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de un producto, y también para obtener un índice, relación, porcentaje, visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta.

60 Como se usa en el presente documento, una “composición” se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos o compuestos. Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, acuosa, no acuosa, o cualquier

combinación de los mismos.

Como se usa en el presente documento, una formulación se refiere a una composición que contiene al menos un agente farmacéutico o terapéutico activo y uno o más excipientes.

5 Como se usa en el presente documento, una co-formulación se refiere a una composición que contiene dos o más agentes activos o farmacéuticos o terapéuticos y uno o más excipientes. Por ejemplo, una co-formulación de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano contiene una insulina de acción rápida, una enzima degradante de hialuronano y uno o más excipientes.

10 Como se usa en el presente documento, "una combinación" se refiere a cualquier asociación entre dos o más artículos o elementos. Las combinaciones ejemplares incluyen, pero sin limitación, dos o más composiciones farmacéuticas, una composición que contiene dos o más principios activos, tal como dos polipéptidos de PH20 modificados; un polipéptido de PH20 modificado y un agente antineoplásico, tal como un compuesto quimioterapéutico; un polipéptido de PH20 modificado y un agente terapéutico (por ejemplo, una insulina); un polipéptido de PH20 modificado y una pluralidad de agentes terapéuticos y/o de captura de imágenes, o cualquier asociación de los mismos. Dichas combinaciones pueden envasarse como kits.

20 Como se usa en el presente documento, un kit es una combinación envasada, opcionalmente que incluye instrucciones para uso de la combinación y/u otras reacciones y componentes para dicho uso.

Como se usa en el presente documento, "enfermedad o trastorno" se refiere a una afección patológica en un organismo que resulta de causa o condición incluyendo, pero sin limitación, infecciones, afecciones adquiridas, afecciones genéticas, y caracterizada por síntomas identificables.

25 Como se usa en el presente documento, una enfermedad, un trastorno o una afección asociado a hialuronano se refiere a cualquier enfermedad o afección en la que los niveles de hialuronano están elevados como causa, consecuencia u observados de otro modo en la enfermedad o afección. Las enfermedades y afecciones asociadas a hialuronano se asocian con expresión de hialuronano elevada en un tejido o una célula, presión de líquido intersticial aumentada, volumen vascular reducido y/o contenido de agua aumentado en un tejido. Las enfermedades, los trastornos o las afecciones asociados a hialuronano pueden tratarse mediante administración de una composición que contiene una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo una hialuronidasa soluble, bien sola o bien en combinación con o además de otro tratamiento y/o agente. Las enfermedades y afecciones ejemplares incluyen, pero sin limitación, cánceres ricos en hialuronano, por ejemplo, tumores, incluyendo tumores sólidos tales como cánceres de estadio tardío, cánceres metastásicos, cánceres indiferenciados, cáncer ovárico, cáncer *in situ* (ISC), carcinoma de células escamosas (SCC), cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, cáncer de colon y otros cánceres. Las enfermedades y afecciones asociadas a hialuronano ejemplares también son enfermedades que están asociadas con presión de líquido intersticial elevada, tales como enfermedades asociadas con presión del disco y edema, por ejemplo, edema provocado por trasplante de órganos, ictus, traumatismo cerebral u otra lesión. Las enfermedades y afecciones asociadas con hialuronano ejemplares incluyen enfermedades y afecciones asociadas con presión de líquido intersticial elevada, volumen vascular reducido y/o contenido de agua aumentado en un tejido, incluyendo cánceres, presión de disco y edema. En un ejemplo, el tratamiento de la afección, enfermedad o trastorno asociado a hialuronano incluye alivio, reducción u otro efecto beneficioso en uno o más de presión de líquido intersticial aumentada (IFP), volumen vascular reducido y contenido de agua aumentado en un tejido.

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

55 Como se usa en el presente documento, un agente farmacéuticamente eficaz o agente terapéutico incluye cualquier agente bioactivo que pueda mostrar un efecto terapéutico para tratar una enfermedad o un trastorno. Se describen en el presente documento agentes terapéuticos ejemplares. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, anestésicos, vasoconstrictores, agentes de dispersión, fármacos terapéuticos convencionales, incluyendo moléculas pequeñas farmacológicas, incluyendo, pero sin limitación, bisfosfonatos y proteínas terapéuticas, incluyendo, pero sin limitación, insulina, moléculas de IgG, anticuerpos, citocinas y factores de coagulación.

60 Como se usa en el presente documento, "insulina" se refiere a una hormona, un precursor o un análogo sintético o recombinante de la misma que actúa para aumentar la captación de glucosa y almacenamiento y/o reducción de la producción de glucosa endógena. Los expertos en la materia conocen bien insulina y análogos de la misma, incluyendo en humana y variantes alélicas y de especies de la misma. La insulina se traduce como un polipéptido precursor designado preproinsulina (110 aminoácidos para insulina humana), que contiene un péptido señal que dirige la proteína al retículo endoplásmico (RE) en el que la secuencia señal se escinde, dando como resultado proinsulina. La proinsulina se procesa adicionalmente para liberar un péptido de cadena conectora o C (una cadena

65

C de 31 aminoácidos en insulina humana). La insulina resultante contiene una cadena A (21 aminoácidos de longitud en insulina humana; expuesta en SEQ ID NO: 862) y una cadena B (30 aminoácidos de longitud en insulina humana; expuesta en SEQ ID NO: 863) que se reticulán por enlaces disulfuro. Una insulina humana completamente reticulada contiene tres enlaces disulfuro: uno entre la posición 7 de la cadena A y la posición 7 de la cadena B, un segundo entre la posición 20 de la cadena A y la posición 19 de la cadena B, y un tercero entre las posiciones 6 y 11 de la cadena A. La referencia a una insulina incluye insulinas monoméricas y multiméricas, incluyendo insulinas hexaméricas, así como insulinas humanizadas. Son polipéptidos de insulina ejemplares los de origen mamífero, incluyendo insulina humana. La referencia a insulina incluye preproinsulina, proinsulina y polipéptidos de insulina en formas monocatenarias o bicatenarias, formas truncadas de las mismas que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y variantes de especie de insulina humana, variantes codificadas por variantes de corte y empalme y otras variantes, tales como análogos de insulina. Una insulina ejemplar es insulina humana que tiene una secuencia de aminoácidos de las cadenas A y B de insulina humana expuestas en SEQ ID NO: 862 y 863, respectivamente, y variantes o análogos de las mismas que muestran al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con las mismas con una o ambas de la cadena A o cadena B y que actúa para aumentar la captación de glucosa y/o almacenamiento y/o reducción de la producción de glucosa endógena. Una insulina ejemplar adicional es la insulina porcina que tiene una secuencia de aminoácidos para la preproinsulina como se expone en SEQ ID NO: 864, por la que la cadena A corresponde a las posiciones de restos de aminoácidos 88-108 y la cadena B corresponde al aminoácido, y variantes o análogos de la misma que muestran al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma con una o ambas de la cadena A o la cadena B y que actúa para aumentar la captación de glucosa y almacenamiento y/o reducción de la producción de glucosa endógena.

Como se usa en el presente documento, "insulina de acción rápida" se refiere a cualquier insulina que muestre niveles de insulina pico a las o aproximadamente no más de cuatro horas después de administración subcutánea a un sujeto. Las insulinas de acción rápida incluyen cualquier insulina o cualquier composición de insulina de acción rápida para administración aguda a un sujeto diabético en respuesta a una afección hiperglucémica real, percibida o anticipada en el sujeto que surge en el momento de, o en un periodo de aproximadamente cuatro horas después de la administración de la insulina de acción rápida (tal como afección hiperglucémica prandial, que resulta de o se anticipa que resulta del consumo de un alimento), por lo que la insulina de acción rápida es capaz de prevenir, combatir o aliviar la afección hiperglucémica aguda. Las insulinas de acción rápida incluyen insulinas recombinantes e insulinas aisladas (también denominadas insulinas "regulares") tales como la insulina comercializada como insulina humana, insulinas porcinas e insulinas bovinas, así como análogos de insulina de acción rápida (también denominados análogos de insulina de acción rápida en el presente documento) diseñados para tener acción rápida en virtud de cambios de aminoácidos. Las preparaciones de insulina regular ejemplares incluyen, pero sin limitación, insulinas regulares humanas, tales como las comercializadas con las marcas comerciales Humulin® R, Novolin® R y Velosulin®, Insulina Humana, USP e Inyección de Insulina Humana, USP, así como formulaciones ácidas de insulina, tales como, por ejemplo, Toronto Insulin, Old Insulin y Clear Insulin, e insulinas regulares de cerdo, tales como Iletin II® (insulina porcina). Las insulinas regulares típicamente tienen un comienzo de acción de entre 30 minutos y una hora, y un nivel pico de insulina de 2-5 horas después de la administración.

Como se usa en el presente documento, los análogos de insulina de acción rápida (también denominados análogos de insulina de acción veloz) son insulinas que tienen un comienzo de acción rápido. Las insulinas rápidas típicamente son análogos de insulina que se han modificado técnicamente, tal como mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos, para ser de acción más rápida que las insulinas regulares. Los análogos de insulina de acción rápida típicamente tienen una aparición de acción de 10-30 minutos después de la inyección, con niveles picos de insulina observados 30-90 minutos después de la inyección. Son análogos de insulina de acción rápida ejemplares análogos de insulina humana que contienen uno o más cambios de aminoácidos en la cadena A y/o cadena B de insulina humana expuesta en SEQ ID NO: 862 u 863, respectivamente, y que muestran un comienzo de acción 10-30 minutos después de la inyección con niveles picos de insulina observados 30-90 minutos después de la inyección. Los análogos de insulina de acción rápida ejemplares incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, insulina lispro (por ejemplo, insulina Humalog®), insulina aspart (por ejemplo, insulina NovoLog®), e insulina glulisina (por ejemplo, insulina Apidra®) la composición de insulina de acción rápida comercializada como VIAject® y VIAtab® (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 7.279.457). La secuencia de aminoácidos de análogos de insulina de acción rápida ejemplares tienen una cadena A con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 862 y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de en SEQ ID NO: 865-867. También se incluye cualquier otra insulina que tenga una aparición de acción de 30 minutos o menos y un nivel pico antes de 90 minutos, típicamente 30-90 minutos, después de la inyección.

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

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

- Como se usa en el presente documento, las expresiones “insulinas de acción basal” o “insulinas basales” se refieren a insulinas administradas para mantener un nivel insulina basal como parte de un régimen de tratamiento general para tratar una afección crónica tal como diabetes. Típicamente, una insulina de acción basal se formula para mantener un nivel de insulina aproximadamente de estado estacionario mediante la liberación controlada de insulina cuando se administra periódicamente (por ejemplo, una vez o dos veces al día). Las insulinas de acción basal incluyen insulinas cristalinas (por ejemplo, NPH y Lente®, insulina protamina, insulina surfeno), análogos de insulina basal (insulina glargina, HOE 901, NovoSol Basal) y otras formulaciones químicas de insulina (por ejemplo, goma arábiga, lecitina o suspensiones oleosas) que retardan la velocidad de absorción de la insulina regular. Como se usa en el presente documento, las insulinas de acción basal pueden incluir insulinas que se entiende habitualmente que tienen acción larga (alcanzando típicamente una concentración pico relativamente baja, mientras que tienen una duración máxima de acción de más de aproximadamente 20-30 horas) o de acción intermedia (que provocan típicamente concentraciones pico de insulina aproximadamente a las 4-12 horas después de la administración).
- Como se usa en el presente documento, el tratamiento significa cualquier modo en que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad u otra indicación, se alivien o se alteren de otro modo de forma beneficiosa.
- Como se usa en el presente documento, el efecto terapéutico significa un efecto resultante del tratamiento de un sujeto que altera, típicamente mejora o alivia los síntomas de una enfermedad o afección o que cura una enfermedad o afección. Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de una composición, molécula o compuesto que da como resultado un efecto terapéutico después de la administración a un sujeto.
- Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” se refiere a un animal, incluyendo un mamífero, tal como un ser humano.
- Como se usa en el presente documento, un paciente se refiere a un sujeto humano que muestra síntomas de una enfermedad o un trastorno.
- Como se usa en el presente documento, el alivio de los síntomas de una enfermedad o un trastorno particular por un tratamiento, tal como mediante administración de una composición farmacéutica u otro producto terapéutico, se refiere a cualquier reducción, bien permanente o bien temporal, duradera o transitoria, de los síntomas que puede atribuirse a o asociarse con la administración de la composición o el producto terapéutico.
- Como se usa en el presente documento, la prevención o profilaxis se refiere a métodos en los que el riesgo de desarrollar una enfermedad o afección se reduce.
- Como se usa en el presente documento, una “cantidad terapéuticamente eficaz” o una “dosis terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de un agente, compuesto, material o composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Por lo tanto, es la cantidad necesaria para prevenir, curar, aliviar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o un trastorno.
- Como se usa en el presente documento, la forma de dosis unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y envasadas individualmente como se conoce en la técnica.
- Como se usa en el presente documento, una formulación de dosificación individual se refiere a una formulación que contiene una única dosis de agente terapéutico para administración directa. Las formulaciones de dosificaciones individuales generalmente no contienen ningún conservante.
- Como se usa en el presente documento, una formulación multidosis se refiere a una formulación que contiene múltiples dosis de un agente terapéuticos y que pueden administrarse directamente para proporcionar varias dosis individuales del agente terapéutico. Las dosis pueden administrarse a lo largo del transcurso de minutos, horas, semanas, días o meses. Las formulaciones multidosis pueden permitir ajuste de dosis, agrupamiento de dosis y/o separación de dosis. Debido a que las formulaciones multidosis se usan a lo largo del tiempo, generalmente contienen uno o más conservantes para prevenir el crecimiento microbiano.
- Como se usa en el presente documento, un “artículo de fabricación” es un producto que se prepara y se vende. Como se usa a lo largo de la presente solicitud, se entiende que el término abarca un agente terapéutico con un PH20 soluble, tal como esPH20 o un esPH20 solo, contenido en los mismos artículos de envasado o artículos de envasado separados.
- Como se usa en el presente documento, fluido se refiere a cualquier composición que pueda fluir. Fluidos por lo tanto abarca composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones similares.
- Como se usa en el presente documento, un “control” o “patrón” se refiere a una muestra que es sustancialmente idéntica a la muestra de ensayo, excepto que no se trata con un parámetro de ensayo, o, si es una muestra de plasma, puede ser de un voluntario normal no aquejado de la afección de interés. Un control también puede ser un

control interno. Por ejemplo, un control puede ser una muestra, tal como un virus, que tiene una propiedad o actividad conocida.

5 Como se usa en el presente documento, las formas singulares “un” y “el” incluyen referentes plurales a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un” agente incluye uno o más agentes.

10 Como se usa en el presente documento, el término “o” se usa para indicar “y/o” a no ser que se indique explícitamente que se refiera solamente a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes.

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

15 Como se usa en el presente documento, “opcional” u “opcionalmente” significa que el acontecimiento o la circunstancia descrita a continuación sucede o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho acontecimiento o dicha circunstancia sucede y casos en los que no. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo está sustituido o no está sustituido.

20 Como se usa en el presente documento, las abreviaturas para cualquier grupo protector, aminoácidos y otros compuestos están, a no ser que se indique de otro modo, de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas, o la Comisión de IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica (véase (1972) Biochem. 11: 1726).

25 Para mayor claridad de la divulgación, y no como limitación, la descripción detallada se divide en las siguientes subsecciones.

B. Hialuronidasa PH20

30 Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de PH20 modificados. PH20 (también conocida como proteína de superficie de espermatozoide, molécula de adhesión de espermatozoide 1 o SPAM1) es una hialuronidasa que hidroliza hialuronano (también denominado ácido hialurónico, hialuronato o HA) hallado en tejidos conectivos tales como la matriz extracelular. Los polímeros de hialuronano están compuestos de unidades de disacáridos repetidas, ácido D-glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), unidos entre sí mediante enlaces glucosídicos β -1 \rightarrow 4 y β -1 \rightarrow 3 alternantes. Las cadenas de hialuronano pueden alcanzar aproximadamente 35 25.000 repeticiones de disacáridos o más de longitud, y los polímeros de hialuronano pueden variar de tamaño de aproximadamente 5.000 a 20.000.000 Da *in vivo*. El hialuronano, también denominado ácido hialurónico o hialuronato, es un glucosaminoglucano no sulfatado que está ampliamente distribuido por todos los tejidos conectivos, epiteliales y neurales. El hialuronano es un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente importante de la barrera intersticial. PH20 es una endo- β -N-acetil-hexosaminidasa que hidroliza el 40 enlace glucosídico β -1 \rightarrow 4 de ácido hialurónico en diversas longitudes de oligosacáridos tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. PH20 tiene actividades tanto hidrolítica como transglucosidasa. Además de degradar el ácido hialurónico, PH20 también puede degradar condroitín sulfatos, tales como C4-S y C6-S. PH20 puede mostrar actividad hialuronidasa a pH ácido y a pH neutro.

45 1. Estructura

Se ha clonado ADNc de PH20 de numerosas especies de mamífero. Los polipéptidos precursores de PH20 ejemplares, incluyen, pero sin limitación, polipéptidos de PH20 humanos (SEQ ID NO: 6), bovinos (SEQ ID NO: 15 o 50 17), de conejo (SEQ ID NO: 23), mono *Cynomolgus* (SEQ ID NO: 13), cobaya (SEQ ID NO: 28), rata (SEQ ID NO: 21), ratón (SEQ ID NO: 19), chimpancé (SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 869) mono Rhesus (SEQ ID NO: 11), zorro (SEQ ID NO: 30), Gibón (SEQ ID NO: 856), Tití (SEQ ID NO: 858) u orangután (SEQ ID NO: 860). El transcrito de ARNm se traduce típicamente para generar una proteína precursora que contiene una secuencia señal de 35 aminoácidos en el extremo N terminal. Después del transporte al RE, el péptido señal se retira para producir un polipéptido de PH20 maduro. Los polipéptidos de PH20 maduros ejemplares, incluyen, pero sin limitación, 55 polipéptidos de PH20 humanos (SEQ ID NO: 7), bovinos (SEQ ID NO: 16 o 18), de conejo (SEQ ID NO: 24), mono *Cynomolgus* (SEQ ID NO: 14), cobaya (SEQ ID NO: 29), rata (SEQ ID NO: 22), ratón (SEQ ID NO: 20), chimpancé (SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 870), mono Rhesus (SEQ ID NO: 12), Zorro (SEQ ID NO: 31), Gibón (SEQ ID NO: 857), Tití (SEQ ID NO: 859) u orangután (SEQ ID NO: 861). Por ejemplo, el transcrito de ARNm de PH20 humano se traduce normalmente para generar una proteína precursora de 509 aminoácidos (SEQ ID NO: 6) que contiene una 60 secuencia señal de 35 aminoácidos en el extremo N terminal (posiciones de restos de aminoácidos 1-35 de SEQ ID NO: 6). Por lo tanto, después del transporte al RE y retirada del péptido señal, se produce un polipéptido maduro de 474 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7. También se conocen secuencias de PH20 de ovinos (véase por ejemplo, SEQ ID NO: 25-27).

65 En particular, PH20 humana tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6. La PH20 humana madura que carece de una secuencia señal se expone en SEQ ID NO: 7. Se conocen variantes alélicas y otras

variantes de PH20. Se han presentado otras secuencias de PH20. Por ejemplo, se conoce una variante de PH20 como se expone en la secuencia precursora expuesta en SEQ ID NO: 68 que contiene un Ala en la posición 48 y un Trp en la posición 499, o la secuencia madura de la misma expuesta en SEQ ID NO: 69 que contiene las diferencias correspondientes en las posiciones 13 y 464, respectivamente, en comparación con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7 (véase, por ejemplo, Gmachl *et al.* (1993) FEBS Lett., 336: 545-548; n.º de referencia de GenBank AAC60607). Además, se ha identificado una variante natural de PH20 que contiene una Glutamina (Gln; Q) en la posición 5 en comparación con la secuencia precursora de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 70, véase también Varela *et al.* (2011) Nature, 469:539-542). Otra variante natural contiene una Alanina (Ala; A) en la posición 47 en comparación con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 (como se expone en SEQ ID NO: 71) y correspondiente a la posición 12 en comparación con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o 7 (como se expone en SEQ ID NO: 72).

La secuencia y estructura de polipéptidos de PH20 está altamente conservada. La identidad de secuencia entre y dentro de proteínas de PH20 de diversas especies es de aproximadamente 50 % a 90 %. La secuencia señal N terminal hidrófoba de 35 aminoácidos de longitud está en general conservada entre polipéptidos de hialuronidasa PH20. Las hialuronidasas PH20 contienen una región de dominio de hialuronidasa central común de aproximadamente 340 aminoácidos de longitud que corresponde a los restos de aminoácidos 38-374 de la secuencia de PH20 humana precursora expuesta en SEQ ID NO: 6. Un polipéptido de PH20 maduro que carece de la secuencia señal y que contiene una secuencia contigua de aminoácidos que tiene un resto de aminoácido C terminal correspondiente al resto de aminoácido 464 de SEQ ID NO: 6 (por ejemplo, restos de aminoácidos correspondientes a las posiciones 36-464 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6) es la secuencia mínima requerida para actividad hialuronidasa (véase, por ejemplo, Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 10/795.095, que está expedida como Patente de Estados Unidos n.º 7.767.429; véase también Publicación de Estados Unidos n.º US20100143457).

Dentro de la región de dominio hialuronidasa común, al menos 57 aminoácidos están conservados entre y dentro de especies (véase por ejemplo, Arming *et al.* (1997) Eur. J. Biochem., 247: 810-814; ten Have *et al.* (1998) Reprod. Fertil. Dev., 10: 165-72; Chowpongpan *et al.* (2004) Biotechnology Letters, 26: 1247-1252). Por ejemplo, las hialuronidasas PH20 contienen 12 restos de cisteína conservados correspondientes a los restos de aminoácidos 25, 189, 203, 316, 341, 346, 352, 400, 402, 408, 423 y 429 de la secuencia de aminoácidos de una PH20 madura que carece de la secuencia señal tal como se expone en SEQ ID NO: 3 o 7 (correspondiente a los restos de aminoácidos 60, 224, 238, 351, 376, 381, 387, 435, 437, 443, 458 o 464 de PH20 humana de longitud completa expuesta en SEQ ID NO: 6). Los restos de cisteína correspondientes a 25 y 316 y restos de cisteína correspondientes a 189 y 203 forman enlaces disulfuro. Los otros restos de cisteína también forman enlaces disulfuro, están implicados en la maduración de proteína postraduccional y/o en la modulación de la actividad. Por ejemplo, cuatro enlaces disulfuro adicionales se forman entre los restos de cisteína C376 y C387; entre C381 y C435; entre C437 y C443; y entre C458 y C464 del polipéptido ejemplificado en SEQ ID NO: 6 (correspondiente a las posiciones C341 y C352; entre C346 y C400; entre C402 y C408; y entre C423 y C429 del polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 3 o 7, respectivamente).

Los restos de aminoácidos correspondientes a los restos de aminoácidos D111, E113 y E249 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o 7, son restos ácidos parte del sitio activo enzimático y están conservados entre y dentro de especies de PH20. Los restos de aminoácidos R176, R246, R252 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o 7 también están conservados entre y dentro de especies y contribuyen a la unión a sustrato y/o actividad hialuronidasa. Las mutaciones de aminoácidos D111N, E113Q, R176G, E249N y R252T dan como resultado enzimas que no tienen actividad enzimática detectable o actividad enzimática residual (véase, por ejemplo, Arming *et al.* (1997) Eur. J. Biochem., 247: 810-814).

Los resultados del presente documento confirman el requisito de restos de aminoácidos de PH20 correspondientes a las posiciones 25, 111, 113, 176, 189, 203, 246, 249, 252, 316, 341, 346, 352, 400, 402, 408, 423 y 429 de la secuencia de aminoácidos expuesta en una PH20 madura que carece de la secuencia señal tal como se expone en SEQ ID NO: 3 o 7 para actividad hialuronidasa, ya que la mutagénesis de estos restos da como resultado una enzima que no está activa (por ejemplo, no se expresa o está inactiva cuando se expresa, véase por ejemplo, las Tablas 5 y 10). La excepción es que el reemplazo de aminoácidos correspondiente a R176K y C316D dio como resultado mutantes que generaron algo de actividad hialuronidasa residual.

También se requiere glucosilación para actividad hialuronidasa de PH20 basándose en el motivo de reconocimiento NxS o NxT. Hay seis oligosacáridos ligados a N en restos de aminoácidos correspondientes a las posiciones N47, N131, N200, N219, N333 y N358 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o 7 (correspondientes a los restos de aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de PH20 humana expuesta en SEQ ID NO: 6). En particular, al menos los sitios de glucosilación ligados a N correspondientes a los restos de aminoácidos N200, N333 y N358 se requieren para secreción y/o actividad de la enzima (véase, por ejemplo, Publicación de Estados Unidos n.º US20100143457). Por ejemplo, un polipéptido de PH20 que contiene mutaciones de aminoácidos N200A, N333A, N358A o N333A/N393A da como resultado proteínas inactivas. Las mutaciones individuales de sitios de glucosilación N47A, N131A, N219A, N47A/N131A, N47A/N219A, N131A/N291A conservan la actividad. El sitio de glucosilación ligado a N correspondiente al resto de aminoácido N368 de PH20 humano expuesto en SEQ ID NO: 6

está conservado entre y dentro de especies (véase, por ejemplo, Chowpongpan *et al.* (2004) *Biotechnology Letters*, 26: 1247-1252). Las hialuronidasas PH20 también contienen sitios de glucosilación ligados a O. Por ejemplo, PH20 humano tiene un oligosacárido ligado a O en el resto de aminoácido correspondiente al aminoácido al aminoácido T440 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o 7 (correspondiente al resto de aminoácido T475 en SEQ ID NO: 6).

Además de los sitios catalíticos, PH20 también contiene un sitio de unión de hialuronano. Este sitio está localizado en la región de Péptido 2, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 205-235 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 6 y las posiciones 170-200 del polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 3 o 7. Esta región está altamente conservada entre hialuronidasas y es similar al motivo de unión a heparina. La mutación del resto de arginina en la posición 176 (correspondiente al polipéptido de PH20 maduro expuesto en SEQ ID NO: 3 o 7), a una glicina da como resultado un polipéptido con solamente aproximadamente 1% de la actividad hialuronidasa del polipéptido de tipo silvestre (Arming *et al.*, (1997) *Eur. J. Biochem.* 247: 810-814).

Los polipéptidos de PH20 contienen un anclaje de glucosil fosfatidilinositol (GPI) unido al extremo C terminal de la proteína que ancla la proteína a la monocapa extracelular de la membrana plasmática de células. Al menos las PH20 humanas, de mono, de ratón y de cobaya están unidas fuertemente a la membrana plasmática mediante el anclaje de GPI, que puede liberarse tratando con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC; véase por ejemplo, Lin *et al.* (1994) *Journal of Cell Biology*, 125: 1157-1163; Lin *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 10071-10075). Otras enzimas PH20, tales como pH20 bovina, están unidas débilmente a la membrana plasmática y no se anclan mediante un anclaje sensible a fosfolipasa. Como se analiza posteriormente, las formas activas solubles que, cuando se expresan, no están unidas a membrana sino que se secretan pueden generarse mediante la retirada de todo o una parte del sitio señal de unión a anclaje de GPI (véase también Patente de Estados Unidos n.º 7.767.429; Publicación de Estados Unidos n.º US20100143457). Estos incluyen, por ejemplo, polipéptidos de PH20 solubles expuestos en cualquiera de las SEQ ID NO: 3 o 32-66, o formas precursoras de los mismos que contienen una secuencia señal.

Las proteínas ancladas con GPI, por ejemplo PH20 humana, se traducen con un péptido señal N terminal escindible que dirige la proteína al retículo endoplásmico (RE). En el extremo C terminal de estas proteínas hay otra secuencia señal que dirige la adición de un anclaje de GPI preformado al polipéptido dentro del lumen del RE. Se produce adición del anclaje de GPI después de escisión de la parte C terminal en una posición de aminoácido específica, denomina el sitio ω (típicamente localizado aproximadamente 20-30 aminoácidos del extremo C terminal). Aunque parece no haber secuencia consenso para identificar la localización del sitio ω , las proteínas ancladas a GPI contienen una secuencia señal de unión de anclaje de GPI C terminal o dominio que contiene típicamente una región predominantemente hidrófoba de 8-20 aminoácidos, precedida por una región espaciadora hidrófila de 8-12 aminoácidos e inmediatamente cadena abajo del sitio ω . Esta región espaciadora hidrófila es con frecuencia rica en aminoácidos con carga y prolina (White *et al.* (2000) *J. Cell Sci.* 113(Pt.4): 721-727). Hay en general una región de aproximadamente 11 aminoácidos antes de la posición $\omega-1$ que se caracteriza por una baja cantidad de la estructura secundaria predicha, una región alrededor del sitio de escisión (sitio ω), de $\omega-1$ a $\omega+2$ que se caracteriza por la presencia de restos de cadena lateral pequeños, la región espaciadora entre las posiciones $\omega+3$ y $\omega+9$ y una cola hidrófoba de $\omega+10$ al extremo C terminal (Pierleoni *et al.*, (2008) *BMC Bioinformatics* 9: 392).

Aunque no hay ninguna secuencia señal consenso de unión a anclaje de GPI, se han desarrollado diversos métodos por ordenador y algoritmos que pueden usarse para identificar dichas secuencias en polipéptidos (véase, por ejemplo, Udenfriend *et al.* (1995) *Methods Enzymol.* 250: 571-582; Eisenhaber *et al.* (1999) *J. Mol. Chem.* 292: 741-758; Kronegg y Buloz, (1999), "Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI)", 129.194.185.165/dgpi/; Fankhauser *et al.* (2005) *Bioinformatics* 21: 1846-1852; Omaetxebarria *et al.* (2007) *Proteomics* 7: 1951-1960; Pierleoni *et al.* (2008) *BMC Bioinformatics* 9: 392), incluyendo los que ya están disponibles en sitios web bioinformáticos, tales como el sitio de herramientas Proteómicas ExPASy (expasy.ch/tools/). Por lo tanto, un experto en la materia puede determinar si un polipéptido de PH20 probablemente contenga una secuencia señal de unión a anclaje a GPI y, por lo tanto, si el polipéptido de PH20 es una proteína anclada a GPI.

La unión covalente de un anclaje de GPI con el extremo C terminal de PH20 humana y, por lo tanto, la naturaleza unida a membrana de PH20, se ha confirmado usando estudios de hidrólisis de fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) (véase por ejemplo, Lin *et al.*, (1994) *J. Biol. Chem.* 125: 1157-1163). La fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) y D (PI-PLD) hidrolizan el anclaje de GPI, liberando el polipéptido de PH20 de la membrana celular. La bibliografía de la técnica anterior indica que se ha identificado un sitio de escisión de sitio ω de PH20 humana entre Ser-490 y Ala-491 y para PH20 de mono se identifica entre Ser491 y Thr492 (Lin *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1993) 90: 10071-10075). Por lo tanto, la bibliografía indica que una secuencia señal de unión a anclaje de GPI de PH20 humana se localiza en las posiciones de aminoácidos 491-509 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 6, y el sitio ω es la posición de aminoácido 490. Por lo tanto, en esta modelización de PH20 humana, los aminoácidos 491-509 se escinden después del transporte al RE y un anclaje de GPI está unido covalentemente con el resto de serina en la posición 490.

2. Función

PH20 se expresa normalmente en espermatozoide de un gen específico de testículo individual. PH20 es una proteína asociada a espermatozoide implicada en la fertilización. PH20 se localiza normalmente en la superficie de espermatozoide y en el acrosoma derivado de lisosoma, donde se une con la membrana acrosómica interna. PH20 es multifuncional y muestra actividad hialuronidasa, actividad de señalización celular mediada por hialuronano (HA) y actúa como un receptor de espermatozoide para la zona pelúcida que rodea al oocito cuando está presente en espermatozoide que ha reaccionado con acrosoma (RA). Por ejemplo, PH20 está implicado de forma natural en la adhesión espermatozoide-óvulo y ayuda a la penetración por el espermatozoide de la capa de células del cumulus digiriendo ácido hialurónico. Además de ser una hialuronidasa, PH20 también parece ser un receptor para la señalización celular inducida por HA, y un receptor para la zona pelúcida que rodea al oocito. Debido al papel de PH20 en la fertilización, puede usarse PH20 como un antígeno para inmunoanticoncepción.

PH20 es una hialuronidasa activa neutra, aunque puede mostrar actividad activa frente a ácidos en algunos casos. La actividad hialuronidasa de PH20 se muestra por la PH20 asociada a membrana acrosómica interna y membrana plasmática. La PH20 de membrana plasmática muestra actividad hialuronidasa solamente a pH neutro, mientras que la PH20 asociada a membrana acrosómica interna muestra actividad enzimática activa frente a ácido. La base estructural para estas diferencias se debe a la presencia de dos sitios catalíticos en PH20. Un primer sitio catalítico se designa como la región de Péptido 1, correspondiente a los restos de aminoácidos 142-172 de SEQ ID NO: 6, que está implicado en la actividad enzimática de PH20 a pH neutro. Un segundo sitio catalítico se designa como la región de péptido 3, correspondiente a los restos de aminoácido 277-297 de SEQ ID NO: 6, que está implicada en la actividad enzimática a pH menor. Se produce un cambio en la estructura de la PH20 asociada a membrana acrosómica interna después de la reacción de acrosoma, por lo que PH20 se escinde endoproteolíticamente pero se mantiene unida por enlaces disulfuro. El resultado de la endoproteólisis es que la región de péptido 3 se activa y puede por lo tanto efectuar actividad neutra y ácida a PH20 (véase por ejemplo, Cherr *et al.* (2001) *Matrix Biology*, 20: 515-525). Además, después de la reacción de acrosoma, se generan formas de menor peso molecular por liberación de la membrana acrosómica interna (por ejemplo, se genera una forma soluble de 53 kDa de PH20 en monos). La forma o las formas del menor peso molecular también son activas frente a ácidos.

La actividad hialuronidasa de PH20 explica la actividad de propagación observada en extractos de testículos animales que se han usado clínicamente durante décadas para aumentar la dispersión y absorción de fármacos (véase, por ejemplo, Bookbinder *et al.* (2006) *J Controlled Release*, 114: 230-241). Por ejemplo, se han desarrollado preparaciones farmacéuticas que contienen hialuronidasa como extractos fraccionados de testículos bovinos para uso terapéutico como agentes de propagación y en otras aplicaciones (Schwartzman (1951) *J. Pediat.*, 39: 491-502). Las preparaciones de extractos testiculares bovinos originales incluyeron, por ejemplo, extractos comercializados con los nombres comerciales Wydase®, Hylase®, "Dessau", Neopermease®, Alidase® y Hyazyme®. Se sabe ahora que la actividad de propagación de preparaciones de extractos testiculares se debe a la actividad hialuronidasa PH20. Por ejemplo, en 2001 se identificó una hialuronidasa de espermatozoide en toro como la hialuronidasa PH20 (Lalancette *et al.* (2001) *Biol. Reprod.*, 65: 628-36). Catalizando la hidrólisis del ácido hialurónico, la hialuronidasa PH20 reduce la viscosidad de ácido hialurónico, aumentando de este modo la permeabilidad tisular. Por lo tanto, se usan formas solubles de PH20 como un agente de propagación o dispersión junto con otros agentes, fármacos y proteínas para potenciar su dispersión y suministro, y para mejorar el perfil de farmacocinética y farmacodinámica del agente, fármaco o proteína coadministrado (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 7.767.429; Bookbinder *et al.* (2006) *J Controlled Release*, 114: 230-241).

3. Polipéptidos de PH20 solubles

PH20 puede existir en forma unida a membrana o asociada a membrana, o puede secretarse al medio cuando se exprese a partir de células, y por lo tanto puede existir en forma soluble. PH20 soluble puede detectarse y diferenciarse de PH20 insoluble, unida a membrana usando métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, los que usan un ensayo de Triton® X-114. En este ensayo, las hialuronidasas PH20 solubles se dividen a la fase acuosa de una solución de Triton® X-114 calentada a 37 °C (Bordier *et al.*, (1981) *J. Biol. Chem.*, 256: 1604-7) mientras que las hialuronidasas PH20 ancladas a membrana se dividen a la fase rica en detergente. Por lo tanto, además de usar algoritmos para evaluar si un polipéptido de PH20 está anclado a GPI de forma natural y por lo tanto unido a membrana, pueden realizarse también experimentos de solubilidad.

Las enzimas PH20 solubles incluyen hialuronidasas que contienen una secuencia señal de unión a anclaje de GPI, pero que están unidas débilmente a la membrana de modo que no contienen un anclaje sensible a fosfolipasa. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 solubles incluyen PH20 ovina o bovina. Se han preparado diversas formas de hialuronidasas PH20 solubles tales y se han aprobado para su uso terapéutico en sujetos, incluyendo seres humanos. Por ejemplo, las preparaciones de hialuronidasa derivadas de animales incluyen Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular ovina purificada, y Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular bovina. Las enzimas PH20 solubles también incluyen formas truncadas de hialuronidasas PH20 asociadas a membrana humanas o no humanas que carecen de uno o más restos de aminoácidos de una secuencia señal de unión a anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) y conservan la actividad hialuronidasa (véase

por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 7.767.429; Publicación de Estados Unidos n.º US20100143457). Por lo tanto, en lugar de tener un anclaje de GPI unido covalentemente al extremo C terminal de la proteína en el RE y anclarse a la monocapa extracelular de la membrana plasmática, estos polipéptidos se secretan cuando se expresan a partir de células y son solubles. En casos en los que la enzima degradante de hialuronano soluble conserva una parte de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos de aminoácidos en la secuencia señal de unión a anclaje de GPI puede conservarse, siempre que el polipéptido sea soluble (es decir, se secreta cuando se exprese a partir de células) y activo.

Las hialuronidasas solubles ejemplares que están truncadas en el extremo C terminal y carecen de toda o una parte de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI incluyen, pero sin limitación, polipéptidos de PH20 de origen primate, tales como, por ejemplo, polipéptidos de PH20 humanos y de chimpancé. Por ejemplo, pueden prepararse polipéptidos de PH20 solubles mediante truncamiento C terminal de un polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 7, 10, 12, 14, 69, 72, 857, 859, 861 u 870 o variantes de las mismas que muestran al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 10, 12, 14, 69, 72, 857, 859, 861 u 870, donde el polipéptido resultante es activo, soluble y carece de todos o una parte de los restos de aminoácidos de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI.

Son polipéptidos de PH20 solubles ejemplares los polipéptidos de PH20 humanos truncados C terminales que son maduros (que carecen de una secuencia señal), solubles y muestran actividad neutra, y que contienen una secuencia contigua de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 que tiene mínimamente un resto de aminoácido truncado en el extremo C terminal o después del resto de aminoácido 464 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 solubles incluyen polipéptidos truncados en el extremo C terminal que contienen mínimamente una secuencia contigua de los aminoácidos 36-464 of SEQ ID NO: 6, o incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, por ejemplo al menos 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % de identidad de secuencia con una secuencia contigua de aminoácidos que tiene un resto de aminoácido C terminal después del aminoácido 464 de SEQ ID NO: 6 y conserva actividad hialuronidasa. Son polipéptidos de PH20 humanos truncados en el extremo C terminal ejemplares polipéptidos maduros (que carecen de una secuencia señal) que incluyen una secuencia contigua de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 con un resto C terminal después de 464 tal como después de la posición de aminoácido 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6, o una variante de la misma que muestra al menos 85 % de identidad de secuencia, tal como al menos 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % de identidad de secuencia con la misma y conserva actividad hialuronidasa. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 C terminales ejemplares tienen una secuencia de aminoácidos de 36 a 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6, o una variante de la misma que muestra al menos 85 % de identidad de secuencia, tal como al menos 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % de identidad de secuencia con la misma y conserva actividad hialuronidasa. Los polipéptidos de PH20 solubles incluyen cualquiera que tenga la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o 32-66 o una secuencia de aminoácidos que muestre al menos 85 % de identidad de secuencia, tal como al menos 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3 o 32-66.

En particular, un polipéptido de PH20 humano soluble es un polipéptido que está truncado después del aminoácido 482 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6. Dicho polipéptido puede generarse a partir de una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia señal y codifica los aminoácidos 36-482, por ejemplo, como se expone en SEQ ID NO: 1 (que contiene una secuencia señal de IgG kappa) o SEQ ID NO: 67 (que contiene la secuencia señal nativa). El procesamiento postraduccional retira la secuencia señal, dejando una PH20 humana recombinante soluble de 447 aminoácidos (SEQ ID NO: 3). Un producto producido tras la expresión de un vector expuesto en SEQ ID NO: 4 o 5, y que contiene una molécula de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 67, da como resultado un producto secretado, designado rHuPH20, en el medio de cultivo que muestra heterogeneidad en el extremo C terminal de modo que el producto incluye una mezcla de especies que puede incluir una cualquiera o más de SEQ ID NO: 3 y 44-48 en diversa abundancia. Típicamente, rHuPH20 se produce en células que facilitan la glucosilación N correcta para conservar actividad, tales como células de mamífero, por ejemplo células CHO (por ejemplo, células CHO DG44). Hylenex® (Halozyme) es una hialuronidasa recombinante humana producida por células de ovario de hámster chino (CHO) modificadas por ingeniería genética que contienen ácido nucleico que codifica un polipéptido de PH20 humano truncado (designado rHuPH20).

C. POLIPÉPTIDOS DE PH20 MODIFICADOS

Se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 modificados o variantes. Los polipéptidos de PH20 modificados muestran actividades o propiedades alteradas en comparación con un polipéptido de PH20 de tipo silvestre, nativo o de referencia. Entre los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento se incluyen polipéptidos de PH20 que son mutantes activos, por lo que los polipéptidos muestran al menos 40 % de la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene la modificación de aminoácido (por

ejemplo, reemplazo de aminoácido). En particular, se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 que muestran actividad hialuronidasa y que muestran estabilidad aumentada en comparación con la PH20 que no contiene la modificación de aminoácidos. También se describen polipéptidos de PH20 modificados que están inactivos y que pueden usarse, por ejemplo, como antígenos en vacunas de anticoncepción.

5 Las modificaciones pueden ser una única modificación de aminoácido, tal como reemplazos de aminoácidos individuales (sustituciones), inserciones o supresiones, o múltiples modificaciones de aminoácidos, tales como múltiples reemplazos, inserciones o supresiones de aminoácidos. Son modificaciones ejemplares reemplazos de aminoácidos, incluyendo reemplazos de aminoácidos individuales o múltiples. El reemplazo de aminoácidos puede ser una sustitución conservativa, tal como se expone en la Tabla 2, o una sustitución no conservativa, tal como cualquiera descrita en el presente documento. Los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento pueden contener al menos o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más posiciones modificadas en comparación con el polipéptido de PH20 que no contiene la modificación.

15 Las modificaciones descritas en el presente documento pueden estar en cualquier polipéptido de PH20, incluyendo, formas precursoras, maduras o truncadas en el extremo C terminal, siempre que la forma modificada muestre actividad hialuronidasa. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 contienen modificaciones en comparación con un polipéptido de PH20 de tipo silvestre, nativo o de referencia expuesto en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 u 870, o en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 u 870. Por ejemplo, las modificaciones se realizan en un polipéptido de PH20 que tiene la secuencia de aminoácidos que incluye o expuesta en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 72; un polipéptido de PH20 bovino que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o expuesta en SEQ ID NO: 16 o 18; un polipéptido de PH20 de conejo que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o expuesta en SEQ ID NO: 24, un polipéptido de PH20 de mono *Cynomolgus* que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o expuesta en SEQ ID NO: 14; un polipéptido de PH20 de cobaya que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o expuesta en SEQ ID NO: 29, un polipéptido de PH20 de rata que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o expuesta en SEQ ID NO: 22; un polipéptido de PH20 de ratón que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o expuesta en SEQ ID NO: 20; un polipéptido de PH20 de chimpancé que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o expuesta en SEQ ID NO: 10 u 870; un polipéptido de PH20 de mono Rhesus que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o expuesta en SEQ ID NO: 12; un polipéptido de PH20 de Zorro que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o expuesta en SEQ ID NO: 31; un polipéptido de PH20 de Gibón que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o expuesta en SEQ ID NO: 857; un polipéptido de PH20 de Tití que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o expuesta en SEQ ID NO: 859; un polipéptido de PH20 de Orangután que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o expuesta en SEQ ID NO: 861; o un polipéptido de PH20 de oveja que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o expuesta en SEQ ID NO: 25-27; o en variantes de secuencia o variantes truncadas que muestran al menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24-27, 29, 31, 69, 72, 857, 859, 861 u 870.

En particular, se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 que contienen modificaciones comparadas con un polipéptido de PH20 expuesto en SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72, o un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 68 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72. Por ejemplo, las modificaciones descritas en el presente documento también pueden realizarse en un polipéptido de PH20 expuesto como SEQ ID NO: 10, 12, 14, 24, 857, 859, 861 u 870.

En particular, se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 que son polipéptidos de PH20 que contienen una modificación descrita en el presente documento, y que cuando se expresan a partir de células se secretan al medio como una proteína soluble. Por ejemplo, las modificaciones se realizan en un polipéptido de PH20 soluble que está truncado en el extremo C terminal dentro de o cerca de la parte C terminal que contiene la secuencia señal de anclaje de GPI de un polipéptido de PH20 que contiene una secuencia señal de anclaje de GPI. El truncamiento C terminal puede ser un truncamiento o una supresión de 8 aminoácidos contiguos del extremo C terminal, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más aminoácidos en el extremo C terminal, siempre que el polipéptido truncado en el extremo C terminal resultante muestre actividad hialuronidasa y secrete a partir de células (por ejemplo, el medio) cuando se exprese. En algunos ejemplos, las modificaciones descritas en el presente documento se realizan en un polipéptido de PH20 que es un polipéptido truncado en el extremo C terminal de SEQ ID NO: 7, 10, 12, 14, 69, 72, 857, 859, 861 u 870 o una variante del mismo que muestra al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 10, 12, 14, 69, 72, 857, 859, 861 u 870. En particular, las modificaciones descritas en el presente documento se realizan en un polipéptido de PH20 humano truncado en el extremo C terminal o soluble que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o 32-66 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en

cualquiera de las SEQ ID NO: 3 o 32-66. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento contienen reemplazos de aminoácidos o sustituciones, adiciones o supresiones, truncamientos o combinaciones de los mismos en referencia al polipéptido de PH20 expuesto en SEQ ID NO: 3.

5 También pueden realizarse modificaciones en la forma precursora correspondiente que contiene un péptido señal de cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24-27, 29, 31, 32-66, 69, 72, 857, 859, 861 u 870. Por ejemplo, pueden realizarse modificaciones descritas en el presente documento en una forma precursora expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 28, 30, 856, 858, 860 u 869 o en una variante de la misma que muestra al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 28, 30, 856, 858, 860 u 869.

15 En ejemplos de polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento, el polipéptido de PH20 modificado no contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3-66, 68-72, 856-861, 869 u 870. Típicamente, el polipéptido de PH20 es un polipéptido de PH20 humano, y no contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 8-31, 856-861, 869 u 870.

20 En general, cualquier modificación, tal como un reemplazo, una supresión o una sustitución de aminoácidos, puede realizarse en un polipéptido de PH20, a condición de que la modificación no sea un reemplazo de aminoácido donde la única modificación sea un reemplazo de un único aminoácido que sea V12A, N47A, D111N, E113Q, N131A, R176G, N200A, N219A, E249Q, R252T, N333A o N358A. Además, cuando el polipéptido de PH20 modificado contiene solamente dos reemplazos de aminoácidos, los reemplazos de aminoácidos no son P13A/L464W, N47A/N131A, N47A/N219A, N131A/N219A o N333A/N358A. En un ejemplo adicional, cuando el polipéptido de PH20 modificado contiene solamente tres reemplazos de aminoácidos, los reemplazos de aminoácidos no son N47A/N131A/N219A. Se describen en detalle posteriormente modificaciones ejemplares descritas en el presente documento.

30 Para fines del presente documento, las referencias a posiciones y aminoácidos para modificación en el presente documento, incluyendo reemplazo o reemplazos de aminoácidos, son en referencia al polipéptido de PH20 expuesto en SEQ ID NO: 3. Está dentro del nivel de un experto en la materia realizar cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento en otro polipéptido de PH20 identificando el resto de aminoácido correspondiente en otro polipéptido de PH20, tal como cualquiera expuesto en SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24-27, 28, 29, 30, 31, 32-66, 68-72, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 869 u 870 o una variante del mismo que muestra al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24-27, 28, 29, 30, 31, 32-66, 68-72, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 869 u 870. Pueden identificarse posiciones correspondientes en otro polipéptido de PH20 mediante alineamiento del polipéptido de PH20 con la referencia al polipéptido de PH20 expuesto en SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, la Figura 2 representa el elemento de polipéptidos de PH20 ejemplares con SEQ ID NO: 3, y la identificación de posiciones correspondientes ejemplares. Además, ya que SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 y 72 son todas formas de una PH20 humana madura con un resto de aminoácido C terminal diferente, la numeración de restos de aminoácidos en cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 32-66, 69 y 72 es la misma que SEQ ID NO: 3, y por lo tanto los restos correspondientes de cada uno son idénticos a los expuestos en SEQ ID NO: 3 (véase por ejemplo, Figura 1). Además, las SEQ ID NO expuestas en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 6, 70 o 71 son formas precursoras de las mismas que difieren en solamente la presencia de una secuencia señal. Para fines de modificación (por ejemplo, reemplazo de aminoácidos), el resto de aminoácido correspondiente puede ser cualquier resto de aminoácido, y no es necesario que sea idéntico al resto expuesto en SEQ ID NO: 3. Típicamente, el resto de aminoácido correspondiente identificado por alineamiento con restos en SEQ ID NO: 3 es un resto de aminoácido que es idéntico a SEQ ID NO: 3, o es un resto de aminoácido conservativo o semi-conservativo para el mismo (véase por ejemplo, la Figura 2). También se entiende que los reemplazos ejemplares descritos en el presente documento pueden realizarse en el resto correspondiente en un polipéptido de PH20, siempre que el reemplazo sea diferente al que existe en la forma no modificada del polipéptido de PH20. Basándose en esta descripción y la descripción de otra parte del presente documento, está dentro del nivel de un experto en la materia generar un polipéptido de PH20 modificado que contiene una cualquiera o más de la mutación descrita, y ensayar cada uno con respecto a una propiedad o actividad como se describe en el presente documento.

60 También pueden realizarse modificaciones en un polipéptido de PH20 a un polipéptido de PH20 que también contiene otras modificaciones, incluyendo modificaciones de la secuencia primaria y modificaciones que no están en la secuencia primaria del polipéptido. Por ejemplo, las modificaciones descritas en el presente documento pueden estar en un polipéptido de PH20 que está en un polipéptido de fusión o un polipéptido quimérico. Los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento también incluyen polipéptidos que están conjugados con un polímero, tal como un reactivo de PEG.

65 También se describen en el presente documento moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de los polipéptidos de PH20 descritos en el presente documento. En ejemplos particulares, la secuencia de ácido nucleico puede tener codones optimizados, por ejemplo, para aumentar los niveles de expresión de la secuencia codificada.

El uso codónico particular depende del organismo hospedador en el que se exprese el polipéptido modificado. Un experto habitual en la materia está familiarizado con codones óptimos para expresión en células de mamífero o humanas, bacterias o levaduras, incluyendo por ejemplo *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*. Por ejemplo, la información de uso codónico está disponible de la Base de Datos de Uso Codónico disponible en kazusa.or.jp/codon (véase Richmond (2000) *Genome Biology*, 1:reports241 para una descripción de la base de datos). Véase también, Forsburg (1994) *Yeast*, 10: 1045-1047; Brown *et al.* (1991) *Nucleic Acids Research*, 19: 4298; Sharp *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.*, 12: 8207-8211; Sharp *et al.* (1991) *Yeast*, 657-78). En algunos ejemplos, las moléculas de ácido nucleico codificantes también pueden modificarse para contener una secuencia señal heteróloga para alterar (por ejemplo, aumentar) la expresión y secreción del polipéptido. Es un ejemplo de una secuencia señal heteróloga un ácido nucleico que codifica la secuencia señal de IgG kappa (expuesta en SEQ ID NO: 868).

Los polipéptidos modificados y moléculas de ácido nucleico codificantes descritos en el presente documento pueden producirse por técnicas de ADN recombinante convencionales conocidas por los expertos en la materia. Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para efectuar mutación de uno cualquiera o más aminoácidos en una proteína diana. Los métodos incluyen mutagénesis dirigida o aleatoria convencional de moléculas de ácido nucleico codificantes, o métodos de síntesis de polipéptidos de fase sólida. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de PH20 pueden someterse a mutagénesis, tal como mutagénesis aleatoria del ácido nucleico codificante, PCR propensa a errores, mutagénesis dirigida, PCR solapante, redistribución génica u otros métodos recombinantes. El ácido nucleico que codifica los polipéptidos puede después introducirse en una célula hospedadora para expresarse de forma heteróloga. Por lo tanto, también se describen en el presente documento moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de los polipéptidos modificados descritos en el presente documento. En algunos ejemplos, los polipéptidos de PH20 modificados se producen de forma sintética, tal como usando síntesis peptídica de fase sólida o de fase en solución.

En las subsecciones posteriores, se describen polipéptidos de PH20 modificados ejemplares que muestran propiedades y actividades alteradas, y que codifican moléculas de ácido nucleico, proporcionados en el presente documento.

1. Mutantes activos

Se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 modificados que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de PH20 y que muestran actividad hialuronidasa. Los polipéptidos de PH20 modificados pueden mostrar de 40 % a 5000 % de la actividad hialuronidasa de un polipéptido de PH20 de tipo silvestre o de referencia, tal como el polipéptido expuesto en las SEQ ID NO: 3 o 7. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento muestran al menos 40 % de la actividad hialuronidasa, tal como al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1000 %, 2000 %, 3000 % o más de la actividad hialuronidasa de un polipéptido de PH20 de tipo silvestre o de referencia, tal como el polipéptido correspondiente que no contiene la modificación de aminoácido (por ejemplo, reemplazo de aminoácido), por ejemplo, un polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 3 o 7. Por ejemplo, las posiciones ejemplares que pueden modificarse, por ejemplo por reemplazo o sustitución de aminoácidos, incluyen, pero sin limitación, cualquiera de las posiciones correspondientes a la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 58, 59, 60, 61, 63, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 110, 114, 117, 118, 119, 120, 122, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 186, 192, 193, 195, 196, 197, 198, 200, 202, 204, 205, 206, 208, 209, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 226, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 242, 245, 247, 248, 251, 253, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 297, 298, 300, 301, 302, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 320, 321, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 331, 334, 335, 338, 339, 342, 343, 347, 348, 349, 351, 353, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 367, 368, 369, 371, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 383, 385, 387, 388, 389, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 401, 403, 404, 405, 406, 407, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 425, 426, 427, 428, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446 o 447 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3. Típicamente, el resto de aminoácido que está modificado (por ejemplo, reemplazado con otro aminoácido) en la posición correspondiente a cualquiera de las posiciones anteriores en un polipéptido de PH20 es un resto idéntico, un resto conservado o un resto de aminoácido semi-conservativo con respecto al resto de aminoácido expuesto en SEQ ID NO: 3.

Para conservar la actividad hialuronidasa, no se realizan típicamente modificaciones en las posiciones que son menos tolerantes al cambio o requeridas para actividad hialuronidasa. Por ejemplo, no se realizan modificaciones en general en una posición correspondiente a la posición 7, 16, 17, 18, 19, 21, 25, 53, 55, 56, 57, 62, 64, 76, 78, 80, 88, 95, 100, 101, 109, 111, 112, 113, 115, 116, 121, 123, 126, 129, 185, 187, 188, 189, 190, 191, 194, 199, 201, 203, 207, 210, 223, 225, 227, 228, 229, 241, 243, 244, 246, 249, 250, 252, 254, 262, 268, 282, 295, 296, 298, 299, 303,

319, 322, 329, 330, 332, 333, 336, 337, 340, 341, 344, 345, 346, 350, 352, 354, 355, 362, 363, 364, 365, 366, 370, 372, 382, 384, 386, 390, 400, 402, 408, 423, 424, 429, 430, 431, en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3. Además, en ejemplos donde se realizan modificaciones en cualquiera de las posiciones 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 22, 23, 27, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 58, 59, 60, 61, 63, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 92, 94, 96, 98, 99, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 110, 114, 117, 118, 119, 122, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 143, 144, 145, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 161, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 186, 192, 193, 195, 197, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 209, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 226, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 238, 239, 240, 242, 245, 247, 248, 251, 253, 255, 256, 257, 258, 260, 261, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 297, 298, 300, 301, 302, 304, 305, 306, 307, 308, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 320, 321, 323, 324, 325, 326, 327, 331, 334, 335, 338, 339, 342, 343, 347, 348, 349, 351, 353, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 367, 368, 369, 371, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 383, 385, 387, 388, 389, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 401, 403, 404, 405, 406, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 419, 420, 422, 425, 426, 427, 428, 431, 432, 434, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444 o 447 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3, la modificación o las modificaciones no son el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos correspondientes expuestas en la Tabla 5 o 10 en el presente documento, que son reemplazos de aminoácidos que dan como resultado un polipéptido inactivo. Por ejemplo, si la modificación es una modificación en una posición correspondiente a la posición 2 en referencia a SEQ ID NO: 3, la modificación no es reemplazo a una histidina (H), lisina (K), triptófano (W) o tirosina (Y).

Se exponen reemplazos de aminoácidos ejemplares en cualquiera de las posiciones correspondientes en la Tabla 3. La referencia a la posición de aminoácido correspondiente en la Tabla 3 es en referencia a las posiciones expuestas en SEQ ID NO: 3. Se entiende que los reemplazos pueden realizarse en la posición correspondiente en otro polipéptido de PH20 mediante alineamiento con el mismo con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3 (véase por ejemplo, Figura 1 y 2), por lo que la posición correspondiente es la posición alineada. En ejemplos particulares, el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos pueden estar en la posición correspondiente en un polipéptido de PH20 como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 u 870 o una variante del mismo que tiene al menos 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 86 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el mismo, siempre que el polipéptido de PH20 modificado resultante muestre al menos 40 % de la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene el reemplazo de aminoácido. En particular, el reemplazo o los reemplazos pueden estar en una posición correspondiente en un polipéptido de PH20 humano, por ejemplo, cualquiera expuesto en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72, o una variante del mismo que muestra al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72. En un ejemplo, uno cualquiera o más de los reemplazos están en SEQ ID NO: 3, siempre que el polipéptido de PH20 modificado resultante muestre al menos 40 % de la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 expuesto en SEQ ID NO: 3.

40

TABLA 3: Mutantes activos

Posición correspondiente	Reemplazo	Posición correspondiente	Reemplazo	Posición correspondiente	Reemplazo
1	ACEFGHKNP QRSTW	2	ACGILPQST V	3	EHLV
4	AISTV	5	H	6	AHKLNR
7	M	8	ILMP	9	KLQRSV
10	DEGHNQRSW	11	DGHKS	12	AEIKLNRST
13	HSTY	14	DIMV	15	AMV
20	S	22	HMTY	23	D
24	AEGHKLMN RTVY	26	AEGHKMPQ RSTVWY	27	ADEFHKLP QRSTW
28	ADEFILMNP RSTW	29	AEGHKLM RSTW	30	AFGHKLM QRSTW
31	ACGHKLP RS TVWY	32	ACFGHKLMN QRSTWY	33	GMPQRSTW
34	AEHKQRW	35	FHLQTVY	36	ADGHKLN R T
37	FIKMPRW	38	Y	39	ALNQRTY
40	LW	41	ACDEGHNTV W	42	A
43	NT	44	E	45	IK
46	ACEFHLMNR STVY	47	ADFGHKM RSTWY	48	FGHIKMN QR SVY
49	IKRSV	50	ACDEHLMQR SVY	51	ANRS
52	NPQRST	54	AFNQS V	58	CGHIKLN P Q RSWY
59	QN	60	K	61	FIMV
63	AHIKLMNRS TVW	65	R	66	HR
67	FLRVY	68	EGHKLPQRS T	69	ACEFGILMP RTWY
70	ACFGHKLN P RSTVY	71	ADGHLMN Q RS	72	ADEHKLM Q RSY
73	ACDGHKLM Q RSTW	74	ACEFGHKLM NPRSVW	75	ACFHLMN Q RSTY
77	HK				
79	LTV	81	P	82	AEGHILMN Q RSTV
83	FGHKLNRSTV	84	DEFGHILMN PQRSTWY	85	V
86	ADEFGHIKL MNPQRSTW	87	ACEGHILMP QRSTVY	89	CKMPRW
90	AEGHKLN Q RSTW	91	AQR	92	CHLMTV

TABLA 3: Mutantes activos

Posición correspondiente	Reemplazo	Posición correspondiente	Reemplazo	Posición correspondiente	Reemplazo
93	DEFGHILMN PQRSTV	94	ACDEFHLMN QRST	96	DLV
97	ACDEFILNP QRSWY	98	ACDEHILMQ RSVW	99	ARS
102	ACEGHKLMN QRSTW				
103	N	104	ACGIKMRST	105	ACGHI PQRS T WV
106	V				
107	FIL	108	G	110	V
114	AGHMS	117	D	118	HKLMNQV
119	FPQY	120	DFGHILNPR STVWY	122	M
124	HLR	125	AHRS	127	AEGHLMNQ RSTVW
128	ACGIK LQRS W	130	IR	131	CEFGHILMQ RSTVY
132	ACEFH I KLN QSTVY	133	I	134	LTV
135	ACDFGHKLN QRSWY	136	ACDFHIMNQ RSTW	137	ACITACHIL MNRSWY
139	A CDEFHKL MRSTV	140	ACDFGHKL MRVWY	141	ADEFGHLM QRSTVWY
142	CDEGH I KLM NPQRST	143	CEGIKLN	144	RTW
145	ACDEGHLMN PR	146	ACEGH I KNP QRSTVY	147	ACDFGILMP QRSVWY
148	CFGH I K LQRS TVWY	149	CGKLMQRST V	150	ACDEFGILN PRSWY
151	ACGHKLMNQ RSTVWY	152	ACFIMRTVW Y	153	ILS
154	IRTV	155	ACDFGHKLM RSTVW	156	ACDGILMQR STVW
157	W	158	AFHQLQS	159	ADEGHLMN QRSV
160	CFGH I KLMN QRSWVY	161	ACDERSV	162	ADEGHLMMP QRSVWY
163	AEGK LQRST VW	164	LMWV	165	ACDFNRSV WY

TABLA 3: Mutantes activos

Posición correspondiente	Reemplazo	Posición correspondiente	Reemplazo	Posición correspondiente	Reemplazo
166	ACEFGHLLNQ RTWY	167	ADGHKMNP RSTY	168	H
169	LRV	170	AQNRV	171	IV
172	AC	173	QNR	174	AGHKMNQR STVWY
175	EHTVY	176	KL	177	V
178	GKMR				
179	ACEGIKLMN PRSTV	180	FGIKM	181	KMQ
182	L	183	EL	184	W
186	Y				
192	ST	193	FGQRSY	195	AGHILNQRS T W V
196	EGLNRSTWY	197	ADEFGHKLM QRSTW	198	ADEHLNQRS T W Y
200	DT	202	M	204	PW
205	LRSTWY	206	HIKLMQRST	208	ACKLMQRS T V
209	AEFGLNRST	211	LW		
212	NST	213	AEGHKLMN QRVWY		
214	Q	215	ADEGHKLM QRTVWY	217	M
218	FMV	219	ACDEHIKLM RSTW	220	ADHILMSTV
221	ACIMQTV	222	DFGIKLNRS V	224	I
226	W				
230	I	231	T	232	S
233	AFGKLY	234	LM	235	AEGHKT
236	AGHKRS	237	ACEFHLNQR STW	238	DEHKQRST
239	N				
240	KAMPQRSV	242	F	245	H
247	ILM	248	AHWY	251	LMY
253	I	255	AGNQRS	256	AHLV
257	ACGIKLMNQ RTV	258	GHNRS	259	EGIKLNQR STWY

TABLA 3: Mutantes activos

Posición correspondiente	Reemplazo	Posición correspondiente	Reemplazo	Posición correspondiente	Reemplazo
260	ADEGHLMQRSY	261	AFKMNQRTVW	263	AHKMRTV
264	AH	265	I	266	Y
267	MT	269	ACDS	270	MNST
271	FGLMSV	272	DMRST	273	HTY
274	AFS				
275	LV	276	CDEGHILMRSY	277	ACDEGHKMNQRSTY
278	AEFGHIKNRSTVY	279	AHQRT	280	GQ
282	DGMQ	283	EPRST	284	AEGHLMNQSTY
285	AFGHMNQY	286	RSW	287	INT
288	LW	289	K	290	290
291	CQRSV	292	ACFGHKNPRTVW	293	ACDFGKLM PQSVY
294	M				
297	A	298	GI	300	R
301	AV	302	IW	303	DV
304	GI	305	DEN	306	DES
307	GKNQSTWY	308	DGKNPRT	309	DEGHKLMN QRSTVW
310	AFGQRSVY	311	GHKQST	312	GKLN
313	AEGHKLPRS TVY	314	ADHINQRSTY	315	AEGHKLMR TY
316	D	317		318	DFGHKLMNQ RST
320	EGHIKLMNR SWVY	321	ADHKRSTY	323	FIL
324	ADHMNRS	325	ADHIKMNQRSTW	326	CKLVY
327	M	328	ADEGHKMN QSVW	331	CEV
334	PT	335	S	338	Q
339	M	342	A	343	TV
347	AEGLMRS	348	DGS	349	AEKMNRT
351	ACIQS	353	TV	356	ADHS
357	ACKST	358	CGLT	359	DEHKMTV
360	T				

TABLA 3: Mutantes activos

Posición correspondiente	Reemplazo	Posición correspondiente	Reemplazo	Posición correspondiente	Reemplazo
361	H	367	ACGKRS	368	A E G H K L M R S T V H R S
371	E F G H I K L M R S V	373	A E F K L M R S V	374	A H I M N P R S T V W Y
375	A G I K L M N R S T	376	A D E L M Q R S T V Y	377	D E H K P R S T
378	K N R	379	G H R S T	380	I L P T V W Y
381	E H K N Q R S V	383		385	A G H N Q R S T V
387	S	388	F H I M R T V W Y	389	A G H K L M P Q R S T Y
391	C	392	A F G K L M Q R S T V W Y	393	A D F H K L M N R S T
394	L W	395	A G H K R T W	396	A D H L Q R S T
397	R	398	L		
399	A C E K M N Q R S T V W	401	A E G Q N	403	F
404	A P T	405	A F G K M P Q R S W Y	406	A C E F G I N Q S T V Y
407	A D E F G H L M N P Q R V W	409	A D E G H I P Q R S T V	410	D K M N P Q R S T V Y
411	A H N P R S T V	412	D G H I L N Q P R S V W Y	413	A E H K N Q R S T
414	I K L M	415	G S W V Y	416	F G H I K L N Q R T V Y
417	I	418	A E F G I L M N P Q R S V Y	419	E F G H I K L N R S W Y
420	I P	421	A E G H I K L M N Q R S T Y	422	I T
425	G I K M N R S Y	426	E G K N P Q S Y	427	H I K Q S T
428	L M P T	431	A E G H I K L N Q R S V W Y	432	E G H N S V
433	A C D E G H I K L P R S T V W	434	F G I M V	435	A C E G H R S T V Y
436	C D E G H I K L M Q R S T W Y	437	A D G H I K L M Q R S Y	438	A C D E G L N P Q R S T V W

TABLA 3: Mutantes activos

Posición correspondiente	Reemplazo	Posición correspondiente	Reemplazo	Posición correspondiente	Reemplazo
439	ACFGHKLPQ STVW	440	ADEFGHILM PRSVY	441	ADFGHKLN QSTVY
442	CGHKLPQRT VWY	443	ADEFGHLMNQ RSTW	444	DEFGHIKMN RVWY
445	AGHLMNPQR STVWY	446	ACDEGHIKL MQRVW	447	DEFGILMNP QRTVW

En ejemplos particulares, se describe en el presente documento un polipéptido de PH20 modificado que contiene un reemplazo o reemplazos de aminoácidos en una posición o posiciones correspondientes a 1, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 58, 59, 63, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 79, 82, 83, 84, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 94, 97, 102, 104, 107, 114, 118, 120, 127, 128, 130, 131, 132, 135, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 155, 156, 158, 160, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 169, 170, 172, 173, 174, 175, 178, 179, 193, 195, 196, 198, 204, 205, 206, 209, 212, 213, 215, 219, 220, 221, 222, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 240, 247, 248, 249, 257, 258, 259, 260, 261, 263, 267, 269, 271, 272, 273, 274, 276, 277, 278, 279, 282, 283, 285, 287, 289, 291, 292, 293, 298, 305, 307, 308, 309, 310, 313, 314, 315, 317, 318, 320, 321, 324, 325, 326, 328, 335, 347, 349, 351, 353, 356, 359, 367, 368, 369, 371, 373, 374, 375, 376, 377, 380, 381, 383, 385, 389, 392, 393, 395, 396, 399, 401, 404, 405, 406, 407, 409, 410, 412, 416, 418, 419, 421, 425, 427, 428, 431, 433, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446 o 447 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, las posiciones de aminoácidos pueden ser reemplazos en posiciones correspondientes a reemplazo de Leucina (L) en la posición 1 (L1), P6, V7, I9, P10, N11, V12, F14, L15, A20, S22, F24, L26, G27, K28, F29, D30, E31, P32, L33, D34, M35, S36, L37, F38, S39, F40, I41, I46, N47, A48, T49, G50, G52, V58, D59, Y63, I67, D68, S69, I70, T71, G72, V73, T74, V75, I79, K82, I83, S84, G86, D87, L89, D90, A92, K93, K94, T97, V102, N104, M107, E114, T118, A120, D127, V128, K130, N131, R132, E135, Q138, Q139, Q140, N141, V142, Q143, L144, L146, T147, E148, A149, T150, E151, K152, Q155, E156, E158, A160, K162, D163, F164, L165, V166, E167, I169, K170, G172, K173, L174, L175, N178, H179, H193, K195, K196, G198, F204, N205, V206, K209, D212, D213, S215, N219, E220, S221, T222, T232, Q233, Q234, S235, P236, V237, A238, T240, V247, R248, E249, P257, D258, A259, K260, S261, L263, A267, T269, I271, V272, F273, T274, Q276, V277, L278, K279, S282, Q283, E285, V287, T289, G291, E292, T293, A298, G305, L307, S308, I309, M310, M313, K314, S315, L317, L318, D320, N321, E324, T325, I326, N328, T335, Q347, Q349, V351, I353, N356, S359, P367, D368, N369, A371, Q373, L374, E375, K376, G377, F380, T381, R383, K385, E389, E392, Q393, S395, E396, Y399, S401, S404, T405, L406, S407, K409, E410, A412, D416, D418, A419, D421, A425, G427, A428, D431, F433, P436, P437, M438, E439, T440, E441, E442, P443, Q444, I445, F446 o Y447 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3.

Los reemplazos de aminoácidos ejemplares en los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, reemplazo con: histidina (H) en una posición correspondiente a la posición 1; A en una posición correspondiente a la posición 1; E en una posición correspondiente a la posición 1; G en una posición correspondiente a la posición 1; K en una posición correspondiente a la posición 1; Q en una posición correspondiente a la posición 1; R en una posición correspondiente a la posición 1; A en una posición correspondiente a la posición 6; M en una posición correspondiente a la posición 8; Q en una posición correspondiente a la posición 9; G en una posición correspondiente a la posición 10; H en una posición correspondiente a la posición 10; S en una posición correspondiente a la posición 11; E en una posición correspondiente a la posición 12; I en una posición correspondiente a la posición 12; K en una posición correspondiente a la posición 12; T en una posición correspondiente a la posición 12; V en una posición correspondiente a la posición 14; V en una posición correspondiente a la posición 15; M en una posición correspondiente a la posición 15; S en una posición correspondiente a la posición 20; T en una posición correspondiente a la posición 22; E en una posición correspondiente a la posición 24; H en una posición correspondiente a la posición 24; R en una posición correspondiente a la posición 24; A en una posición correspondiente a la posición 26; E en una posición correspondiente a la posición 26; K en una posición correspondiente a la posición 26; M en una posición correspondiente a la posición 26; Q en una posición correspondiente a la posición 26; R en una posición correspondiente a la posición 26; D en una posición correspondiente a la posición 27; K en una posición correspondiente a la posición 27; R en una posición correspondiente a la posición 27; R en una posición correspondiente a la posición 28; E en una posición correspondiente a la posición 29; I en una posición correspondiente a la posición 29; K en una posición correspondiente a la posición 29; L en una posición correspondiente a la posición 29; M en una posición correspondiente a la posición 29; P en una posición correspondiente a la posición 29; R en una posición correspondiente a la posición 29; S en una posición correspondiente a la posición 29; T en una posición correspondiente a la posición 29; V en una posición correspondiente a la posición 29; G en una posición correspondiente a la posición 30; H en una posición correspondiente a la posición 30; K en una posición correspondiente a la posición 30; L en una posición correspondiente a la posición 30; M en una posición correspondiente a la posición 30; R en una posición correspondiente a la posición 30; S en una posición correspondiente a la posición 30; A en una posición correspondiente a la posición 31; C en una posición correspondiente a la posición 31; G en una posición correspondiente a la posición 31; H en una posición correspondiente a la posición 31; I en una posición correspondiente a la posición 31; K en una posición correspondiente a la posición 31; L en una posición correspondiente a la posición 31; P en una posición correspondiente a la posición 31; R en una posición correspondiente a la posición 31; S en una posición correspondiente a la posición 31; T en una posición correspondiente a la posición 31; V en una posición correspondiente a la posición 31; W en una posición correspondiente a la posición 31; C en una posición correspondiente a la posición 32; F en una posición correspondiente a la posición 32; G en una posición correspondiente a la posición 32; H en una posición correspondiente a la posición 32; W en una posición correspondiente a la posición 32; G en una posición correspondiente a la posición 33; W en una posición correspondiente a la posición 33; G en una posición correspondiente a la posición 33; W en una posición correspondiente a la posición 33; W en una posición correspondiente a la posición 33; Q en una posición correspondiente a la posición 35; V en una posición correspondiente a la posición 34; H en una posición correspondiente a la posición 35; H en una posición correspondiente a la posición 36; N en una posición correspondiente a la posición 35;

correspondiente a la posición 439; C en una posición correspondiente a la posición 439; K en una posición correspondiente a la posición 439; P en una posición correspondiente a la posición 439; Q en una posición correspondiente a la posición 439; T en una posición correspondiente a la posición 439; V en una posición correspondiente a la posición 439; D en una posición correspondiente a la posición 440; H en una posición correspondiente a la posición 440; M en una posición correspondiente a la posición 440; P en una posición correspondiente a la posición 440; R en una posición correspondiente a la posición 440; S en una posición correspondiente a la posición 440; A en una posición correspondiente a la posición 441; F en una posición correspondiente a la posición 441; C en una posición correspondiente a la posición 442; G en una posición correspondiente a la posición 442; R en una posición correspondiente a la posición 442; A en una posición correspondiente a la posición 443; E en una posición correspondiente a la posición 443; F en una posición correspondiente a la posición 443; G en una posición correspondiente a la posición 443; M en una posición correspondiente a la posición 443; N en una posición correspondiente a la posición 443; E en una posición correspondiente a la posición 444; H en una posición correspondiente a la posición 444; V en una posición correspondiente a la posición 444; H en una posición correspondiente a la posición 445; M en una posición correspondiente a la posición 445; N en una posición correspondiente a la posición 445; P en una posición correspondiente a la posición 445; Q en una posición correspondiente a la posición 445; S en una posición correspondiente a la posición 445; T en una posición correspondiente a la posición 445; V en una posición correspondiente a la posición 445; W en una posición correspondiente a la posición 445; A en una posición correspondiente a la posición 446; M en una posición correspondiente a la posición 446; W en una posición correspondiente a la posición 446; D en una posición correspondiente a la posición 447; E en una posición correspondiente a la posición 447; G en una posición correspondiente a la posición 447; I en una posición correspondiente a la posición 447; N en una posición correspondiente a la posición 447; P en una posición correspondiente a la posición 447; Q en una posición correspondiente a la posición 447; T en una posición correspondiente a la posición 447, y/o reemplazo con V en una posición correspondiente a la posición 447, cada una en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3.

Son ejemplos de dichos polipéptidos de PH20 modificados cualquiera que tenga la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 74-855, o que tenga una secuencia de aminoácidos que muestre al menos 68 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-855 y contenga el reemplazo de aminoácido y muestre actividad hialuronidasa.

Cualquiera de los polipéptidos de PH20 modificados anteriores descritos en el presente documento pueden mostrar propiedades o actividades alteradas, tales como mejoradas o aumentadas, en comparación con el polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene la modificación de aminoácido (por ejemplo, reemplazo de aminoácido). Por ejemplo, las actividades o propiedades alteradas pueden ser una actividad catalítica aumentada y/o una estabilidad aumentada en condiciones desnaturalizantes.

a. Actividad aumentada

Se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 modificados o variantes que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de PH20 y que muestran actividad hialuronidasa aumentada en comparación con el polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos, por ejemplo, el polipéptido de PH20 expuesto en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 u 870 o una variante del mismo que tiene al menos 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 86 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el mismo. En particular, los polipéptidos de PH20 modificados o variantes descritos en el presente documento muestran actividad hialuronidasa aumentada en comparación con el polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene el reemplazo de aminoácidos, por ejemplo, el polipéptido de PH20 expuesto en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72 y en particular el polipéptido de PH20 expuesto en SEQ ID NO: 3.

El polipéptido de PH20 modificado puede mostrar actividad hialuronidasa que es al menos o aproximadamente al menos o 120 %, 130 %, 135 %, 140 %, 145 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 500 %, 1500 %, 2000 %, 3000 %, 4000 %, 5000 % de la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos, por ejemplo, el polipéptido de PH20 expuesto en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 u 870 o una variante del mismo, en las mismas condiciones. Por ejemplo, la actividad hialuronidasa aumenta al menos o aproximadamente al menos 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces o más.

En ejemplos particulares, los polipéptidos de PH20 modificados contienen un reemplazo de aminoácido en una o más posiciones de aminoácidos identificadas como asociadas con actividad hialuronidasa aumentada. Como se describe en el presente documento, tales posiciones se han identificado usando mutagénesis y métodos de selección o exploración para identificar las posiciones que dan como resultado actividad hialuronidasa aumentada. El polipéptido de PH20 también puede contener otras modificaciones, tales como otros reemplazos de aminoácidos,

- que solos no están asociados con actividad aumentada siempre que el polipéptido de PH20 modificado resultante muestre actividad hialuronidasa aumentada en comparación con la PH20 que no contiene la modificación o las modificaciones de aminoácidos, tales como reemplazo o reemplazos de aminoácidos. El polipéptido de PH20 modificado descrito en el presente documento puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, o más reemplazos de aminoácidos. También pueden incluirse modificaciones adicionales, tales como inserciones o supresiones. El reemplazo de aminoácidos puede ser en un polipéptido de PH20 como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 u 870 o una variante del mismo que tiene al menos 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 86 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el mismo. Por ejemplo, el reemplazo o los reemplazos pueden estar en un polipéptido de PH20 humano, por ejemplo, cualquiera expuesto en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72 o una variante del mismo.
- 15 Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento contienen un reemplazo de aminoácido (sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones 1, 12, 15, 24, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 39, 46, 48, 52, 58, 63, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 84, 86, 87, 92, 93, 94, 97, 118, 120, 127, 131, 135, 141, 142, 147, 148, 150, 151, 152, 155, 156, 163, 164, 165, 166, 169, 170, 174, 198, 206, 209, 212, 213, 215, 219, 233, 234, 236, 238, 247, 257, 259, 260, 261, 263, 269, 271, 272, 276, 277, 278, 282, 291, 293, 305, 308, 309, 310, 313, 315, 317, 318, 320, 324, 325, 326, 328, 347, 353, 359, 371, 377, 380, 389, 392, 395, 399, 405, 407, 409, 410, 418, 419, 421, 425, 431, 433, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 445, 446 o 447 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, las posiciones de aminoácidos pueden ser reemplazos en posiciones correspondientes al reemplazo de Leucina (L) en la posición 1 (L1), V12, L15, F24, L26, G27, F29, D30, E31, P32, L33, L37, S39, I46, A48, G52, V58, Y63, I67, D68, S69, I70, T71, G72, V73, T74, V75, S84, G86, D87, A92, K93, K94, T97, T118, A120, D127, N131, E135, N141, V142, T147, E148, T150, E151, K152, Q155, E156, D163, F164, L165, V166, I169, K170, L174, G198, V206, K209, D212, D213, S215, N219, Q233, Q234, P236, A238, V247, P257, A259, K260, S261, L263, T269, I271, V272, Q276, V277, L278, S282, G291, T293, G305, S308, I309, M310, M313, S315, L317, L318, D320, E324, T325, I326, N328, Q347, I353, S359, A371, G377, F380, E389, E392, S395, Y399, T405, S407, K409, E410, D418, A419, D421, A425, D431, F433, P436, P437, M438, E439, T440, E441, E442, P443, I445, F446 o Y447 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3. Son ejemplos de dichos polipéptidos de PH20 modificados los polipéptidos que muestran al menos 1,5 veces o más la actividad del polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene el reemplazo de aminoácido.
- 35 Los ejemplos de reemplazos de aminoácidos en los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, reemplazos: con histidina (H) en una posición correspondiente a la posición 1; Q en una posición correspondiente a la posición 1; E en una posición correspondiente a la posición 12; T en una posición correspondiente a la posición 12; V en una posición correspondiente a la posición 15; E en una posición correspondiente a la posición 24; H en una posición correspondiente a la posición 24; E en una posición correspondiente a la posición 26; K en una posición correspondiente a la posición 26; K en una posición correspondiente a la posición 27; R en una posición correspondiente a la posición 27; E en una posición correspondiente a la posición 29; I en una posición correspondiente a la posición 29; L en una posición correspondiente a la posición 29; M en una posición correspondiente a la posición 29; P en una posición correspondiente a la posición 29; S en una posición correspondiente a la posición 29; V en una posición correspondiente a la posición 29; G en una posición correspondiente a la posición 30; H en una posición correspondiente a la posición 30; K en una posición correspondiente a la posición 30; M en una posición correspondiente a la posición 30; R en una posición correspondiente a la posición 30; S en una posición correspondiente a la posición 30; A en una posición correspondiente a la posición 31; C en una posición correspondiente a la posición 31; H en una posición correspondiente a la posición 31; I en una posición correspondiente a la posición 31; K en una posición correspondiente a la posición 31; L en una posición correspondiente a la posición 31; P en una posición correspondiente a la posición 31; R en una posición correspondiente a la posición 31; S en una posición correspondiente a la posición 31; T en una posición correspondiente a la posición 31; V en una posición correspondiente a la posición 31; F en una posición correspondiente a la posición 32; G en una posición correspondiente a la posición 32; H en una posición correspondiente a la posición 32; W en una posición correspondiente a la posición 33; F en una posición correspondiente a la posición 37; N en una posición correspondiente a la posición 39; T en una posición correspondiente a la posición 39; R en una posición correspondiente a la posición 46; F en una posición correspondiente a la posición 48; H en una posición correspondiente a la posición 48; N en una posición correspondiente a la posición 48; Q en una posición correspondiente a la posición 52; K en una posición correspondiente a la posición 58; Q en una posición correspondiente a la posición 58; W en una posición correspondiente a la posición 63; V en una posición correspondiente a la posición 67; H en una posición correspondiente a la posición 68; Q en una posición correspondiente a la posición 68; A en una posición correspondiente a la posición 69; C en una posición correspondiente a la posición 69; F en una posición correspondiente a la posición 69; G en una posición correspondiente a la posición 69; I en una posición correspondiente a la posición 69; L en una posición correspondiente a la posición 69; M en una posición correspondiente a la posición 69; P en una posición correspondiente a la posición 69; R en una posición correspondiente a la posición 69;

correspondiente a la posición 278; Y en una posición correspondiente a la posición 278; M en una posición
 correspondiente a la posición 282; V en una posición correspondiente a la posición 291; A en una posición
 correspondiente a la posición 293; C en una posición correspondiente a la posición 293; F en una posición
 correspondiente a la posición 293; M en una posición correspondiente a la posición 293; P en una posición
 5 correspondiente a la posición 293; Q en una posición correspondiente a la posición 293; V en una posición
 correspondiente a la posición 293; E en una posición correspondiente a la posición 305; G en una posición
 correspondiente a la posición 308; N en una posición correspondiente a la posición 308; E en una posición
 correspondiente a la posición 309; L en una posición correspondiente a la posición 309; N en una posición
 correspondiente a la posición 309; Q en una posición correspondiente a la posición 309; R en una posición
 10 correspondiente a la posición 309; T en una posición correspondiente a la posición 309; A en una posición
 correspondiente a la posición 310; G en una posición correspondiente a la posición 310; K en una posición
 correspondiente a la posición 313; R en una posición correspondiente a la posición 313; H en una posición
 correspondiente a la posición 315; I en una posición correspondiente a la posición 317; K en una posición
 correspondiente a la posición 317; R en una posición correspondiente a la posición 317; M en una posición
 15 correspondiente a la posición 318; H en una posición correspondiente a la posición 320; K en una posición
 correspondiente a la posición 320; R en una posición correspondiente a la posición 320; R en una posición
 correspondiente a la posición 324; A en una posición correspondiente a la posición 325; D en una posición
 correspondiente a la posición 325; E en una posición correspondiente a la posición 325; G en una posición
 correspondiente a la posición 325; H en una posición correspondiente a la posición 325; K en una posición
 20 correspondiente a la posición 325; M en una posición correspondiente a la posición 325; N en una posición
 correspondiente a la posición 325; Q en una posición correspondiente a la posición 325; S en una posición
 correspondiente a la posición 325; V en una posición correspondiente a la posición 326; I en una posición
 correspondiente a la posición 328; K en una posición correspondiente a la posición 328; L en una posición
 correspondiente a la posición 328; S en una posición correspondiente a la posición 328; Y en una posición
 25 correspondiente a la posición 328; G en una posición correspondiente a la posición 347; S en una posición
 correspondiente a la posición 347; V en una posición correspondiente a la posición 353; con T en una posición
 correspondiente a la posición 359; R en una posición correspondiente a la posición 371; P en una posición
 correspondiente a la posición 377; T en una posición correspondiente a la posición 377; W en una posición
 correspondiente a la posición 380; Y en una posición correspondiente a la posición 380; K en una posición
 30 correspondiente a la posición 389; M en una posición correspondiente a la posición 392; R en una posición
 correspondiente a la posición 395; M en una posición correspondiente a la posición 399; T en una posición
 correspondiente a la posición 399; W en una posición correspondiente a la posición 399; G en una posición
 correspondiente a la posición 405; D en una posición correspondiente a la posición 407; Q en una posición
 correspondiente a la posición 407; A en una posición correspondiente a la posición 409; Q en una posición
 35 correspondiente a la posición 409; T en una posición correspondiente a la posición 410; P en una posición
 correspondiente a la posición 418; F en una posición correspondiente a la posición 419; I en una posición
 correspondiente a la posición 419; K en una posición correspondiente a la posición 419; R en una posición
 correspondiente a la posición 419; S en una posición correspondiente a la posición 419; H en una posición
 correspondiente a la posición 421; K en una posición correspondiente a la posición 421; N en una posición
 40 correspondiente a la posición 421; Q en una posición correspondiente a la posición 421; R en una posición
 correspondiente a la posición 421; S en una posición correspondiente a la posición 421; K en una posición
 correspondiente a la posición 425; A en una posición correspondiente a la posición 431; H en una posición
 correspondiente a la posición 431; K en una posición correspondiente a la posición 431; Q en una posición
 correspondiente a la posición 431; R en una posición correspondiente a la posición 431; S en una posición
 45 correspondiente a la posición 431; V en una posición correspondiente a la posición 431; L en una posición
 correspondiente a la posición 433; R en una posición correspondiente a la posición 433; T en una posición
 correspondiente a la posición 433; V en una posición correspondiente a la posición 433; K en una posición
 correspondiente a la posición 436; I en una posición correspondiente a la posición 437; M en una posición
 correspondiente a la posición 437; T en una posición correspondiente a la posición 438; V en una posición
 50 correspondiente a la posición 439; H en una posición correspondiente a la posición 440; R en una posición
 correspondiente a la posición 440; F en una posición correspondiente a la posición 441; R en una posición
 correspondiente a la posición 442; A en una posición correspondiente a la posición 443; M en una posición
 correspondiente a la posición 443; M en una posición correspondiente a la posición 445; P en una posición
 correspondiente a la posición 445; A en una posición correspondiente a la posición 446; D en una posición
 55 correspondiente a la posición 447; N en una posición correspondiente a la posición 447; y/o con Q en una posición
 correspondiente a la posición 447, cada uno en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID
 NO: 3. Los polipéptidos de PH20 modificados pueden contener una cualquiera o más de las sustituciones de
 aminoácidos enumeradas, en cualquier combinación, con o sin modificaciones adicionales, siempre que el
 polipéptido de PH20 muestre actividad hialuronidasa, tal como actividad hialuronidasa aumentada en comparación
 60 del polipéptido de PH20 que no contiene la modificación o las modificaciones, por ejemplo, actividad hialuronidasa
 aumentada al menos 1,5 veces.

En algunos ejemplos, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento contienen uno o
 65 más reemplazos de aminoácidos en una posición o posiciones correspondientes a la posición o posiciones 24, 29,
 31, 48, 58, 69, 70, 75, 84, 97, 165, 166, 271, 278, 317, 320, 325 y/o 326 en referencia a las posiciones expuestas en
 SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, los reemplazos de aminoácidos ejemplares incluyen, pero sin limitación, reemplazo con:

E en la posición correspondiente a la posición 24; E en una posición correspondiente a la posición 29; V en una posición correspondiente a la posición 31; N en una posición correspondiente a la posición 48; K en una posición correspondiente a la posición 58; Q en una posición correspondiente a la posición 58; A en una posición correspondiente a la posición 69; F en una posición correspondiente a la posición 69; G en una posición correspondiente a la posición 69; P en una posición correspondiente a la posición 69; R en una posición correspondiente a la posición 69; A en una posición correspondiente a la posición 70; F en una posición correspondiente a la posición 70; G en una posición correspondiente a la posición 70; H en una posición correspondiente a la posición 70; N en una posición correspondiente a la posición 70; R en una posición correspondiente a la posición 70; T en una posición correspondiente a la posición 70; V en una posición correspondiente a la posición 70; L en una posición correspondiente a la posición 75; T en una posición correspondiente a la posición 75; G en una posición correspondiente a la posición 84; G en una posición correspondiente a la posición 97; D en una posición correspondiente a la posición 165; L en una posición correspondiente a la posición 166; R en una posición correspondiente a la posición 166; T en una posición correspondiente a la posición 166; L en una posición correspondiente a la posición 271; H en una posición correspondiente a la posición 278; R en una posición correspondiente a la posición 278; K en una posición correspondiente a la posición 317; K en una posición correspondiente a la posición 320; E en una posición correspondiente a la posición 325, con G en una posición correspondiente a la posición 325; K en una posición correspondiente a la posición 325; N en una posición correspondiente a la posición 325; Q en una posición correspondiente a la posición 325; V en una posición correspondiente a la posición 326; cada uno con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3. Los polipéptidos de PH20 modificados pueden contener una cualquiera o más de las sustituciones de aminoácidos enumeradas, en cualquier combinación, con o sin modificaciones adicionales, siempre que el polipéptido de PH20 muestre actividad hialuronidasa, tal como actividad hialuronidasa aumentada en comparación con el polipéptido de PH20 que no contiene la modificación o las modificaciones, por ejemplo, actividad hialuronidasa aumentada al menos 2,0 veces.

Los polipéptidos de PH20 modificados ejemplares que muestran actividad aumentada en comparación con el polipéptido de PH20 no modificado (por ejemplo, expuesto en SEQ ID NO: 3) son cualquiera que tenga la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 73, 78, 86, 89, 91, 95, 96, 99, 100, 105, 106, 108, 109, 111, 112, 113, 115, 117, 118, 119, 120, 123-126, 128-136, 139-141, 149, 154, 155, 159, 164, 165, 167, 173, 178, 181, 191-193, 195-197, 199-205, 207-221, 225, 226, 228, 229, 231, 233, 237-239, 242, 247-254, 256, 257, 267, 269, 270, 277, 283, 293, 295, 296, 298, 300, 303, 308, 316, 318, 321, 322, 324, 325, 330, 334, 335, 338-340, 344, 348, 355, 367, 369, 371, 377, 384-388, 394, 398, 399, 401, 406-408, 410, 412, 414, 416, 419, 421-426, 428, 430, 431, 435, 448, 455, 456, 459, 462, 463, 465, 469, 478-480, 482, 484, 490, 493, 497, 501, 503, 505, 506-508, 510-512, 514, 518, 522, 523, 527, 531, 533, 537-543, 545, 551, 558, 559, 561, 563-566, 569, 572, 574, 576, 579, 581-583, 585, 587, 588, 594, 596, 602, 605, 606, 609, 613, 618-620, 624-634, 637, 640-644, 647, 648, 652, 657, 675, 695, 698, 699, 700, 712, 717, 725, 731, 732, 734, 738, 742, 746, 748-750, 757, 760, 762-765, 768-773, 775, 779, 782, 783, 786-789, 794-797, 799-801, 807, 814, 816, 819, 822, 825, 826, 830, 836, 838, 844, 847, 851, 853 o que tenga una secuencia de aminoácidos que muestre al menos 68 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 73, 78, 86, 89, 91, 95, 96, 99, 100, 105, 106, 108, 109, 111, 112, 113, 115, 117, 118, 119, 120, 123-126, 128-136, 139-141, 149, 154, 155, 159, 164, 165, 167, 173, 178, 181, 191-193, 195-197, 199-205, 207-221, 225, 226, 228, 229, 231, 233, 237-239, 242, 247-254, 256, 257, 267, 269, 270, 277, 283, 293, 295, 296, 298, 300, 303, 308, 316, 318, 321, 322, 324, 325, 330, 334, 335, 338-340, 344, 348, 355, 367, 369, 371, 377, 384-388, 394, 398, 399, 401, 406-408, 410, 412, 414, 416, 419, 421-426, 428, 430, 431, 435, 448, 455, 456, 459, 462, 463, 465, 469, 478-480, 482, 484, 490, 493, 497, 501, 503, 505, 506-508, 510-512, 514, 518, 522, 523, 527, 531, 533, 537-543, 545, 551, 558, 559, 561, 563-566, 569, 572, 574, 576, 579, 581-583, 585, 587, 588, 594, 596, 602, 605, 606, 609, 613, 618-620, 624-634, 637, 640-644, 647, 648, 652, 657, 675, 695, 698, 699, 700, 712, 717, 725, 731, 732, 734, 738, 742, 746, 748-750, 757, 760, 762-765, 768-773, 775, 779, 782, 783, 786-789, 794-797, 799-801, 807, 814, 816, 819, 822, 825, 826, 830, 836, 838, 844, 847, 851, 853 y contiene el reemplazo de aminoácido y muestra actividad hialuronidasa aumentada en comparación con el polipéptido no modificado correspondiente.

b. Estabilidad aumentada

Se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 que muestran estabilidad aumentada. En particular, los polipéptidos de PH20 muestran estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro*. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 pueden mostrar estabilidad aumentada en diversas condiciones de almacenamiento. Los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento que muestran presentación de estabilidad aumentada, entre otros parámetros, resistencia aumentada a condiciones de desnaturalización, incluyendo pero sin limitación, condiciones de desnaturalización provocadas por temperatura (por ejemplo, temperatura elevada tal como calor), agitación, sal baja o ausente, y/o presencia de excipientes. Los excipientes ejemplares incluyen, pero sin limitación, antiadherentes, aglutinantes, recubrimientos, cargas y diluyentes, saporíferos, colorantes, lubricantes, emolientes, conservantes, sorbentes o edulcorantes. Por ejemplo, diversos excipientes, tales como conservantes, pueden actuar como agentes desnaturalizantes de proteínas. Los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento que muestran estabilidad proteica aumentada muestran agregación reducida, precipitación reducida y/o actividad aumentada cuando se exponen a una condición de desnaturalización en comparación con la PH20

correspondiente que no contiene el reemplazo de aminoácido. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento muestran al menos o al menos aproximadamente o 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 % o más actividad aumentada cuando se exponen a una condición de desnaturalización en comparación con el polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene el reemplazo de aminoácido cuando se expone a la misma condición de desnaturalización.

Los polipéptidos de PH20 descritos en el presente documento que muestran estabilidad aumentada son polipéptidos de PH20 modificados o variantes que contienen un reemplazo (sustitución), supresión o inserción de aminoácidos u otra modificación. Típicamente, los polipéptidos de PH20 descritos en el presente documento que muestran estabilidad aumentada contienen uno o más reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de PH20 en comparación con el polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos, por ejemplo, el polipéptido de PH20 expuesto en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 u 870 o una variante del mismo que tiene al menos 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el mismo. En particular, los polipéptidos de PH20 modificados o variantes descritos en el presente documento muestran estabilidad aumentada en comparación con el polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene el reemplazo de aminoácido, por ejemplo, el polipéptido de PH20 expuesto en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 66, 69 o 72 y en particular el polipéptido de PH20 expuesto en la SEQ ID NO: 3.

En los ejemplos particulares, los polipéptidos de PH20 modificados contienen un reemplazo de aminoácido en una o más posiciones de aminoácidos identificadas como asociadas con estabilidad aumentada. Como se describe en el presente documento, dichas posiciones pueden identificarse usando mutagénesis sin selección o métodos de exploración para identificar las posiciones que dan como resultado estabilidad (por ejemplo, actividad aumentada) del polipéptido en comparación con la PH20 correspondiente que no contiene la modificación tras exposición a una o más condiciones de desnaturalización. El polipéptido de PH20 puede contener otras modificaciones, tales como otros reemplazos de aminoácidos, que por sí solas no están asociadas con la provisión de estabilidad, siempre que el polipéptido de PH20 modificado resultante muestre estabilidad aumentada en una o más condiciones de desnaturalización en comparación con la PH20 que no contiene la modificación o las modificaciones de aminoácidos, tales como el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos, y muestra actividad hialuronidasa. El polipéptido de PH20 modificado descrito en el presente documento puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 o más reemplazos de aminoácidos. También pueden incluirse modificaciones adicionales, tales como inserciones o supresiones. El reemplazo de aminoácido puede ser en un polipéptido de PH20 como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 u 870 o una variante del mismo que tiene al menos 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 82 %, 85 %, 86 %, 86 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con el mismo. Por ejemplo, los reemplazos pueden ser en un polipéptido de PH20 humano, por ejemplo, cualquiera expuesto en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72 o una variante del mismo.

Son ejemplos de polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento polipéptidos de PH20 que muestran estabilidad aumentada tras exposición a compuestos de fenol, alta temperatura (calor) y/o ausencia de NaCl.

i. Fenófilos

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de PH20 modificados que muestran estabilidad aumentada en presencia de compuestos fenólicos. Las formulaciones multidosis deben contener conservantes antimicrobianos para protegerlos de contaminación microbiana. Para productos farmacológicos parenterales, incluyendo insulina y otros agentes terapéuticos, los conservantes más comunes son compuestos fenólicos, tales como fenol, metacresol (m-cresol), alcohol bencílico y parabenos incluyendo metilparabeno y propilparabeno. Los conservantes típicamente deben estar presentes a suficientes concentraciones para satisfacer las normas reguladoras. Por ejemplo, los requisitos reguladores afirman que la eficacia antimicrobiana de la formulación debe satisfacer los requisitos de ensayo de eficacia conservante (PET) de los mercados diana. En la actualidad diferentes agencias reguladoras tienen diferentes criterios de farmacopea con respecto a eficacia antimicrobiana para productos farmacéuticos diseñados para dosificación múltiple. Los requisitos de PET de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) y de la Farmacopea Europea (EP) difieren considerablemente, imponiendo restricciones adicionales en el desarrollo de formulaciones multidosis. La Tabla 4 muestra los criterios para que fármacos inyectables cumplan los criterios de USP y EP. Típicamente, las formulaciones que cumplen los requisitos antimicrobianos de EP (EPA o EPB) contienen más conservante que las formuladas solamente para cumplir los requisitos antimicrobianos de USP.

Tabla 4. Requisitos de USP y EP para ensayo de la eficacia antimicrobiana

Requisito	Punto temporal	Estados Unidos	Europa	
		USP	EPB (Mínimo)	EPA (Preferido)
Reducción Logarítmica Bacteriana*	6 h			2
	24 h		1	3
	7 d	1,0	3	Sin recuperación
	14 d	3,0	Sin aumento	Sin recuperación
	28 d	Sin aumento	Sin aumento	Sin recuperación
Reducción Logarítmica Fúngica*	7 d	Sin aumento		2
	14 d	Sin aumento	1	Sin aumento
	28 d	Sin aumento	Sin aumento	Sin aumento

* Reducción de unidad log₁₀ desde el inóculo medido inicial; sin aumento: aumento de no más de 0,5 unidades log₁₀ con respecto al valor previamente medido.

Los conservantes antimicrobianos pueden interaccionar con proteínas que dan como resultado agregaciones y efectos negativos en la estabilidad. Por lo tanto, aunque son un componente necesario, los conservantes plantean un problema significativo en el desarrollo de formulaciones de proteínas estables, multidosis, porque típicamente inducen agregación de la proteína en solución acuosa. En particular, cantidades crecientes o altas de conservantes pueden influir negativamente en la estabilidad de una proteína, incluyendo efectos sobre la estabilidad física (agregación o precipitación) que pueden influir en la actividad proteica. Por ejemplo, para cumplir los requisitos de eficacia conservativa EP, pueden requerirse cantidades relativamente altas de compuestos fenólicos, tales como fenol o m-cresol, que pueden influir en la estabilidad de la formulación proteica. Por ejemplo, se ha mostrado que conservantes tales como fenol, m-cresol y alcohol bencílico inducen agregación de hormona del crecimiento humana (Maa y Hsu (1996) *Int. J. Pharm.* 140: 155-168), receptor de interleucina 1 recombinante (Remmele (1998) *Pharm. Res.* 15: 200-208), factor de crecimiento de tipo insulina humana I (Fransson (1997) *Pharm. Res.* 14: 606-612), rIFN- γ (Lam (1997) *Pharm. Res.* 14:725-729) y citocromo c (Singh *et al.*, (2011) *J. Pharm. Sci.*, 100: 1679-89). El efecto desestabilizante que los conservantes tienen en proteínas en solución ha sido un factor limitante en el desarrollo de formulaciones multidosis, y, hasta la fecha, la mayoría de los productos terapéuticos proteicos se han formulado solo para uso individual.

La hialuronidasa PH20, tal como rHuPH20, pierde rápidamente actividad en presencia de conservantes, probablemente debido al desplegamiento de la proteína y posterior formación de agregados. Por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos del presente documento, los conservantes reducen la actividad enzimática de PH20, particularmente a temperaturas elevadas (véase también Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 61/520.962 y Solicitudes de Estados Unidos n.º 13/507.263 y 13/507.262). Por ejemplo, después de incubación con m-cresol al 0,4 % durante 4 horas, PH20 (por ejemplo, rHuPH20) conserva solamente aproximadamente el 10 % de su actividad (véase por ejemplo, Ejemplo 5). Cuando se incubaba en presencia de fenol 0,1 % y m-cresol 0,15 % o 0,315 % durante 6 días a 37 °C, PH20 (por ejemplo, rHuPH20) conserva actividad de aproximadamente 0 % a 15 %, dependiendo de la presencia de otros excipientes o cantidades de otros excipientes en la formulación (véase, por ejemplo, Ejemplos 9 y 10). Por ejemplo, la presencia de una concentración mayor de sal generalmente aumenta la estabilidad de PH20. En particular, la temperatura de fusión de PH20, tal como rHuPH20, se reduce significativamente cuando se añaden conservantes fenólicos, tales como m-Cresol, a la formulación. Por ejemplo, la temperatura de desplegamiento de rHuPH20 se reduce de 44 °C a 24 °C. Las temperaturas de desplegamiento de PH20 menores conducen a agregación de PH20 aumentada, especialmente a temperaturas elevadas, y actividad enzimática reducida. El efecto desestabilizante probablemente se deba a la naturaleza hidrófoba de los conservantes fenólicos. La hidrofobicidad de los compuestos fenólicos puede conducir a la interacción con rHuPH20 mediante unión no específica con la proteína, alterando en última instancia la integridad estructural de rHuPH20. Esto se traduce en una pérdida significativa de la actividad enzimática rHuPH20 en presencia de conservantes.

Los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento que muestran estabilidad aumentada en presencia de conservantes fenólicos muestran más de 15 % de actividad enzimática en presencia de al menos un conservante fenólico durante al menos 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 3 semanas, 4 semanas o más en comparación con la actividad enzimática del polipéptido de PH20 modificado en ausencia de conservante durante el mismo periodo de tiempo y en las mismas condiciones (excepto por la presencia de conservante). En algunos ejemplos, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente

documento muestran al menos 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más actividad enzimática en presencia de un conservante fenólico en comparación con en ausencia del conservante. Por ejemplo, el compuesto conservante fenólico puede ser fenol, metacresol (m-cresol), alcohol bencilico y/o parabenos incluyendo metilparabeno o propilparabeno.

5 En ejemplos particulares, la estabilidad aumentada en presencia de conservante se muestra en condiciones de temperatura de entre o aproximadamente entre 0 °C y 40 °C, tal como entre o aproximadamente entre 2 °C y 6 °C, 24 °C y 32 °C o 35 °C y 40 °C, y en general a o aproximadamente a 4 °C o 5 °C, 30 °C o 37 °C. Se entiende que ya que la alta temperatura también puede tener un efecto desestabilizante en la actividad de PH20 (véase posteriormente), el porcentaje de actividad enzimática de un polipéptido de PH20 modificado descrito en el presente documento en presencia de conservante es mayor a temperaturas menores que a temperaturas mayores.

15 En general, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento muestran estabilidad aumentada, y las actividades enzimáticas indicadas, en presencia de una cantidad antimicrobiana eficaz de conservante que destruye o inhibe la propagación de organismos microbianos en una muestra de la composición. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento muestran estabilidad aumentada en presencia de una cantidad antimicrobiana eficaz de conservante que destruye o inhibe la propagación de organismos microbianos de modo que se produzca una reducción de al menos 1,0 unidades log₁₀ en organismos bacterianos a los 7 días después de la inoculación. En algunos ejemplos, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento muestran estabilidad aumentada en presencia de una cantidad antimicrobiana eficaz de conservante que destruye o inhibe la propagación de organismos microbianos de modo que, cuando se ensaya en un ensayo de eficacia de conservante antimicrobiano (APET), después de inoculación de la composición con un inóculo microbiano hay al menos una reducción de 1,0 unidades log₁₀ en organismos bacterianos a los 7 días después de la inoculación, al menos una reducción de 3,0 unidades log₁₀ de organismos bacterianos a los 14 días después de la inoculación, al menos ningún aumento adicional en organismos bacterianos después de 28 días después de la inoculación, y al menos ningún aumento en organismos fúngicos después de 7 días después de la inoculación. En otros ejemplos, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento muestran estabilidad aumentada en presencia de una cantidad antimicrobiana eficaz de conservante que destruye o inhibe la propagación de organismos microbianos de modo que, cuando se ensaya en un ensayo de eficacia de conservante antimicrobiano (APET), después de la inoculación de la composición con un inóculo microbiano hay al menos una reducción de 1,0 unidades log₁₀ de organismos bacterianos a las 24 horas después de la inoculación, al menos una reducción de 3,0 unidades log₁₀ de organismos bacterianos a los 7 días después de la inoculación, ningún aumento adicional en organismos bacterianos después de 28 días después de la inoculación, al menos una reducción de 1,0 unidades log₁₀ de organismos fúngicos a los 14 días después de la inoculación, y al menos ningún aumento adicional en organismos fúngicos después de 28 días después de la inoculación. En otro ejemplo más, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento muestran estabilidad aumentada en presencia de una cantidad antimicrobiana eficaz del conservante que destruye o inhibe la propagación de organismos microbianos de modo que, cuando se ensaya en un ensayo de eficacia de conservante antimicrobiano (APET), después de la inoculación de la composición con un inóculo microbiano hay al menos una reducción de 2,0 unidades log₁₀ de organismos bacterianos a las 6 horas después de la inoculación, al menos una reducción de 3,0 unidades log₁₀ de organismos bacterianos a las 24 horas después de la inoculación, ninguna recuperación de organismos bacterianos después de 28 días tras la inoculación de la composición con el inóculo microbiano, al menos una reducción de 2,0 unidades log₁₀ de organismos fúngicos a los 7 días después de la inoculación, y al menos ningún aumento adicional en organismos fúngicos después de 28 días después de la inoculación.

45 Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento muestran estabilidad aumentada, y la actividad enzimática anteriormente enumerada, en presencia de una cantidad total de uno o más agentes conservantes fenólicos como un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) que es o está entre 0,05 % y 0,6 %, 0,1 % y 0,4 %, 0,1 % y 82 %, 0,15 % y 82 %, 0,15 % y 82 %, 0,1 % y 82 %, 0,2 % y 0,3 % o 0,3 % y 0,4 % inclusive.

55 En general, los polipéptidos de PH20 modificados proporcionados en el presente documento muestran estabilidad aumentada en presencia de m-cresol y/o fenol. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento muestran estabilidad aumentada en presencia de m-cresol en una cantidad como un % de concentración en masa (p/v) en una formulación que contiene el polipéptido de PH20 modificado de entre o aproximadamente entre 0,05 % y 0,6 %, 0,1 % y 0,4 %, 0,1 % y 0,3 %, 0,15 % y 0,325 %, 0,15 % y 0,25 %, 0,1 % y 0,2 %, 0,2 % y 0,3 % o 0,3 % y 0,4 %. En otros ejemplos, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento muestran estabilidad aumentada en presencia de fenol en una cantidad a un % de concentración de masa (p/v) en una formulación que contiene el polipéptido de PH20 modificado de entre o aproximadamente entre 0,05 % y 0,6 %, 0,1 % y 0,4 %, 0,1 % y 0,3 %, 0,15 % y 0,3 %, 0,15 % y 0,25 %, 0,1 % y 0,2 %, 0,2 % y 0,3 % o 0,3 % y 0,4 % de m-cresol. En ejemplos adicionales, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento muestran estabilidad aumentada en presencia de fenol y m-cresol en una cantidad como un % de concentración en masa (p/v) en una formulación que contiene el polipéptido de PH20 modificado de entre o aproximadamente entre 0,05 % y 0,25 % de fenol y entre o aproximadamente entre 0,05 % y 0,3 % de m-cresol, entre o aproximadamente entre 0,10 % y 0,2 % de fenol y entre o aproximadamente entre 0,6 % y 0,18 % de m-cresol, entre o aproximadamente entre 0,1 % y 0,15 % de fenol y 0,8 % y 0,15 % de m-cresol, entre o

aproximadamente entre 0,10 % y 0,15 % de fenol y entre o aproximadamente entre 0,06 % y 0,09 % de m-cresol o entre o aproximadamente entre 0,12 % y 0,18 % de fenol y entre o aproximadamente entre 0,14 % y 0,22 % de m-cresol.

- 5 En ejemplos del presente documento, los polipéptidos de PH20 modificados muestran más del 15 %, tal como al menos 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más actividad enzimática en presencia de al menos aproximadamente entre o entre 0,3 % y 0,4 %, inclusive, de m-cresol y/o fenol durante al menos 4 horas a 37 °C en comparación con la actividad enzimática del polipéptido de PH20 modificado en ausencia del conservante durante el mismo periodo de tiempo y
- 10 en las mismas condiciones (excepto por la presencia de conservante). Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados muestran más del 15 %, tal como al menos 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más actividad enzimática en presencia de aproximadamente o 0,4 % de m-cresol durante al menos 4 horas a 37 °C en comparación con la actividad enzimática del polipéptido de PH20 modificado en ausencia del conservante durante el mismo periodo de tiempo y en las mismas condiciones (excepto por la presencia de conservante). Los polipéptidos de PH20
- 15 modificados descritos en el presente documento también muestran más del 15 %, tal como al menos 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más actividad enzimática en presencia de al menos aproximadamente entre o entre 0,2 % y 0,4 %, inclusive, de m-cresol y/o fenol durante al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o 6 días a 37 °C en comparación con la actividad enzimática del polipéptido de PH20 modificado en ausencia de conservante durante el mismo periodo de tiempo y en las mismas condiciones (excepto por la presencia de conservante). Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento muestran más del 15 %, tal como al menos 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de actividad enzimática en presencia de aproximadamente o 0,10 % de fenol y aproximadamente
- 20 0,15 % de m-cresol durante al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o 6 días a 37 °C en comparación con la actividad enzimática del polipéptido de PH20 modificado en ausencia de conservante durante el mismo periodo de tiempo y en las mismas condiciones (excepto por la presencia de conservante). En otros ejemplos, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento muestran más del 15 % tal como al menos 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más actividad enzimática en presencia de aproximadamente o 0,315 % de m-cresol durante al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o 6 días, en general durante al menos 6 días, a 37 °C en comparación con la actividad enzimática del polipéptido de PH20 modificado en ausencia de conservante durante el mismo periodo de tiempo y en las mismas condiciones (excepto por la presencia de conservante).
- 25
- 30
- 35 Por ejemplo, dichos polipéptidos de PH20 modificados proporcionados en el presente documento que muestran estabilidad aumentada frente a compuestos de fenol contienen un remplazo (sustitución) de aminoácidos en una o más posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones 10, 12, 20, 22, 26, 34, 36, 46, 50, 52, 58, 68, 70, 74, 82, 83, 84, 86, 97, 127, 131, 138, 142, 143, 144, 166, 169, 174, 193, 195, 196, 204, 205, 206, 213, 219, 234, 237, 238, 240, 249, 261, 267, 277, 279, 291, 309, 310, 314, 315, 317, 318, 347, 367, 375, 376, 399, 401, 407, 416, 419, 421, 431, 433, 439, 440, 443 o 445 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, las posiciones de aminoácidos pueden ser reemplazados en una o más posiciones correspondientes al reemplazo de (P) en la posición 10 (P10), V12, A20, S22, L26, D34, S36, I46, G50, G52, V58, D68, I70, T74, K82, I83, S84, Q86, T97, D127, N131, Q138, V142, Q143, L144, V166, I169, L174, H193, K195, K196, F204, N205, V206, D213, N219, Q234, V237, A238, T240, E249, S261, A267, V277K279, G291, I309, M310, K314, S315, L317, Q347, P367, E375, K376, Y399, S401, S407, D416, A419, D421, D431, F433, E439, T440, P443 o 1445 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3.
- 40
- 45

Los ejemplos de reemplazos de aminoácidos en los polipéptidos de PH20 proporcionados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, reemplazo con: glicina (G) en una posición correspondiente a la posición 10; K en una posición correspondiente a la posición 12; S en una posición correspondiente a la posición 20; T en una posición correspondiente a la posición 22; M en una posición correspondiente a la posición 26; W en una posición correspondiente a la posición 34; N en una posición correspondiente a la posición 36; L en una posición correspondiente a la posición 46; M en una posición correspondiente a la posición 50; T en una posición correspondiente a la posición 52; S en una posición correspondiente a la posición 52; C en una posición correspondiente a la posición 58; K en una posición correspondiente a la posición 58; R en una posición correspondiente a la posición 58; N en una posición correspondiente a la posición 58; Y en una posición correspondiente a la posición 58; P en una posición correspondiente a la posición 58; H en una posición correspondiente a la posición 58; P en una posición correspondiente a la posición 68; V en una posición correspondiente a la posición 70; E en una posición correspondiente a la posición 74; L en una posición correspondiente a la posición 82; N en una posición correspondiente a la posición 82; V en una posición correspondiente a la posición 83; Q en una posición correspondiente a la posición 83; S en una posición correspondiente a la posición 83; G en una posición correspondiente a la posición 83; N en una posición correspondiente a la posición 84; A en una posición correspondiente a la posición 86; K en una posición correspondiente a la posición 86; E en una posición correspondiente a la posición 97; L en una posición correspondiente a la posición 97; R en una posición correspondiente a la posición 127; R en una posición correspondiente a la posición 131; L en una posición correspondiente a la posición 138; K en una posición

50

55

60

65

correspondiente a la posición 142; N en una posición correspondiente a la posición 142; P en una posición correspondiente a la posición 142; S en una posición correspondiente a la posición 142; T en una posición correspondiente a la posición 142; G en una posición correspondiente a la posición 143; K en una posición correspondiente a la posición 143; T en una posición correspondiente a la posición 144; Q en una posición correspondiente a la posición 166; T en una posición correspondiente a la posición 166; L en una posición correspondiente a la posición 169; G en una posición correspondiente a la posición 174; N en una posición correspondiente a la posición 174; Q en una posición correspondiente a la posición 193; T en una posición correspondiente a la posición 195; N en una posición correspondiente a la posición 195; E en una posición correspondiente a la posición 196; R en una posición correspondiente a la posición 196; P en una posición correspondiente a la posición 204; A en una posición correspondiente a la posición 205; E en una posición correspondiente a la posición 205; I en una posición correspondiente a la posición 206; A en una posición correspondiente a la posición 213; I en una posición correspondiente a la posición 219; M en una posición correspondiente a la posición 234; T en una posición correspondiente a la posición 237; H en una posición correspondiente a la posición 238; Q en una posición correspondiente a la posición 240; V en una posición correspondiente a la posición 249; A en una posición correspondiente a la posición 261; K en una posición correspondiente a la posición 261; T en una posición correspondiente a la posición 267; K en una posición correspondiente a la posición 277; H en una posición correspondiente a la posición 279; V en una posición correspondiente a la posición 279; V en una posición correspondiente a la posición 291; E en una posición correspondiente a la posición 309; Q en una posición correspondiente a la posición 310; Y en una posición correspondiente a la posición 314; Y en una posición correspondiente a la posición 315; N en una posición correspondiente a la posición 317; W en una posición correspondiente a la posición 317; D en una posición correspondiente a la posición 318; G en una posición correspondiente a la posición 347; A en una posición correspondiente a la posición 367; R en una posición correspondiente a la posición 375; R en una posición correspondiente a la posición 376; V en una posición correspondiente a la posición 399; E en una posición correspondiente a la posición 401; A en una posición correspondiente a la posición 407; L en una posición correspondiente a la posición 416; K en una posición correspondiente a la posición 419; H en una posición correspondiente a la posición 421; E en una posición correspondiente a la posición 431; T en una posición correspondiente a la posición 433; V en una posición correspondiente a la posición 433; C en una posición correspondiente a la posición 439; P en una posición correspondiente a la posición 440; G en una posición correspondiente a la posición 443; N en una posición correspondiente a la posición 445, cada una en referencia a las posiciones de restos de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3.

El reemplazo o los reemplazos de aminoácidos pueden estar en un polipéptido de PH20 como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 u 870 o una variante del mismo que tiene al menos 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 86 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el mismo. Por ejemplo, el reemplazo o los reemplazos pueden estar en un polipéptido de PH20 humano, por ejemplo, cualquiera expuesto en cualquiera de SEQ ID N°: 3, 7, 32-66, 69 o 72 o una variante del mismo.

Son ejemplos de polipéptidos de PH20 modificados que muestran estabilidad aumentada frente a compuestos de fenol en comparación con el polipéptido de PH20 no modificado (por ejemplo, expuesto en SEQ ID NO: 3) cualquiera que tenga la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N°: 83, 88, 93, 94, 101, 144, 148, 158, 171, 176, 175, 177, 178, 180, 182, 183, 184, 185, 194, 221, 240, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 268, 270, 272, 307, 309, 327, 334, 341, 351, 352, 353, 356, 357, 358, 359, 361, 424, 426, 430, 434, 436, 443, 444, 445, 446, 447, 449, 450, 451, 454, 461, 467, 480, 487, 489, 492, 495, 504, 505, 509, 527, 544, 576, 589, 600, 603, 607, 612, 614, 647, 658, 683, 687, 733, 736, 741, 754, 763, 768, 781, 796, 797, 809, 818, 829 u 837 o que tenga una secuencia de aminoácidos que muestre al menos 68 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 82 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 83, 88, 93, 94, 101, 144, 148, 158, 171, 176, 175, 177, 178, 180, 182, 183, 184, 185, 260, 261, 262, 263, 264, 268, 270, 272, 307, 309, 327, 334, 341, 351, 352, 353, 356, 357, 358, 359, 361, 424, 446, 445, 446, 447, 449, 450, 451, 454, 461, 467, 480, 487, 489, 492, 495, 504, 505, 509, 527, 544, 576, 589, 600, 603, 607, 612, 614, 647, 658, 683, 687, 733, 736, 741, 754, 763, 768, 781, 796, 797, 809, 818, 829 u 837 y contiene el reemplazo de aminoácido, muestra actividad hialuronidasa y muestra estabilidad aumentada en presencia de compuestos de fenol en comparación con el polipéptido no modificado correspondiente.

En particular, se proporciona en el presente documento un polipéptido de PH20 modificado que contiene un reemplazo de aminoácido con P en una posición correspondiente al resto de aminoácido 204 en referencia a SEQ ID NO: 3. Típicamente, el polipéptido de PH20 modificado es un polipéptido humano. Por ejemplo, se describe en el presente documento un polipéptido de PH20 modificado que contiene un reemplazo de aminoácido F204P en una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 69, 72 o 32-66, o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 82 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 69, 72 o 32-66 siempre que el polipéptido modificado contenga el reemplazo de aminoácido correspondiente a F204P. En otros casos, el polipéptido de PH20 modificado es un polipéptido no humano. Por ejemplo, se describe en el presente documento un polipéptido de PH20 modificado que contiene un reemplazo de aminoácido F204P en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10, 12, 14, 857, 859, 861 u 870 o una secuencia que muestra al menos 75 %, 82 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 12, 14, 857, 859, 861 u 870 o una variante del mismo.

80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 12, 14, 857, 859, 861 u 870 siempre que el polipéptido modificado contenga el reemplazo de aminoácido correspondiente a F204P. En un ejemplo adicional, se describe en el presente documento un polipéptido de PH20 modificado que contiene un reemplazo de aminoácido F205P en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 24 o Y204P en SEQ ID NO: 31, o una secuencia que muestra al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24 o 31. Es un ejemplos de dicho polipéptido de PH20 modificado un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 449, o que tiene una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 68 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 449 y contiene el reemplazo de aminoácido F204P, muestra actividad hialuronidasa aumentada y muestra estabilidad aumentada frente a compuestos de fenol en comparación con el polipéptido no modificado correspondiente (por ejemplo, SEQ ID NO: 3). En cualquiera de los ejemplos anteriores, el polipéptido de PH20 modificado que contiene un reemplazo de aminoácido con P en una posición correspondiente al resto de aminoácido 204 en referencia a SEQ ID NO: 3 no tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15-22, 28 o 29.

En otro ejemplo, se describe en el presente documento un polipéptido de PH20 modificado que contiene un reemplazo de aminoácido en una posición correspondiente al resto de aminoácido 58 en referencia a SEQ ID NO: 3. Son ejemplos de reemplazos de aminoácidos el reemplazo con lisina (K) o con arginina (R) en una posición correspondiente al resto de aminoácido 58 en referencia a SEQ ID NO: 3. Típicamente, el polipéptido de PH20 modificado es un polipéptido humano. Por ejemplo, se describe en el presente documento un polipéptido de PH20 modificado que contiene un reemplazo de aminoácido V58K o V58R en una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 69, 72 o 32-66, o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 69, 72 o 32-66. En otros casos, el polipéptido de PH20 modificado es un polipéptido no humano. Por ejemplo, se describe en el presente documento un polipéptido de PH20 modificado que contiene un reemplazo de aminoácido V58K o V58R en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10, 12, 14, 20, 22, 24, 29, 857, 859, 861 u 870 o una secuencia que muestra al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 12, 14, 20, 22, 24, 29, 857, 859, 861 u 870. En un ejemplo adicional, se describe en el presente documento un polipéptido de PH20 modificado que contiene un reemplazo de aminoácido A58R en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 16 o 31, o una secuencia que muestra al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 16 o 31. Es un ejemplo de dicho polipéptido de PH20 modificado un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 182, o que tiene una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 68 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 182, que contiene el reemplazo de aminoácido V58R y muestra actividad hialuronidasa aumentada y muestra estabilidad aumentada en presencia de compuestos de fenol en comparación con el polipéptido no modificado correspondiente (por ejemplo, SEQ ID NO: 3).

ii. Termófilos

A temperaturas elevadas, las hialuronidasas PH20 pueden perder actividad. Se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 modificados que muestran estabilidad aumentada a temperaturas elevadas de entre o aproximadamente entre 30 °C y 45 °C, inclusive, tal como entre o aproximadamente entre 35 °C y 42 °C, en particular a o aproximadamente a 37 °C. Por ejemplo, se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 modificados que son estables a temperaturas elevadas mayores de 32 °C tales como de 35 °C a 45 °C, de 37 °C a 42 °C y en particular a o aproximadamente a 37 °C durante al menos 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días o al menos 7 días. Pueden usarse polipéptidos de PH20 modificados que muestran estabilidad a temperaturas elevadas pueden usarse en aplicaciones donde las temperaturas están elevadas, pueden fluctuar o pueden aumentar. Esto puede suceder, por ejemplo, en métodos de administración que utilizan bombas u otros dispositivos de infusión continua.

En particular, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento que muestran estabilidad a temperaturas elevadas muestran actividad hialuronidasa aumentada a temperatura elevada en comparación con el polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene la modificación, por ejemplo, reemplazo de aminoácido. Los polipéptidos de PH20 pueden mostrar actividad hialuronidasa aumentada tras incubación a temperaturas elevadas mayores de 32 °C tales como 35 °C a 45 °C o 37 °C a 42 °C, en particular a o aproximadamente a 37 °C durante al menos 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días o al menos 7 días en comparación con el polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene la modificación incubada en las mismas condiciones. Por ejemplo, la actividad hialuronidasa puede aumentarse al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % 500 % o más en comparación con el polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene la modificación incubada en las mismas condiciones. Por ejemplo, la actividad hialuronidasa puede aumentarse al menos 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o más en comparación con el polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene la

modificación incubada en las mismas condiciones.

- En otros ejemplos, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento que muestran estabilidad a temperaturas elevadas conservan la actividad hialuronidasa a temperaturas elevadas en comparación con la actividad del polipéptido de PH20 modificado incubado a temperaturas no elevadas en las mismas condiciones (excepto por las diferencias en temperatura). Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados muestran más de o aproximadamente 50 %, tal como más de o al menos 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de la actividad a temperaturas elevadas mayores de 32 °C tales como de 35 °C a 45 °C o de 37 °C a 42 °C, en particular a o aproximadamente a 37 °C en comparación con la actividad de la PH20 a temperaturas no elevadas de entre o aproximadamente entre 2 °C y 8 °C. En algunos ejemplos, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento que muestran estabilidad a temperaturas elevadas muestran actividad aumentada a temperaturas elevadas en comparación con la actividad del polipéptido de PH20 modificado incubado a temperaturas no elevadas en las mismas condiciones (excepto por la diferencia de temperatura). Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados muestran más de o aproximadamente 10 % de actividad aumentada, tal como más de o al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más de actividad a temperaturas elevadas mayores de 32 °C tales como de 35 °C a 45 °C o de 37 °C a 42 °C, en particular a o aproximadamente a 37 °C en comparación con la actividad de la PH20 a temperaturas no elevadas de entre o aproximadamente entre 2 °C y 8 °C. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados muestran más de o al menos aproximadamente 1,1 veces la actividad hialuronidasa, tal como más de o al menos 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o más de la actividad a temperaturas elevadas mayores de 32 °C tales como de 35 °C a 45 °C o de 37 °C a 42 °C, en particular a o aproximadamente a 37 °C en comparación con la actividad de la PH20 a temperaturas no elevadas de entre o aproximadamente entre 2 °C y 8 °C.
- Por ejemplo, dichos polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento que muestran estabilidad aumentada a temperaturas elevadas contienen un reemplazo de aminoácido (sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones 1, 11, 12, 14, 20, 26, 29, 34, 50, 58, 70, 82, 83, 84, 86, 87, 140, 142, 143, 147, 152, 166, 167, 172, 174, 178, 193, 195, 206, 212, 213, 219, 233, 237, 240, 267, 277, 291, 292, 309, 313, 314, 317, 318, 347, 367, 368, 371, 374, 389, 392, 395, 396, 406, 419, 421, 439 o 443 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, las posiciones de aminoácidos pueden ser reemplazos en una o más posiciones correspondientes al reemplazo de (L) en la posición 1 (L1), N11, V12, F14, A20, L26, F29, D34, G50, V58, I70, K82, I83, S84, Q86, D87, Q140, V142, Q143, T147, K152, V166, E167, G172, L174, N178, H193, K195, V206, D212, D213, N219, Q233, V237, T240, A267, V277, G39, E292, I309, M313, K314, L317, L318, Q347, P367, D368, A371, L374, E389, E392, S395, E396, L406, A419, D421, E439 o P443, en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3. El polipéptido de PH20 modificado resultante muestra estabilidad aumentada a temperaturas elevadas mayores de 32 °C tales como de 35 °C a 45 °C, de 37 °C a 42 °C y en particular a o aproximadamente a 37 °C durante al menos 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 7 días o más.
- Los reemplazos de aminoácidos ejemplares en los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, reemplazo con: R en una posición correspondiente a la posición 1; S en una posición correspondiente a la posición 11; I en una posición correspondiente a la posición 12; V en una posición correspondiente a la posición 14; S en una posición correspondiente a la posición 20; M en una posición correspondiente a la posición 26; con R en una posición correspondiente a la posición 29; W en una posición correspondiente a la posición 34; M en una posición correspondiente a la posición 50; K en una posición correspondiente a la posición 58; Q en una posición correspondiente a la posición 58; Q en una posición correspondiente a la posición 58; V en una posición correspondiente a la posición 70; L en una posición correspondiente a la posición 82; Q en una posición correspondiente a la posición 83; R en una posición correspondiente a la posición 84; A en una posición correspondiente a la posición 86; S en una posición correspondiente a la posición 87; K en una posición correspondiente a la posición 140; S en una posición correspondiente a la posición 142; T en una posición correspondiente a la posición 142; K en una posición correspondiente a la posición 143; S en una posición correspondiente a la posición 147; T en una posición correspondiente a la posición 152; T en una posición correspondiente a la posición 166; D en una posición correspondiente a la posición 167; A en una posición correspondiente a la posición 172; G en una posición correspondiente a la posición 174; N en una posición correspondiente a la posición 174; R en una posición correspondiente a la posición 178; Q en una posición correspondiente a la posición 193; T en una posición correspondiente a la posición 195; I en una posición correspondiente a la posición 206; S en una posición correspondiente a la posición 212; A en una posición correspondiente a la posición 213; I en una posición correspondiente a la posición 219; G en una posición correspondiente a la posición 233; T en una posición correspondiente a la posición 237; A en una posición correspondiente a la posición 240; Q en una posición correspondiente a la posición 240; T en una posición correspondiente a la posición 267; E en una posición correspondiente a la posición 277; S en una posición correspondiente a la posición 291; H en una posición correspondiente a la posición 292; V en una posición correspondiente a la posición 292; S en una posición correspondiente a la posición 309; H en una posición correspondiente a la posición 313; S en una posición correspondiente a la posición 314; I en una posición correspondiente a la posición 317; T en una posición correspondiente a la posición 317; W en una posición correspondiente a la posición 317; R en una posición

correspondiente a la posición 318; G en una posición correspondiente a la posición 347; A en una posición correspondiente a la posición 367; R en una posición correspondiente a la posición 368; S en una posición correspondiente a la posición 371; P en una posición correspondiente a la posición 374; A en una posición correspondiente a la posición 389; V en una posición correspondiente a la posición 392; A en una posición correspondiente a la posición 395; H en una posición correspondiente a la posición 396; N en una posición correspondiente a la posición 406; H en una posición correspondiente a la posición 419; K en una posición correspondiente a la posición 419; R en una posición correspondiente a la posición 421; S en una posición que corresponde a la posición 421; A en una posición correspondiente a la posición 439; C en una posición correspondiente a la posición 439; o G en una posición correspondiente a la posición 443, cada uno en referencia a las posiciones de restos de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3.

El reemplazo o los reemplazos de aminoácidos pueden estar en un polipéptido de PH20 como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 u 870 o una variante del mismo que tiene al menos 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 86 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el mismo. Por ejemplo, el reemplazo o los reemplazos pueden ser en un polipéptido de PH20 humano, por ejemplo, cualquiera expuesto en cualquiera de las SEQ ID N°: 3, 7, 32-66, 69 o 72 o una variante del mismo.

Los polipéptidos de PH20 modificados ejemplares que muestran estabilidad aumentada frente a compuestos de fenol en comparación con el polipéptido de PH20 no modificado (por ejemplo, expuestos en SEQ ID NO: 3) son cualquiera que tenga la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 79, 85, 87, 90, 93, 101, 114, 144, 171, 178, 181, 221, 259, 262, 269, 270, 282, 343, 356, 357, 359, 368, 395, 426, 429, 432, 434, 436, 441, 443, 444, 454, 460, 461, 467, 477, 487, 491, 492, 509, 525, 550, 554, 557, 584, 593, 599, 605, 611, 612, 617, 647, 658, 667, 676, 679, 709, 720, 723, 727, 740, 761, 763, 772, 773, 808, 809 u 829 o que tenga una secuencia de aminoácidos que muestre al menos 68 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % 99 % o más de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 79, 85, 87, 90, 93, 101, 114, 144, 171, 178, 181, 221, 259, 262, 269, 270, 282, 343, 356, 357, 359, 368, 395, 426, 429, 432, 434, 436, 441, 443, 444, 454, 460, 461, 467, 477, 487, 491, 492, 509, 525, 550, 554, 557, 584, 593, 599, 605, 611, 612, 617, 647, 658, 667, 676, 679, 709, 720, 723, 727, 740, 761, 763, 772, 773, 808, 809 u 829 y contiene el reemplazo de aminoácido, muestra actividad hialuronidasa y muestra estabilidad aumentada frente a temperaturas elevadas en comparación con el polipéptido no modificado correspondiente.

iii. Ausencia de sal

PH20 se desnaturaliza en presencia de baja salinidad o ausencia de sal. Por lo tanto, PH20 requiere una alta concentración salina de entre o aproximadamente entre 140 mM y 200 mM para mantener la estabilidad. Otros agentes terapéuticos, por ejemplo, insulina, muestran solubilidad reducida y cristalización/agregación aumentada en presencia de alta salinidad. Por lo tanto, los requisitos de alta salinidad de PH20 pueden afectar a la solubilidad y/o actividad de agentes terapéuticos coformulados, mientras que la presencia de baja salinidad puede reducir la actividad de PH20. Esto puede crear problemas para generar coformulaciones de PH20.

Se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 modificados que muestran estabilidad aumentada en presencia de bajas concentraciones de sal (por ejemplo NaCl) menores de 100 mM, por ejemplo, menores de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 25 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM o menos. En general, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento muestran estabilidad en presencia de bajas concentraciones de sal, por ejemplo, bajas concentraciones de NaCl de entre o aproximadamente entre NaCl 10 mM y NaCl 100 mM, tal como entre o aproximadamente entre NaCl 15 mM y 80 mM. Los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento que muestran estabilidad a bajas concentraciones de sal, tales como bajas concentraciones de NaCl (es decir, menos de 100 mM o menos), muestran actividad hialuronidasa aumentada en comparación con la PH20 correspondiente que no contiene la modificación o las modificaciones (por ejemplo, reemplazos de aminoácidos). Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados muestran actividad aumentada más de o aproximadamente 10 %, tal como más de o al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más de actividad a bajas concentraciones de sal, tales como bajas concentraciones de NaCl (es decir, menos de 100 mM), en comparación con la actividad de la PH20 correspondiente que no contiene la modificación o las modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, reemplazo o reemplazos de aminoácidos en las mismas condiciones). Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados muestran más de o al menos aproximadamente 1,1 veces la actividad hialuronidasa, tal como más de o al menos 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o más de la actividad a bajas concentraciones de NaCl menores de 100 mM en comparación con la actividad de la PH20 correspondiente que no contiene la modificación o las modificaciones de aminoácidos, por ejemplo, reemplazo o reemplazos de aminoácidos en las mismas condiciones.

2. Mutantes inactivos

Se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 modificados que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de PH20 y que están inactivos, por lo que los polipéptidos no muestran actividad

- hialuronidasa o muestran actividad hialuronidasa baja o disminuida. Los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento que están inactivos en general muestran menos del 20 %, tal como menos del 10 %, de la actividad hialuronidasa de un polipéptido de PH20 de tipo silvestre o de referencia, tal como el polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 3 o 7. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento que
- 5 están inactivos muestran menos de 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 % o menos de la actividad hialuronidasa de un polipéptido de PH20 de tipo silvestre o de referencia, tal como el polipéptido correspondiente que no contiene la modificación de aminoácido (por ejemplo, reemplazo de aminoácidos), por ejemplo, un polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 3 o 7.
- 10 Por ejemplo, se describen en el presente documento polipéptidos de PH20 que están inactivos y que se modifican, por ejemplo mediante reemplazo o sustitución de aminoácidos, en comparación con un polipéptido de PH20 de tipo silvestre o de referencia. Por ejemplo, un polipéptido de PH20 modificado descrito en el presente documento que
- 15 está inactivo contiene uno o más reemplazos de aminoácidos en la posición o las posiciones correspondientes a la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 94, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 143, 144, 145, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 161, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 331, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 408, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 419, 420, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 434, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444 o 447 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3, siempre que el polipéptido de PH20 modificado resultante esté inactivo y muestre menos del 20 %, y generalmente menos del 10 %, de la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 correspondiente que no contiene el reemplazo de aminoácidos. Típicamente, el resto de aminoácido que se modifica (por ejemplo, se reemplaza) en la posición correspondiente a cualquiera de las posiciones anteriores en un polipéptido de PH20 es un resto idéntico, un resto conservativo o un resto de aminoácido semiconservativo con respecto al resto de aminoácido expuesto en SEQ ID NO: 3.
- 35 Se exponen reemplazos de aminoácidos ejemplares en cualquiera de las posiciones correspondientes anteriores en la Tabla 5. La referencia a la posición correspondiente en la Tabla 5 es en referencia a las posiciones expuestas en SEQ ID NO: 3. Se entiende que los reemplazos pueden realizarse en la posición correspondiente en otro polipéptido de PH20 por alineamiento con el mismo con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3 (véase por ejemplo, Figuras 1 y 2), por lo que la posición correspondiente es la posición alineada. El reemplazo o los reemplazos de aminoácidos pueden estar en la posición correspondiente en un polipéptido de PH20 como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 u 870 o una variante del mismo que tiene al menos 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 86 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el mismo, siempre que el polipéptido de PH20 modificado resultante esté inactivo. Por ejemplo, el reemplazo o los reemplazos pueden estar en una posición correspondiente en un polipéptido de PH20 humano, por ejemplo, cualquiera expuesto en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72, o una variante del mismo. En particular, uno cualquiera o más de los reemplazos están en SEQ ID NO: 3, siempre que el polipéptido de PH20 modificado resultante esté inactivo y muestre menos del 20 %, y generalmente menos del 10 %, de la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 expuesto en SEQ ID NO: 3.
- 50

Tabla 5: Mutantes Inactivos

Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo
2	HKWY	3	AGKPTV	4	DEFGLPWY
5	DGILMNPQR TVWY	6	EFTVY	7	CDFGHIKLLQ RSTWY
8	DEGHNRSW	9	CDEGNP	10	FILMY
11	ACFILPTWY	12	GHW	13	EGILMV
14	AEGHKNPQW	15	EFGKNPQRS Y	16	ACDEFGHK MPRSTY
17	DEGHILNPQ RSTWY	18	CDFGHILMP QSTVY	19	ACFGHILMP QRSVWY
20	DEFHKLNPR TVY	21	ACDEGHILM RSTVW	22	CEGKP
23	AFLMNPQRST V	25	DEFGHIKLN PRSTVY	27	C
33	CDHNVY	34	ILNSTV	35	ADGPRS
36	CFVWY	37	CEGNS	38	EGKLNQRT W
39	CDFW	40	ADEGKNRST V	41	Q
42	DEHIKLMNPQ RSTV	43	ADEGKLNQ V	44	ACFGHILNQ RSTWY
45	ADFGPW	46	PW	47	V
48	P	49	CDGHP	50	V
51	CFIMPTWY	52	CEFWY	53	ACDEGHILNP QRSTWY
54	DEGPRY	55	ADGHNPQRT VY	56	ACEGHILKP RSTVW

Tabla 5: Mutantes Inactivos

Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo
57	ADFGIMPQR VW	58	A	59	AEILMPRTV WY
60	ADFGHILNP QSTVY	61	A EFGHNPQR TWY	62	ACDFIKLMP QRSTVY
63	CGP	64	ACDEFGHIK LPQRSTVW	65	ACDGHKNR STVWY
66	ACDEGIKLN PSTV	67	DEGPRTW	68	ACGILPVY
69	NT	70	Q	71	P
72	CFHIPVW	73	P	75	DGP
76	ACFGIKLPQ RSTVW	77	DELPQRTV	78	ADIMPTY
79	ADFGHKNPS WY	80	ADEFGIKLM NRSTVY	81	ACEGHLNPS VWY
82	YEK	84	Y	85	ACDEFGHN QST
86	CP	87	P	88	ACEFGIKLM PRSTVY
89	ADEGQSTWY	90	CG	91	DEFGHILT
92	EFHKPQRWY	94	GP	95	ACEFGHKL MPQSVWY
96	SVHPRSTW	98	P	99	CEGINPVW
100	CEFGNPRST WY	101	ACFHILMN QRST	102	P
103	AEFGHILQRT VWY	104	FPW	105	CMN

Tabla 5: Mutantes Inactivos

Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo
106	ACDFHLMNP SWY	107	ACHKPQSVW	108	DEFKLMPQT VY
109	CDELMRTW	110	FKLMPW	111	HIQ
112	CEGHLNPS	113	RV	114	ILPTV
115	ACDFGHIKL MRSVY	116	ACDEGHILN PQSVW	117	DGIKNQRSV W
118	CDEGPRWY	119	AKILNPR	121	ACEFGHKL MPWY
122	ACEFIKQRS TV	123	ACDEHLMPO RSTVY	124	CDEFN
125	CDGLNW	126	FHILNPY	127	K
128	EP	129	ACDEGHLPO STVW	130	CDGHLNST WY
131	P	132	P	133	DEFGHLMNP RTVW
134	ACDFGHKPO RSW	135	P	136	P
137	FGHNPRWY	138	V	139	P
143	CHPRST	144	AEFIKPQSV Y	145	TW
149	E	149	P	150	V
152	L	153	EFMPRTV	154	DEGPSWY
155	PY	156	P	157	ACDEGHIKL MPQRSTV
158	DKPRY	159	WY	161	W

Tabla 5: Mutantes Inactivos

Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo
163	CP	164	ACDEGHNPQ R	165	CHPT
166	D	167	V	168	ACDEFGKLP RSVWY
169	ADFGHKNPQ STY	170	CDEGMPWY	171	CDHMNRSW Y
172	DEILPQTVW Y	173	DEGHLMPS VWY	174	P
175	CDGKPRS	176	ACEFGHIPQ STVW	177	ACDFGHLM QRSTVW
178	EILVW	180	ACEPRS	181	ACDEFHIKL RS
182	ACDEHNPQR STVY	183	CDEGIKNPQ RSV	184	ACDEFGHKL MPSRV
185	ADEFGIKPRS TVWY	186	ADGHIKLNQ QRSVW	187	AFGHILMNQ RSTVWY
188	ACFGHLMNP QRSTVW	189	AEGHKLMNP RSTVWY	190	CEFGHKLNQ RSTVW
191	ADEFGKLMNPQ RSTVWY	192	CFGKLMNPQ RVWY	193	ADKLMPV
194	AILPSTV	195	S	197	C
198	VW	199	EGHIKLP RSW	200	AFGHKLM PQRSWY
201	AFLMNP RSTVW	202	ADEFGHKNPQ RVWY	203	ADEGHLMN QRSTV
204	ACEGHK IQRST	206	CDFGPY	207	AFGM PQRST VW

Tabla 5: Mutantes Inactivos					
Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo
208	DGPW	209	CP	210	ACDEGKMN PSTVWY
211	CFGHIKMPR STVW	212	AGHIKLMPV W	213	PS
214	ACDEGHKNP	215	CP	216	DEGHKLMN
	RSTY				PQRTV
217	ACGHPQSTV W	218	AIKLPSV	219	P
220	GKNPRW	221	DEHKPR	222	PY
223	CDEGHKLPQ RSTVWY	224	ADEFGMPQR STVWY	225	ADEGHKQP RTVW
226	ACDEFGLNQ RSTVWY	227	AFGHKLMNP QRTVWY	228	AEEFGHLMNP RSTW
229	EFGKLPQTV W	230	AEGHKMNPR STVWY	231	ACDFGHIKL PQRSV
232	CGHKLNPQV Y	233	DIPST	234	ADEGHNPST VW
235	FLMRWY	236	CILNQTY	238	FGLPVWY
239	CFGHILPRST VWY	240	EFGNWX	241	ACDEGIPRS TVW
242	ACDGILMPR STVW	243	CDFGHLMPQ RSWY	244	ADGIVY
245	ACFLPQRST V	246	ACDEGHKIL MPSTVW	247	ACFHNQRS TWY
248	CDEGIMPT	249	AGHIKMQSY	250	CFGHKLMLN PQRSTVW

Tabla 5: Mutantes Inactivos

Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo
251	DFGHKPSW	252	ADEFGHIKLN NPSTY	253	ADEGHLMLN QRSW
254	CDEGIKLPQ RTVWY	255	CDLPVW	256	CDEGI
257	D	258	LPVW	260	CP
261	P	262	ADEGHIKQR STVWY	263	EFQW
264	DEFGLMRTV WY	265	ADFGHKLM NQRS	266	ACGHMPQR STVW
267	DGHKNRSW	268	ACFGHKLN QSTVW	269	EKLMNPQR
270	ACEFGHIPY	271	ADEHKTW	272	HLNPW
273	ACDGIKLPQS VW	274	CEGHNQWY	275	AFGIKLMQT VW
276	FPW	278	MP	279	ACFGLWY
280	DIMNRSTVW	281	ADGHIKNPQ RSVW	282	FLVWY
283	ACDFW	284	CDFW	284	CIP
285	KPRTV	286	ACDFHKMPT Y	287	ACDEGKLN QRS
288	DEFGHIKPR	289	ACEGHL PQRSY	290	DQY
291	ACDEFMNTW Y	292	ILT	293	EN
294	AEGHKLN PQRSTW	295	CGHILNP TY	296	CFGIKM QRS TVWY

Tabla 5: Mutantes Inactivos

Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo
297	CEHLNPQRS TY	298	CELMNPQST WY	299	ACDFGHLM PQT
300	ACDEFMLNP QSTVW	301	EGHKMNPQR SWY	302	CDEFGHLM RSTY
303	ACDEFGKLM RWY	304	ACDGIMNPQ STVY	305	LPQRSTVY
306	ACHILVWY	307	CIP	308	CFLMVWY
310	CEFKL	311	CEFILPVW	312	CEMVW
313	C	314	CLW	315	CIV
316	EGIKLMPRST VWY	317	GP	318	CPW
319	CEFGHIKMP	320	CPV	321	EMP
	QRSVWY				
322	CDEGILNPRS TVW	323	ACEGHKNRS TV	324	CFPVWY
325	CREGHNW	327	Aefghnqrs TVWY	329	CFGHIKLNQ RSTVWY
330	ACDEGILMN PRSVW	331	ACDEFHKQR STWY	332	ACDEFHGKL NPRSTY
333	GHIKPRSTW Y	334	ACDEGMNRS	335	FGHIKLPVW Y
336	Aefgknprs TVWY	337	CFGIKLMRT W	338	CDEFGHIKL PRTV
339	DEFGHLNPS TVWY	340	ACDEFHGKP RSTVW	341	AEGHKLMN QRSTVY

Tabla 5: Mutantes Inactivos

Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo
342	DEFHKLMPQ RTY	343	CDFIPW	344	FGHLMNPQ RSTWY
345	ACEHKNQRT VY	346	ADFGIKLMP RSTVW	347	CFIPTVW
348	CHILPQRTV WY	349	DFGVPVY	350	ADEFHKLM NPRSTVY
351	CDEFHNRWY	352	ADEFGKMPQ RSTVWY	353	CFGHKLMQ RSW
354	CDEGHIKLM PQSVWY	355	DFGHLMNPO RSTVWY	356	CGKLPRTV W
357	DEFGLMQR	358	EHIKQRW	359	AFGLPW
360	ACEFGIKLM PQRV	361	ACEGMNQR SVW	362	ACEGHKLM NPRSTVW
363	ACDEFGHIP QRSTVW	364	ACDEFGKLM PRSTVY	365	ACDEGMNP QRSTVY
366	ACEFGKMPQ RTW	367	EFILMQV	368	CPW
369	CEFIKLPQV W	370	ADEGHKLN QRSVY	371	P
372	ADEFGHKLN PRSTVW	373	CPW	374	DE
375	CFPVY	376	IPW	377	CILV
378	DEFILMQTW Y	379	ACEFILMW	380	CDEGQRS
381	GLPWY	382	EGHKLMNPQ RSTWY	383	GP

Tabla 5: Mutantes Inactivos

Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo
384	CFMQST	385	CLMPWY	386	ACFGHILMN QRSTVY
387	CEFGHILMN VWY	388	CGPQ	389	FV
390	ACEFGHLNP RSTVWY	391	ADGHKNPQR STVWY	392	CP
393	CP	394	ADEGIKNPQ RSTV	395	C;I
396	CFGIPY	397	ACEFGILMP QTV	398	ACEGHILNP RSTVWY
399	DP	400	ADEFGILMP QRSTVY	401	CFHKRWY
402	ADEFMLPQR STVWY	403	ACEGHKLM NPQRT	404	CDFGHLMN RVWY
405	CIV	406	PR	408	AEEGIKLPR STVWY
410	W	411	DEFG		EH
413	HIKLP	414	ADEGHRST	415	CDEP
416	CS	417	ADEFGHKMP QR	419	DP
420	ADFGHKLNR STWY	422	CDGHLMNQ RSY	423	ADEFGHLMN QRSTVW
424	ACEGHNQRS WY	425	ELPWY	426	CFMR
427	ACFLPVWY	428	ACDEGHNRS Y	429	ADKLNPNSTV WY

Tabla 5: Mutantes Inactivos

Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo	Posición Correspondiente	Reemplazo
430	ADELMNSTV	431	P	432	CFIKLMPY
434	HKPQRW	437	T	438	Y
439	NR	440	Q	441	R
442	MNS	443	D		

3. Modificaciones adicionales y conjugados

Los polipéptidos de PH20 modificados incluyen los que contienen modificaciones químicas o postraduccionales. En algunos ejemplos, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Las modificaciones químicas y postraduccionales incluyen, pero sin limitación, PEGilación, sialación, albuminación, glucosilación, farnisilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica.

También, además de una cualquiera o más modificaciones de aminoácidos, tales como reemplazos de aminoácidos, descritas en el presente documento, los polipéptidos de PH20 modificados proporcionados en el presente documento pueden conjugarse o fusionarse con cualquier resto usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos químicos y recombinantes, siempre que el polipéptido resultante conserve la actividad hialuronidasa. Por ejemplo, además de una cualquiera o más modificaciones de aminoácidos, tales como reemplazos de aminoácidos, descritos en el presente documento, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento también pueden contener otras modificaciones que están o no en la secuencia primaria del polipéptido, incluyendo, pero sin limitación, modificación con un resto de carbohidrato, un resto de polietilenglicol (PEG), un resto de ácido siálico, un dominio Fc de inmunoglobulina G, o cualquier otro dominio o resto. Por ejemplo, dichas modificaciones adicionales pueden realizarse para aumentar la estabilidad o semivida en suero de la proteína.

En algunos casos, el dominio u otro resto es un agente dirigido, incluyendo cualquier agente que dirija el conjugado a uno o más tipos celulares uniéndose selectivamente con un receptor de superficie celular u otro resto de superficie celular. Por ejemplo, el dominio u otro resto es un agente dirigido que dirige el conjugado a células tumorales. En dichos ejemplos, un polipéptido de PH20 modificado, tal como cualquiera descrito en el presente documento, se une directa o indirectamente con un agente dirigido. Dichos agentes de dirección incluyen, pero sin limitación, factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, anticuerpos y hormonas, o variantes alélicas, muteínas, o fragmentos de los mismos siempre que el agente de dirección se internalice por un receptor de superficie celular. Se describen posteriormente modificaciones ejemplares, no limitantes, adicionales.

a. Inmunogenicidad reducida

Los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento pueden prepararse para tener inmunogenicidad reducida. La inmunogenicidad reducida puede efectuarse por cambios de secuencia que eliminan epítomos antigénicos del polipéptido o alterando modificaciones postraduccionales. Un experto en la materia está familiarizado con métodos para identificar epítomos antigénicos en un polipéptido (véase, por ejemplo, Liang *et al.* (2009) BMC Bioinformatics, 10: 302; Yang *et al.* (2009) Rev. Med. Virol., 19: 77-96). En algunos ejemplos, uno o más aminoácidos pueden modificarse para retirar o alterar un epítomo antigénico.

En otro ejemplo, la alteración de la glucosilación de una proteína también puede efectuar inmunogenicidad. Por ejemplo, se contempla alteración de la glucosilación del péptido, siempre que los polipéptidos contengan mínimamente al menos N-acetilglucosamina en restos de aminoácidos correspondientes a los restos de aminoácidos expuestos como N200, N333 y N358 de SEQ ID NO: 3 o 7.

Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 pueden modificarse de modo que carezcan de fucosa, particularmente bifucosilación. En particular, los polipéptidos de PH20 descritos en el presente documento no están bifucosilados. Esto puede conseguirse expresando y produciendo el polipéptido de PH20 en células hospedadoras que no efectúan bifucosilación. La fucosa es una desoxihexosa que está presente en una amplia diversidad de organismos, incluyendo mamíferos, insectos y plantas. Los glucanos fucosilados se sintetizan mediante fucosiltransferasas; véase, por ejemplo, Ma *et al.*, Glycobiology, 16 (12): 158R-184R, (2006); Nakayama *et al.*, J. Biol. Chem., 276: 16100-16106 (2001); y Sturla *et al.*, Glycobiology, 15 (10): 924-935 (2005). En seres humanos, la fucosa existe frecuentemente como una modificación terminal de estructuras de glucano, y se ha mostrado que la presencia de fucosa α 1,6 unida a N-acetilglucosamina es importante en el procesamiento y reconocimiento de glucoproteínas. En insectos, las estructuras centrales de N-glucano muestran bifucosilación con enlaces α 1,6 y α 1,3. La fucosilación central en células de insecto con enlaces α 1,3 genera un epítomo de carbohidrato que es inmunogénico en seres humanos (véase, por ejemplo, Publicación de Estados Unidos n.º 20070067855). Por ejemplo, pueden generarse polipéptidos de PH20 descritos en el presente documento en células hospedadoras que son incapaces de bifucosilar el polipéptido. Por lo tanto, aunque pueden usarse células de insecto u otras células que bifucosilan para expresión de los polipéptidos, típicamente se usan células de mamífero, tales como células CHO.

En algunos ejemplos, pueden generarse polipéptidos de PH20 defucosilados, o deficientes en fucosa, en células de insecto con rutas de glucosilación modificadas, mediante el uso de vectores de expresión de baculovirus que contienen genes de procesamiento de oligosacáridos eucariotas, creando de este modo sistemas de expresión de células de insecto "adaptados a mamíferos" (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 6.461.863). Como alternativa, la antigenicidad puede eliminarse por expresión de polipéptidos de PH20 en células de insecto que carecen de α 1,3-fucosiltransferasa (FT3) (véase, por ejemplo, Publicación de Estados Unidos n.º 20070067855). En otros ejemplos, pueden generarse polipéptidos de PH20 deficientes en fucosa o defucosilados, por ejemplo, en

líneas celulares que producen proteínas defucosiladas, incluyendo células CHO LecO3 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.*, Arch. Biochem Biophys., 249: 533-545 (1986); Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2003/0157108; y documento WO 2004/056312) y líneas celulares nuligénicas, tales como gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO nuligénicas (Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech, Bioeng. 87: 614 (2004)).

5

b. Conjugación con polímeros

En algunos ejemplos, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento se conjugan con polímeros. Los polímeros ejemplares que pueden conjugarse con los polipéptidos de PH20 incluyen 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 contienen uno o más grupos de acoplamiento diferentes, por ejemplo, grupos hidroxilo y grupos amina. Los ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas de entre óxidos de polialquileno (PAO), tales como polialquilenglicoles (PAG), incluyendo polietilenglicoles (PEG), metoxipolietilenglicoles (mPEG) y polipropilenglicoles, PEG-glicidiléteres (Epoxy-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), polietilenglicoles ramificados (PEG), alcohol polivinílico (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, poli-D,L-aminoácidos, polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico, dextranos incluyendo carboximetil-dextranos, heparina, albúmina homóloga, celulosas, incluyendo metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa, hidrolizados de quitosano, almidones tales como hidroxietil almidones e hidroxipropil almidones, glucógeno, agarosas y derivados de los mismos, goma de guar, pululano, inulina, goma xantana, carragenina, pectina, hidrolizados de ácido algínico y biopolímeros.

Típicamente, los polímeros son óxidos de polialquileno (PAO), tales como óxidos de polietileno, tales como PEG, típicamente mPEG, que tienen pocos grupos reactivos capaces de reticular. Típicamente los polímeros son moléculas poliméricas no tóxicas tales como (metoxi) polietilenglicol (mPEG) que pueden conjugarse covalentemente con los polipéptidos de PH20 (por ejemplo, con los grupos de unión en la superficie de proteína) usando una química relativamente simple.

Las moléculas poliméricas adecuadas para unión con los polipéptidos de PH20 incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG) y derivados de PEG tales como metoxipolietilenglicoles (mPEG), PEG-glicidil éteres (Epoxy-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), PEG ramificados y óxido de polietileno (PEO) (véase por ejemplo, Roberts *et al.*, Advanced Drug Delivers Review 2002, 54: 459-476; Harris y Zalipsky (eds.) "Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications" ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar *et al.*, J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 3(1): 125-136, 2000; Harris y Chess (2003) Nat Rev Drug Discov. 2(3): 214-21; y Tsubery, J Biol. Chem 279(37): 38118-24, 2004). La molécula polimérica puede ser de un peso molecular que varía típicamente de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 60 kDa. En algunos ejemplos la molécula polimérica que se conjuga con un polipéptido de PH20 descrito en el presente documento tiene un peso molecular de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más de 60 kDa.

Se conocen en la técnica diversos métodos para modificar polipéptidos uniendo covalentemente (conjugando) un PEG o derivado de PEG (es decir, "PEGilación") (véase por ejemplo documentos US 2006/0104968, US 5.672.662, US 6.737.505 y US 2004/0235734). Las técnicas para PEGilación incluyen, pero sin limitación, enlazadores especializados y químicas de acoplamiento (véase, por ejemplo, Roberts, Adv. Drug Rev. 54: 459-476, 2002), unión de múltiples restos de PEG con un único resto de conjugación (tal como mediante el uso de PEG ramificados; véase, por ejemplo, Guiotto *et al.*, Bioorg Med. Chem. Lett. 12: 177-180, 2002), PEGilación específica de sitio y/o monoPEGilación (véase por ejemplo, Chapman *et al.*, Nature Biotech, 17: 780-783, 1999) y PEGilación enzimática dirigida (véase, por ejemplo, Sato, Adv. Drug Deliv. Rev., 54: 487-504, 2002) (véase, también, por ejemplo, Lu y Felix (1994) Int. J. Peptide Protein Res. 43: 127-138; Lu y Felix (1993) Peptide Res. 6: 140-6, 1993; Felix *et al.* (1995) Int. J. Peptide Res. 46: 253-64; Benhar *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269: 13398-404; Brumeau *et al.* (1995) J Immunol. 154: 3088-95; véase también, Caliceti *et al.* (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55(10): 1261-77 y Molineux (2003) Pharmacotherapy 23 (8 Pt 2): 3S-8S). Los métodos y técnicas descritos en este campo pueden producir proteínas que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 PEG o derivados de PEG unidos con una única molécula proteica (véase, por ejemplo, documento US 2006/0104968).

Se han descrito en la técnica numerosos reactivos para PEGilación. Dichos reactivos incluyen, pero sin limitación, PEG activado por N-hidroxisuccinimidilo (NHS), succinimidil mPEG, mPEG2-N-hidroxisuccinimida, mPEG succinimidil-alfa-metilbutanoato, mPEG succinimidil propionato, mPEG succinimidil butanoato, mPEG carboximetil succinimidil éster de ácido 3-hidroxibutanoico, PEG-succinimidil propionato homobifuncional, PEG propionaldehído homobifuncional, PEG butiraldehído homobifuncional, PEG maleimida, PEG hidrazida, p-nitrofenilcarbonato PEG, mPEG-benzotriazol carbonato, propionaldehído PEG, mPEG butiraldehído, mPEG2 butiraldehído ramificado, mPEG acetilo, mPEG piperidona, mPEG metilcetona, mPEG maleimida "sin enlazador", mPEG vinilsulfona, mPEG tiol, mPEG ortopiridiltoéster, mPEG ortopiridil disulfuro, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsulfona PEG-NHS, acrilato PEG-NHS, fluoresceína PEG-NHS y biotina PEG-NHS (véase por ejemplo, Monfardini *et al.*, Bioconjugate Chem. 6: 62-69, 1995; Veronese *et al.*, J. Bioactive Compatible Polymers 12: 197-207, 1997; documentos US 5.672.662; U.S. 5.932.462; U.S. 6.495.659; U.S. 6.737.505; U.S. 4.002.531; U.S. 4.179.337; U.S. 5.122.614; U.S. 5.324.844; U.S. 5.446.090; U.S. 5.612.460; U.S. 5.643.575; U.S. 5.766.581; U.S. 5.795.569; U.S. 5.808.096; U.S. 5.900.461; U.S.

65

5.919.455; U.S. 5.985.263; U.S. 5.990.237; U.S. 6.113.906; U.S. 6.214.966; US 6.258.351; U.S. 6.340.742; U.S. 6.413.507; U.S. 6.420.339; U.S. 6.437.025; U.S. 6.448.369; U.S. 6.461.802; US 6.828.401; U.S. 6.858.736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; US 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 1064951; EP 0822199; WO 01076640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; WO 0187925; y WO 2005000360).

D. Métodos para identificar enzimas degradantes de hialuronano modificadas con propiedades o actividades alteradas

10 Se describen en el presente documento métodos para identificar una enzima degradante de hialuronano modificada o variante, tal como una hialuronidasa modificada o un polipéptido de PH20 modificado, que muestra una actividad o propiedad alterada en comparación con una enzima degradante de hialuronano no modificada. En particular, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para explorar con respecto a una o más enzimas degradantes de hialuronano modificadas, tales como uno o más de hialuronidasa o polipéptido de PH20 modificados, que muestra actividad aumentada y/o estabilidad aumentada en presencia de un agente o condición de desnaturalización. Por ejemplo, los métodos pueden usarse para identificar una enzima degradante de hialuronano modificada o variante, tal como una hialuronidasa modificada o variante o polipéptido de PH20 modificado o variante, que muestra estabilidad aumentada en virtud de resistencia aumentada a condiciones de desnaturalización, incluyendo pero sin limitación, condiciones de desnaturalización causadas por temperatura (por ejemplo, temperatura elevada tal como calor), agitación, ausencia de sal o baja salinidad, presencia de un excipiente y/o un agente desnaturalizante. Los agentes desnaturalizantes o excipientes ejemplares incluyen, pero sin limitación, antiadherentes, aglutinantes, recubrimiento, cargas y diluyentes, saporíferos, colorantes, lubricantes, emolientes, conservantes, sorbentes o edulcorantes. Por ejemplo, diversos excipientes, tales como conservantes, pueden actuar como agentes desnaturalizantes de proteínas. En el método, la actividad también puede compararse con una enzima degradante de hialuronano no modificada en las mismas condiciones de desnaturalización, y una enzima degradante de hialuronano modificada identificada o seleccionada que muestra mayor actividad que la enzima degradante de hialuronano no modificada correspondiente.

30 En el método, se describen una o más enzimas degradantes de hialuronano modificadas. En algunos ejemplos, se prepara una biblioteca de moléculas modificadas. Se describen en el presente documento métodos de mutagénesis y generación de bibliotecas o colecciones de moléculas variantes y se conocen por los expertos en la materia usando técnicas de ADN recombinante convencionales. En un ejemplo, las enzimas que se ensayan pueden agruparse y explorarse, por lo que el método permite la selección de solamente las enzimas que muestren una actividad deseada. En otro ejemplo, las enzimas ensayadas pueden separarse físicamente y explorarse individualmente, tal como formateando en matrices, tales como matrices direccionables.

40 Las enzimas degradantes de hialuronano modificadas se ensayan o se exploran con respecto a actividad hialuronidasa en presencia y ausencia de una o más condiciones de desnaturalización o agente desnaturalizante. Después de ensayar en ambos conjuntos de condiciones, las actividades se evalúan para identificar enzimas degradantes de hialuronano modificadas que muestran actividad en presencia de la condición de desnaturalización. El nivel o la cantidad de actividad deseados seleccionados como un punto de corte en los métodos puede determinarse empíricamente por el usuario, y depende de factores tales como la enzima degradante de hialuronano particular, la aplicación o el uso deseado de la enzima de degradante de hialuronano, la condición de desnaturalización o agente desnaturalizante particular y otros factores similares. Típicamente, se identifica una enzima degradante de hialuronano modificada que muestra al menos 5 % o 10 % de la actividad en presencia de un agente o una condición desnaturalizante en comparación con su ausencia, y en general al menos 15 %, 20 %, 30 % 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más, por ejemplo al menos 40 % de la actividad.

50 Adicionalmente o como alternativa, la actividad de la enzima degradante de hialuronano modificada en presencia de una o más condiciones de desnaturalización o agentes desnaturalizantes se compara con la actividad de la enzima degradante de hialuronano no modificada correspondiente en presencia del mismo agente o condición o los mismos agentes o condiciones de desnaturalización. En dichos ejemplos, se entiende que la actividad de la enzima modificada y no modificada se ensaya en las mismas condiciones (por ejemplo, tiempo, temperatura, composición), excepto por la diferencia en la enzima particular ensayada (no modificada frente a modificada). Se identifica una enzima degradante de hialuronano modificada que muestra mayor actividad, tal como al menos 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 250 % 300 %, 400 %, 500 % o más de la actividad de la enzima degradante de hialuronano no modificada.

60 El método puede realizarse múltiples veces, por lo que las etapas del método se repiten 1, 2, 3, 4 o 5 veces. El método descrito en el presente documento también es por iteraciones. En un ejemplo, después de realizarse el método, cualquier enzima degradante de hialuronano modificada identificada puede modificarse o modificarse adicionalmente para aumentar u optimizar la actividad.

65 Se proporciona una descripción de las etapas del método y componentes del método en las subsecciones a continuación.

1. Enzimas degradantes de hialuronano y bibliotecas de enzimas degradantes de hialuronano modificadas

En los métodos del presente documento, se ensayan una o más enzimas degradantes de hialuronano modificadas, tales como una hialuronidasa o un polipéptido de PH20, con respecto a una actividad o propiedad deseada, tal como estabilidad aumentada (por ejemplo, resistencia aumentada a una condición de desnaturalización). La enzima degradante de hialuronano modificada puede modificarse en comparación con una enzima degradante de hialuronano no modificada, tal como cualquier enzima degradante de hialuronano conocida en la técnica. Las enzimas degradantes de hialuronano son una familia de enzimas que degradan ácido hialurónico, que es un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente principal de la barrera intersticial. Las enzimas degradantes de hialuronano actúan para degradar hialuronano escindiendo polímeros de hialuronano, que están compuestos de unidades de disacáridos repetidas: ácido D-glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidos entre sí mediante enlaces glucosídicos β -1 \rightarrow 4 y β -1 \rightarrow 3 alternantes. Catalizando la hidrólisis de ácido hialurónico, un constituyente principal de la barrera intersticial, las enzimas degradantes de hialuronano reducen la viscosidad del ácido hialurónico, aumentando de este modo la permeabilidad tisular. En consecuencia, las enzimas degradantes de hialuronano para los usos y métodos descritos en el presente documento incluyen cualquier enzima que tenga la capacidad de catalizar la escisión de una cadena o un polímero de disacárido de hialuronano. En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano escinde el enlace glucosídico β -1 \rightarrow 4 en la cadena o polímero de hialuronano. En otros ejemplos, la enzima degradante de hialuronano cataliza la escisión del enlace glucosídico β -1 \rightarrow 3 en la cadena o polímero de hialuronano

Las enzimas degradantes de hialuronano incluyen enzimas que están unidas a membrana o que son formas solubles que se secretan de células. Por lo tanto, cuando las enzimas degradantes de hialuronano incluyen una secuencia señal de anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) y/o están de otro modo ancladas a membrana o son insolubles, dichas enzimas degradantes de hialuronano pueden proporcionarse en forma soluble por truncamiento C terminal o supresión de toda o una parte de la secuencia señal de anclaje de GPI para hacer a la enzima secretada y soluble. Por lo tanto, las enzimas degradantes de hialuronano incluyen variantes truncadas en el extremo C terminal, por ejemplo, truncadas para retirar toda o una parte de una secuencia señal de anclaje de GPI. Son ejemplos de dichas hialuronidasas solubles hialuronidasas PH20 solubles, tales como cualquiera expuesta en la Patente de Estados Unidos n.º 7.767.429; Publicaciones de Estados Unidos n.º US 2004/0268425 y US 2010/0143457.

Son enzimas degradantes de hialuronano ejemplares las hialuronidasas animales no humanas o humanas, hialuronidasas bacterianas, hialuronidasas de sanguijuelas o condroitinasas que muestran actividad degradante de hialuronano, incluyendo formas solubles o truncadas de las mismas que están activas. Son hialuronidasas animales no humanas ejemplares cualquiera de las expuestas en cualquiera de las SEQ ID NO: 8-31, 856-861, 869, 870, 871-886, o variantes truncadas en el extremo C terminal, maduras, que son solubles y activas, o formas activas de las mismas. Son hialuronidasas humanas ejemplares cualquiera de las expuestas en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 6, 7, 32-66, 68-72 u 887-890, o variantes truncadas en el extremo C terminal, maduras, que son solubles y activas, o formas activas de las mismas, y en particular cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32, 66, 69 o 72. Son hialuronidasas bacterianas ejemplares cualquiera de las expuestas en cualquiera de las SEQ ID NO: 891-919 o variantes truncadas en el extremo C terminal, maduras, que son solubles y activas, o formas activas de las mismas. Se exponen hialuronidasas ejemplares de sanguijuelas en SEQ ID NO: 920 o 921, o variantes truncadas en el extremo C terminal, maduras, que son solubles y activas, o formas activas de las mismas. Se exponen condroitinasas ejemplares que tienen actividad enzimática degradante de hialuronano en SEQ ID NO: 922-924, o variantes truncadas en el extremo C terminal maduras, que son solubles y activas, o formas activas de las mismas.

Por ejemplo, se ensayan uno o más polipéptidos de PH20 modificados con respecto a una actividad o propiedad deseada, tal como estabilidad aumentada (por ejemplo, resistencia aumentada a una condición de desnaturalización). El polipéptido de PH20 modificado puede modificarse en comparación con un polipéptido de PH20 no modificado, tal como cualquier polipéptido de PH20 conocido, polipéptido nativo, de tipo silvestre o de referencia. Por ejemplo, el polipéptido de PH20 modificado se modifica en comparación con una forma de longitud completa, soluble o activa de un polipéptido de PH20, tal como cualquiera expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72, o un polipéptido que muestra al menos 85 %, tal como al menos 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 o 72. En ejemplos particulares del método del presente documento, el polipéptido de PH20 de partida o no modificado tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3.

Pueden explorarse bibliotecas o colecciones de enzimas degradantes de hialuronano modificadas. Las enzimas degradantes de hialuronano pueden modificarse por cualquier proceso conocido por un experto en la materia que puede alterar la estructura de una proteína. Los ejemplos de modificaciones incluyen reemplazo, adición y supresión de uno o más aminoácidos de la proteína para formar bibliotecas o colecciones de enzimas degradantes de hialuronano modificadas. Está dentro del nivel de un experto en la materia generar proteínas modificadas o variantes para su uso en los métodos del presente documento. Se conocen bien en la técnica métodos de mutagénesis e incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida tal como por ejemplo QuikChange (Stratagene) o mutagénesis de saturación. Los métodos de mutagénesis incluyen, pero sin limitación, mutagénesis mediada por sitio, mutagénesis por PCR, mutagénesis por casete, mutagénesis dirigida, mutagénesis de puntos aleatorios, mutagénesis usando

moldes que contienen uracilo, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis de ADN modificado por fosforotioato, mutagénesis que usa ADN bicatenario con huecos, reparación con desapareamientos puntuales, mutagénesis que usa cepas hospedadoras deficientes en reparación, restricción-selección y restricción-purificación, mutagénesis de supresión, mutagénesis por síntesis génica total, reparación de rotura bicatenaria y muchos otros conocidos por expertos en la materia. En los métodos del presente documento, puede efectuarse mutagénesis a lo largo de la longitud completa de una proteína o dentro de una región de una proteína. La mutación puede realizarse racionalmente o aleatoriamente.

En algunos ejemplos, los métodos descritos en el presente documento se realizan de modo que la identidad de cada proteína mutante se conozca a priori antes de ensayarse la proteína. Por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento pueden conducir a mutagénesis y exploración o métodos de ensayo que sean abordables. Esto puede permitir la facilidad de las comparaciones entre las actividades de proteínas ensayadas sin la necesidad de secuenciar proteínas identificadas. Por ejemplo, pueden usarse métodos de mutagénesis dirigida para generar individualmente proteínas mutantes. Puede realizarse mutagénesis mediante reemplazo de restos de aminoácidos individuales en posiciones diana específicas una a una, de modo que cada mutante individual generado sea el producto individual de cada reacción de mutagénesis individual. Las moléculas de ADN mutantes pueden diseñarse, generarse por mutagénesis y clonarse individualmente, tal como en matrices abordables, de modo que estén físicamente separadas entre sí y cada una es el producto individual de una reacción de mutagénesis independiente. Los aminoácidos seleccionados para reemplazar las posiciones diana en la proteína particular que se optimiza pueden ser los 19 aminoácidos restantes, o un grupo más restringido que contiene solamente aminoácidos seleccionados. En algunos métodos descritos en el presente documento, cada aminoácido que se reemplaza se reemplaza independientemente por 19 de los aminoácidos restantes o por menos de 19 de los aminoácidos restantes, tales como 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 de los aminoácidos restantes.

2. Exploración o ensayo con respecto a una actividad o propiedad deseada

La actividad hialuronidasa u otra actividad de una composición que contiene una enzima degradante de hialuronano modificada se explora o se ensaya en condiciones que exponen la enzima degradante de hialuronano a una condición de desnaturalización o un agente desnaturalizante (presencia de condición de desnaturalización o agente desnaturalizante). No es necesario que la condición desnaturalizante o el agente desnaturalizante sea una condición o un agente que sea completamente letal para la enzima, pero en general es cualquier condición o agente que desestabilice la actividad enzimática a lo largo del tiempo. Por ejemplo, la condición de desnaturalización puede ser una condición provocada por temperatura (por ejemplo, temperatura elevada tal como mayor de o aproximadamente 30 °C, por ejemplo, de 30 °C a 42 °C tal como o aproximadamente 37 °C), agitación, baja salinidad o ninguna sal (por ejemplo, NaCl), y/o provocada por la presencia de un agente desnaturalizante, tal como la presencia de excipientes (por ejemplo, presencia de conservantes).

Para fines de seleccionar o identificar una enzima degradante de hialuronano modificada que muestre estabilidad o estabilidad aumentada en la condición de desnaturalización, la actividad puede compararse con la actividad de la enzima degradante de hialuronano modificada en ausencia de la condición de desnaturalización y/o la actividad de la enzima degradante de hialuronano no modificada correspondiente en presencia de la condición de desnaturalización. Por ejemplo, la enzima degradante de hialuronano modificada también puede explorarse o ensayarse en las mismas condiciones, excepto sin incluir una condición desnaturalizante o agente desnaturalizante (ausencia de condición de desnaturalización o agente desnaturalizante). Si se desea, la actividad de la enzima degradante de hialuronano no modificada correspondiente (por ejemplo, la enzima degradante de hialuronano que no contiene el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos) también puede ensayarse en las mismas condiciones que exponen la enzima degradante de hialuronano a la misma condición de desnaturalización o un agente desnaturalizante.

Por ejemplo, cada miembro de una biblioteca o colección de enzimas degradantes de hialuronano modificadas se incuba en o se expone a una o más condiciones desnaturalizantes. La incubación o exposición puede producirse *in vivo* o *in vitro*. Típicamente, el ensayo se realiza *in vitro*. La misma enzima modificada también se expone o incuba frente a una condición de referencia o de control que no contiene la condición de desnaturalización. Las actividades en ambas condiciones se comparan para identificar enzimas degradantes de hialuronano modificadas que muestran estabilidad tras exposición a una condición o condiciones de desnaturalización. Además, en la exploración o identificación de actividad de la enzima en los dos conjuntos diferentes de condiciones, generalmente las únicas condiciones que varían en el ensayo están relacionadas con la presencia o ausencia de una o más condiciones de desnaturalización. Las otras condiciones del ensayo, incluyendo pero sin limitación, tiempo, temperatura y/u otras condiciones de incubación, pueden ser iguales para ambos conjuntos de condiciones.

Por ejemplo, puede conseguirse exposición mediante incubación de una enzima degradante de hialuronano modificada en un tampón de ensayo o composición que se ha modificado o ajustado para contener un agente desnaturalizante tal como un excipiente o baja salinidad o ausencia de sal. Los agentes desnaturalizantes o excipientes ejemplares incluyen, pero sin limitación, antiadherentes, aglutinantes, recubrimientos, cargas y diluyentes, saporíferos, colorantes, lubricantes, emolientes, conservantes, sorbentes o edulcorantes. La elección de tampón que se usa puede determinarse empíricamente por un experto en la materia dependiendo del parámetro o

los parámetros particulares que se modifiquen. Son tampones de ensayo ejemplares los tampones de Good (véase, por ejemplo, Good *et al.* (1966) *Biochemistry*, 5: 467-477). Los ejemplos de dichos tampones incluyen, pero sin limitación tampones ACES, ADA, BES, Bicina, BIS-TRIS, CAPS, HEPES, MES, MOPS, PIPES, TRIS o Trizma®. Además, la cantidad o concentración del excipiente o la sal puede determinarse empíricamente por un experto en la materia dependiendo de la elección de excipiente o sal y el nivel o la actividad deseados de la enzima degradante de hialuronano modificada.

En un ejemplo, el tampón de ensayo o composición se modifica por la inclusión de una cantidad de un agente desnaturalizante o excipiente desnaturalizante que es un conservante, por ejemplo, un conservante fenólico. El conservante fenólico puede ser fenol, metacresol (m-cresol), alcohol bencílico y parabenos incluyendo metilparabeno y propilparabeno. En particular, el conservante fenólico es fenol y/o m-cresol. La cantidad total de uno o más agentes conservantes fenólicos como un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) puede ser entre 0,05 % y 0,6 %, 0,1 % y 0,4 %, 0,1 % y 0,3 %, 0,15 % y 0,325 %, 0,15 % y 0,25 %, 0,1 % y 0,2 %, 0,2 % y 0,3 % o 0,3 % y 0,4 % inclusive. En dicho ejemplo, la actividad de la enzima degradante de hialuronano modificada se ensaya o se evalúa en presencia de dicha cantidad total (por ejemplo, entre o aproximadamente entre 0,05 % y 0,6 %) de uno o más conservantes, por ejemplo, uno o más conservantes fenólicos. En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano modificada también puede ensayarse o evaluarse en una condición de control o referencia en la que el tampón de ensayo o la composición no se modifica para contener un conservante. En ciertos casos, como control, la actividad de enzimas degradantes de hialuronano modificadas también puede compararse con la enzima degradante de hialuronano no modificada correspondiente que no contiene la modificación o las modificaciones en condiciones que contienen un agente conservante y/o en condiciones que no contienen un agente conservante.

En otro ejemplo, el tampón de ensayo se modifica por la presencia de una condición de desnaturalización que es baja salinidad o ausencia de sal. Como se analiza en otra parte en el presente documento, las enzimas degradantes de hialuronano, tales como PH20, generalmente requieren sal (por ejemplo, NaCl, Lys-Lys o MgCl₂) para su actividad. Por lo tanto, la ausencia de sal o baja salinidad es desnaturalizante para la enzima. En un ejemplo, el tampón de ensayo se modifica mediante la inclusión de una cantidad de sal que es menor de 100 mM, por ejemplo, menor de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 25 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM o menos. En dicho ejemplo, la actividad de la enzima degradante de hialuronano modificada se ensaya en ausencia de sal o en presencia de sal que es menor de 100 mM. En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano modificada también puede ensayarse o evaluarse en una condición de control o referencia en la que el tampón de ensayo contiene una mayor concentración salina, generalmente entre o aproximadamente entre 140 mM y 200 mM. En ciertos casos, como control, la actividad de enzimas degradantes de hialuronano modificadas también puede compararse con la enzima degradante de hialuronano no modificada correspondiente que no contiene la modificación o las modificaciones en condiciones que contienen baja salinidad o ausencia de sal, tal como menos de 100 mM y/o en condiciones que contienen sal en una cantidad que está entre o aproximadamente entre 140 mM y 200 mM.

También puede conseguirse exposición de una enzima degradante de hialuronano a una condición de desnaturalización mediante incubación de una enzima degradante de hialuronano modificada en condiciones que se sabe que son desnaturalizantes, tal como en condiciones de temperatura elevada tales como una temperatura mayor de o aproximadamente o 30 °C (por ejemplo, de 30 °C a 42 °C tal como o aproximadamente 37 °C) o agitación. Por ejemplo, la actividad de la enzima degradante de hialuronano modificada se ensaya a temperaturas elevadas mayores de o aproximadamente o de 30 °C a 42 °C. En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano modificada también puede ensayarse o evaluarse en una condición de control o referencia donde la temperatura es menor de 30 °C, tal como entre o aproximadamente entre 0 °C y 25 °C, por ejemplo de 0 °C a 5 °C o de 18 °C a 25 °C. En ciertos casos, como control, la actividad de las enzimas degradantes de hialuronano modificadas también puede compararse con la enzima degradante de hialuronano no modificada correspondiente que no contiene la modificación o las modificaciones a temperaturas elevadas mayores de o aproximadamente o 30 °C a 42 °C y/o temperaturas menores de 30 °C, tal como entre o aproximadamente entre 0 °C y 25 °C, por ejemplo, 0 °C y 5 °C o 18 °C y 25 °C.

La enzima degradante de hialuronano modificada puede exponerse a una o más de una de las condiciones. La exposición a una condición puede producirse simultáneamente, posteriormente, intermitentemente o periódicamente con respecto a la exposición a una o más condiciones distintas.

En un ejemplo, en el método del presente documento, la enzima degradante de hialuronano modificada se incuba o se expone a la condición de desnaturalización o el agente desnaturalizante antes de realizar un ensayo con respecto a actividad hialuronidasa. Por ejemplo, la enzima degradante de hialuronano modificada se incuba en presencia de un agente desnaturalizante o se expone a una o más condiciones de desnaturalización o condiciones de control, tales como una o más de las condiciones de desnaturalización o condiciones de control como se ha descrito anteriormente. La incubación o exposición puede ser durante cualquier periodo de tiempo deseado, y puede determinarse empíricamente por un experto en la materia. Por ejemplo, la enzima degradante de hialuronano modificada puede incubarse o exponerse a una o más condiciones de desnaturalización, agentes desnaturalizantes o condiciones de control durante o aproximadamente durante 1 minuto a 1 mes, tal como 1 minuto a 3 semanas, 1

minuto a 2 semanas, 1 minuto a 1 semana, 1 minuto a 24 horas, 1 minuto a 12 horas, tal como 30 minutos a 6 horas o 1 hora a 4 horas, y en general al menos o aproximadamente al menos 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Después del momento de incubación o exposición, la muestra o composición que contiene la enzima degradante de hialuronano modificada (o enzima de control no modificada) se evalúa con respecto a ensayo de hialuronidasa. En otro ejemplo, la enzima degradante de hialuronano modificada se expone o se incuba en una o más condiciones de desnaturalización y se evalúa simultáneamente o concurrentemente con respecto a la actividad hialuronidasa. En cualquier ejemplo donde se evalúe una enzima degradante de hialuronano modificada, se entiende que una enzima degradante de hialuronano no modificada que no contiene la modificación o las modificaciones también puede evaluarse en condiciones de ensayo similares para comparación.

Se conocen bien en la técnica ensayos para evaluar la actividad hialuronidasa. Se describen ejemplos de dichos ensayos en la sección G. En un ejemplo, la actividad hialuronidasa puede evaluarse en un ensayo de microturbidez, en el que la cantidad de HA no degradado se mide por la adición de un reactivo que precipita HA (por ejemplo, cloruro de cetilpiridinio (CPC) o suero acidificado) después de permitir que la enzima reaccione con HA. En otro ejemplo, la actividad hialuronidasa puede evaluarse usando un ensayo de microtitulación en el que se mide el ácido hialurónico biotinilado residual después de incubación con hialuronidasa (véase por ejemplo, Frost y Stern (1997) Anal. Biochem. 251: 263-269, Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 20050260186). Las actividades resultantes en cada una de las condiciones ensayadas se determinan y se comparan.

3. Selección o identificación

En el método, después de explorar enzimas degradantes de hialuronano modificadas en una o más condiciones de desnaturalización, las actividades hialuronidasa de las enzimas ensayadas se comparan. El método se practica para identificar una enzima degradante de hialuronano modificada que es más resistente a desnaturalización por una condición o un agente desnaturalizante, por el que la actividad de la enzima es indicativa de la estabilidad de la enzima como una medida de su resistencia a la desnaturalización. Se entiende que puede tolerarse algo de reducción de la actividad enzimática, como resultado de desnaturalización, en diversas aplicaciones, y por lo tanto el método puede practicarse para seleccionar una enzima degradante de hialuronano modificada que muestra una actividad necesaria tras exposición a una condición de desnaturalización para permitir su uso o aplicación (por ejemplo, actividad terapéutica). Por ejemplo, puede seleccionarse una enzima modificada que pierda actividad más lentamente que la enzima degradante de hialuronano no modificada o de referencia correspondiente, pero cuya actividad conservada es suficiente para una aplicación o un fin particular.

En ejemplos de los métodos del presente documento, la actividad de la enzima degradante de hialuronano modificada se evalúa tras exposición a una primera condición de desnaturalización y también se evalúa después de exposición a una segunda condición que es una condición de control o no de desnaturalización, y las actividades hialuronidasas resultantes se comparan. Para comparación, en algunos ejemplos, la actividad puede representarse como una relación de la actividad o un porcentaje de la actividad en una condición de desnaturalización en comparación con una condición de control o no de desnaturalización. Por ejemplo, cuando el parámetro que difiere entre la primera y segunda condición es la presencia de conservante (por ejemplo, conservante fenólico), la actividad puede representarse como una relación de la actividad o porcentaje de actividad observado en presencia de conservante (por ejemplo, conservante fenólico) frente a actividad en ausencia de conservante (por ejemplo, conservante fenólico). En otro ejemplo, donde el parámetro que difiere entre la primera y segunda condición es la temperatura, la actividad puede representarse como una relación de la actividad o el porcentaje de actividad observado en presencia de temperatura elevada (por ejemplo, de 30 °C a 42 °C) en comparación con actividad en presencia de una temperatura inferior tal como de 0 °C a 25 °C, por ejemplo de 0 °C a 5 °C o de 18 °C a 25 °C.

Se selecciona o identifica una enzima degradante de hialuronano modificada que conserva o muestra cualquier actividad deseada en presencia de la condición de desnaturalización en comparación con su ausencia. El punto de corte particular de actividad para selección de enzimas en el presente documento depende del usuario y/o la práctica del método particular y puede determinarse empíricamente dependiendo de factores tales como la condición de desnaturalización o el agente desnaturalizante particulares, la enzima degradante de hialuronano modificada particular, la aplicación deseada de la enzima degradante de hialuronano identificada o seleccionada y otros factores similares. En general, una enzima degradante de hialuronano modificada seleccionada o identificada muestra estabilidad si se mide o evalúa cualquier actividad detectable tras exposición o incubación con una condición de desnaturalización o agente desnaturalizante. Por ejemplo, una enzima degradante de hialuronano modificada seleccionada o identificada muestra estabilidad, o resistencia a una condición de desnaturalización o agente desnaturalizante, si muestra al menos 5 % o 10 % de la actividad de la misma enzima en ausencia de la condición de desnaturalización o agente desnaturalizante, y en general si la enzima degradante de hialuronano modificada muestra una actividad que es al menos 15 % de la actividad hialuronidasa inicial antes de la incubación en presencia de la condición de desnaturalización. Por ejemplo, se selecciona o identifica una enzima degradante de hialuronano modificada que muestra al menos (o al menos aproximadamente) 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más de la actividad hialuronidasa inicial de la enzima degradante de hialuronano modificada ensayada en una condición de control o no de desnaturalización.

En otros ejemplos de los métodos del presente documento, la actividad de la enzima degradante de hialuronano modificada se evalúa tras exposición a una condición de desnaturalización y la actividad de la enzima degradante de hialuronano no modificada o de referencia también se evalúa tras exposición a las mismas condiciones de desnaturalización. En dichos ejemplos, las actividades se comparan cuando las enzimas se exponen a las mismas condiciones. Para comparación, la actividad en una condición de desnaturalización puede representarse como una relación de actividad o un porcentaje de actividad de una enzima degradante de hialuronano modificada en comparación con una enzima degradante de hialuronano no modificada o de referencia. En dichos ejemplos, se selecciona un enzima degradante de hialuronano modificada que muestra mayor actividad en una condición de desnaturalización que la enzima degradante de hialuronano no modificada o de referencia. Por lo tanto, la enzima degradante de hialuronano modificada es una que es más resistente a la condición. Por ejemplo, donde la condición de desnaturalización sea la presencia de conservante (por ejemplo, conservante fenólico), la actividad observada en presencia de conservante (por ejemplo, conservante fenólico) puede representarse como una relación de la actividad o porcentaje de actividad de la enzima degradante de hialuronano modificada en comparación con la enzima degradante de hialuronano no modificada o de referencia. En otro ejemplo, donde la condición de desnaturalización es alta temperatura, la actividad observada en presencia de temperatura elevada (por ejemplo, de 30 °C a 42 °C) puede representarse como una relación de la actividad o el porcentaje de actividad de la enzima degradante de hialuronano modificada en comparación con la enzima degradante de hialuronano no modificada o de referencia.

En dichos ejemplos, se identifica o selecciona una enzima degradante de hialuronano modificada, tal como una PH20 modificada, que muestra una relación de actividad que es mayor de o al menos 1,1, de modo que la enzima muestra mayor actividad que la enzima degradante de hialuronano no modificada o de referencia en la condición de desnaturalización. Por ejemplo, la relación es de al menos o al menos aproximadamente 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 o mayor. Una enzima degradante de hialuronano modificada (por ejemplo, una PH20 modificada) puede seleccionarse si su actividad es al menos 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 %, 500 % o más de la actividad de la enzima degradante de hialuronano no modificada o de referencia cuando se ensaya en las mismas condiciones. Por lo tanto, se identifican enzimas degradantes de hialuronano modificadas que muestran mayor estabilidad o estabilidad mejorada en comparación con la enzima degradante de hialuronano no modificada o una enzima degradante de hialuronano de referencia como se manifiesta por resistencia aumentada a una condición de desnaturalización o agente desnaturalizante.

4. Métodos por iteraciones

El método descrito en el presente documento también es por iteraciones. En un ejemplo, después de realizarse el método, cualquier enzima degradante de hialuronano modificada que se ha identificado que muestra estabilidad, tal como estabilidad aumentada, en una condición de desnaturalización puede modificarse o modificarse adicionalmente para aumentar u optimizar la estabilidad. Puede crearse una biblioteca secundaria introduciendo modificaciones adicionales en una primera enzima degradante de hialuronano modificada identificada. Por ejemplo, pueden combinarse modificaciones que se ha identificado que confieren estabilidad, tal como aumento de estabilidad, para generar una biblioteca combinatoria. La segunda biblioteca puede ensayarse usando los ensayos y métodos descritos en el presente documento.

En otro ejemplo de un aspecto por iteraciones del método, las enzimas degradantes de hialuronano modificadas que se ha identificado que no muestran estabilidad tal como estabilidad aumentada (por ejemplo, de modo que no sean activas o no tengan actividad aumentada en la condición de desnaturalización), pueden modificarse adicionalmente y volver a ensayarse con respecto a estabilidad en una condición de desnaturalización. Las modificaciones adicionales pueden dirigirse cerca de regiones particulares (por ejemplo, restos de aminoácidos particulares) asociadas con la actividad y/o estabilidad de la molécula. Por ejemplo, los restos que están asociados con la actividad y/o estabilidad de la molécula generalmente son restos críticos que están implicados en el plegamiento estructural u otras actividades de la molécula. Por lo tanto, dichos restos se requieren para actividad, generalmente en cualquier condición. Los restos críticos pueden identificarse porque, cuando se mutan, se anula o reduce una actividad normal de la proteína. Por ejemplo, pueden identificarse restos críticos que, cuando se mutan en una enzima degradante de hialuronano, muestran actividad hialuronidasa reducida o eliminada en una condición de ensayo normal o de control. Puede generarse una biblioteca adicional de proteínas modificadas con mutaciones de aminoácidos dirigidas en o cerca de los restos de aminoácidos críticos identificados, tales como restos de aminoácidos críticos adyacentes a los identificados. En algunos ejemplos, las mutaciones pueden ser reemplazo de aminoácidos por cualquier otro de hasta 19 restos de aminoácidos distintos. La biblioteca secundaria puede ensayarse usando los ensayos y métodos descritos en el presente documento.

E. Producción de polipéptidos de PH20 modificados y de moléculas de ácido nucleico codificantes

Pueden obtenerse polipéptidos de un polipéptido de PH20 modificado expuesto en el presente documento por métodos bien conocidos en la técnica para purificación de proteínas y expresión de proteínas recombinantes. Los polipéptidos también pueden sintetizarse químicamente. Pueden obtenerse técnicamente formas modificadas o variantes, incluyendo truncadas, a partir de un polipéptido de tipo silvestre usando métodos de ADN recombinante

convencionales. Por ejemplo, pueden modificarse técnicamente polipéptidos de PH20 modificados a partir de un polipéptido de tipo silvestre, tal como mediante mutagénesis dirigida.

1. Aislamiento o preparación de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de PH20

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

Por ejemplo, cuando los polipéptidos se producen por medios recombinantes, puede usarse cualquier método conocido por los expertos en la materia para identificación de ácidos nucleicos que codifican genes deseados. Puede usarse cualquier método disponible en la técnica para obtener un ADNc de longitud completa o parcial (es decir, que abarca región codificante completa) o clon de ADN genómico que codifica una PH20, tal como a partir de una fuente celular o tisular.

Pueden usarse métodos para amplificación de ácidos nucleicos para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido deseado, incluyendo por ejemplo, métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ejemplos de dichos métodos incluyen uso de un termociclador Perkin-Elmer Cetus y Taq polimerasa (Gene Amp). Puede usarse un material que contiene ácido nucleico como material de partida a partir del que puede aislarse una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido deseado. Por ejemplo, en métodos de amplificación pueden usarse preparaciones de ADN y ARNm, extractos celulares, extractos tisulares, muestras de fluidos (por ejemplo, sangre, suero, saliva), muestras de sujetos sanos y/o enfermos. La fuente puede ser de cualquier especie eucariótica incluyendo, pero sin limitación, fuentes vertebradas, mamíferas, humanas, porcinas, bovinas, felinas, aves, equinas, caninas y otras de primates. También pueden usarse bibliotecas de ácido nucleico como una fuente de material de partida. Los cebadores pueden diseñarse para amplificar un polipéptido deseado. Por ejemplo, los cebadores pueden diseñarse basándose en secuencias expresadas a partir de las que se genera un polipéptido deseado. Los cebadores pueden diseñarse basándose en la retrotraducción de una secuencia de aminoácidos polipeptídica. Si se desea, pueden usarse cebadores degradados para amplificación. Pueden usarse cebadores oligonucleotídicos que hibridan con secuencias en los extremos 3' y 5' de la secuencia deseada como cebadores para amplificar por secuencias de PCR a partir de una muestra de ácido nucleico. Pueden usarse cebadores para amplificar la PH20 de longitud completa entera, o una secuencia truncada de la misma, tal como un ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos de PH20 solubles descritos en el presente documento. Las moléculas de ácido nucleico generadas por amplificación pueden secuenciarse y puede confirmarse que codifican un polipéptido deseado.

Las secuencias de nucleótidos adicionales pueden unirse con una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptidos, incluyendo secuencias enlazadoras que contienen sitios de endonucleasa de restricción para el fin de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteínas o un vector diseñado para la amplificación de las secuencias de ADN que codifican la proteína central. Además, secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcionales pueden unirse operativamente con una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptidos. Los ejemplos de dichas secuencias incluyen, pero sin limitación, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión de proteínas intracelular, y secuencias de secreción, por ejemplo secuencias señal heterólogas, diseñadas para facilitar la secreción de proteínas. Dichas secuencias se conocen por los expertos en la materia. Por ejemplo, las secuencias señal heterólogas ejemplares incluyen, pero sin limitación, secuencias señal heterólogas de IgG kappa humanas y de ratón expuestas en SEQ ID NO: 868. Las secuencias de restos de nucleótidos adicionales tales como secuencias de bases que especifican regiones de unión a proteínas también pueden unirse a moléculas de ácido nucleico que codifican enzimas. Dichas regiones incluyen, pero sin limitación, secuencias de restos que facilitan o codifican proteínas que facilitan la captación de una enzima en células diana específicas, o alteran de otro modo la farmacocinética de un producto de un gen sintético.

Además, pueden añadirse marcadores u otros restos, por ejemplo, para ayudar en la detección o purificación de afinidad del polipéptido. Por ejemplo, secuencias de restos de nucleótidos adicionales tales como secuencias de bases que especifican un marcador epitópico u otro marcador detectable también pueden unirse a moléculas de ácido nucleico que codifican enzimas. Los ejemplos de dichas secuencias incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican un marcador His o un Marcador Flag.

Los ácidos nucleicos identificados y aislados pueden después insertarse en un vector de clonación apropiado. Puede usarse un gran número de sistemas de vector-hospedador conocidos en la técnica. Los vectores posibles incluyen, pero sin limitación, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con la célula hospedadora usada. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, bacteriófagos tales como derivados lambda, o plásmidos tales como derivados plasmídicos de pCMV4, pBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Otros vectores de expresión incluyen el vector de expresión HZ24 ejemplificado en el presente documento (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 4 y 5). La inserción en un vector de clonación puede conseguirse, por ejemplo, ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tiene extremos terminales cohesivos complementarios. La inserción puede efectuarse usando vectores de clonación TOPO (Invitrogen,

Carlsbad, CA).

Si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente. Como alternativa, puede producirse cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (enlazadores) en los extremos de ADN; estos enlazadores ligados pueden contener oligonucleótidos sintetizados químicamente específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen proteico pueden modificarse mediante cola homopolimérica.

Pueden introducirse moléculas recombinantes en células hospedadoras mediante, por ejemplo, transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que se generan muchas copias de la secuencia génica. En ejemplos específicos, la transformación de células hospedadoras con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen de proteína aislado, ADNc o secuencia de ADN sintetizada permite la generación de múltiples copias del gen. Por lo tanto, el gen puede obtenerse en grandes cantidades cultivando transformantes, aislando las moléculas de ADN recombinantes de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperando el gen insertado del ADN recombinante aislado.

Además de la producción recombinante, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento pueden producirse por síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida (véase, por ejemplo, Stewart *et al.* (1969) *Solid-Phase Peptide Synthesis*, WH Freeman Co., San Francisco; Merrifield J (1963) *J Am Chem Soc.*, 85: 2149-2154). Puede realizarse síntesis de proteínas *in vitro* usando técnicas manuales o mediante automatización. Puede conseguirse síntesis automática, por ejemplo, usando el Sintetizador Peptídico Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City CA) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Diversos fragmentos de un polipéptido pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando métodos químicos.

2. Generación de ácido nucleico mutante o modificado y que codifica polipéptidos

Las modificaciones descritas en el presente documento pueden realizarse por técnicas de ADN recombinante convencionales tales como las rutinarias para los expertos en la materia. Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para efectuar mutación de uno cualquiera o más aminoácidos en una proteína diana. Los métodos incluyen mutagénesis dirigida convencional (usando, por ejemplo, un kit, tal como QuikChange disponible de Stratagene) de moléculas de ácido nucleico codificantes, o mediante métodos de síntesis de polipéptidos de fase sólida.

3. Vectores y células

Para expresión recombinante de una o más de las proteínas deseadas, tales como cualquier polipéptido de PH20 modificado descrito en el presente documento, el ácido nucleico que contiene toda o una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de proteína insertada. Las señales de transcripción y traducción necesarias también pueden proporcionarse por el promotor nativo para genes de enzimas y/o sus regiones flanqueantes.

También se proporcionan vectores que contienen un ácido nucleico que codifica la enzima. También se proporcionan células que contienen los vectores. Las células incluyen células eucariotas y procariotas, y los vectores son cualquiera adecuado para su uso en las mismas. En general, la célula es una célula que es capaz de efectuar glucosilación de la proteína codificada.

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

Una cepa de células hospedadoras puede seleccionarse por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la manera deseada. Dichas modificaciones del polipéptido incluyen, pero sin limitación, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccional puede influir en el plegamiento y/o la función del polipéptido. Diferentes células hospedadoras, tales como, pero sin limitación, CHO (DG44, DXB11, CHO-K1), HeLa, MCDK, 293 y WI38 tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales y pueden seleccionarse para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína introducida. En general, la elección de célula es una que es capaz de introducir glucosilación ligada a N en el polipéptido expresado. Por lo tanto, se describen células eucariotas que contienen los vectores. Son células eucariotas ejemplares las células de mamífero de Ovario de Hámster Chino (CHO). Por ejemplo, se usan células CHO deficientes en dihidrofolato reductasa (por ejemplo, células DG44) para producir polipéptidos descritos en el presente documento. Obsérvese

que la expresión bacteriana de un polipéptido de PH20 descrito en el presente documento no dará como resultado un polipéptido catalíticamente activo, pero cuando se combina con maquinaria de glucosilación apropiada, la PH20 puede glucosilarse artificialmente.

- 5 Se describen vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de PH20 modificado, acoplado a la secuencia señal nativa o heteróloga, así como múltiples copias de la misma. Los vectores pueden seleccionarse para expresión de la proteína enzimática en la célula o de modo que la proteína enzimática se exprese como una proteína secretada.
- 10 Puede usarse una diversidad de sistemas de hospedador-vector para expresar la secuencia codificante de proteína. Estos incluyen pero sin limitación sistemas de células de mamífero infectados con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus y otros virus); sistemas de células de insectos infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófago, ADN, ADN plasmídico o ADN cosmídico. Los elementos de expresión de vectores varían en sus fortalezas y especificidades. Dependiendo del sistema de hospedador-vector usado, puede usarse uno cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados.

Puede usarse cualquier método conocido por los expertos en la materia para la inserción de fragmentos de ADN en un vector para construir vectores de expresión que contienen un gen quimérico que contiene señales de control de la traducción/transcripción apropiadas y secuencias codificantes de proteínas. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN y sintéticas recombinantes *in vitro* y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican proteína, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de las mismas, puede regularse mediante una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que los genes o fragmentos de los mismos se expresen en un hospedador transformado con la molécula o las moléculas de ADN recombinantes. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede controlarse por cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. En un ejemplo específico, el promotor no es nativo de los genes para una proteína deseada. Los promotores que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, el promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290: 304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' de virus de sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.* Al. Cell 22: 787-797 (1980)), el promotor de timidina quinasa de herpes (Wagner *et al.*, Pro. Natal. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster *et al.*, Nature 296: 39-42 (1982)); promotores de vectores de expresión procariotas, tales como el promotor de β -lactamasa (Jay *et al.*, (1981) Pro. Natal Acad. Sci. USA 78: 5543) o el promotor *tac* (DeBoer *et al.*, Pro. Natal Acad. Sci. USA 80: 21-25 (1983); véase también Gilbert y Villa Komaroff, "Useful Proteins from Recombinant Bacteria", Scientific American 242: 74-94 (1980)); promotores de vectores de expresión vegetales, tales como el promotor de nopalina sintetasa (Herrera-Estrella *et al.*, Nature 303: 209-213 (1984)) o el promotor de ARN 35S de virus del mosaico de la coliflor (Gardner *et al.*, Nucleic Acids Res. 9: 2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bifenol carboxilasa (Herrera-Estrella *et al.*, Nature 310: 115-120 (1984)); elementos promotores de levaduras y otros hongos tales como el promotor de Gal4, el promotor de la alcohol deshidrogenasa, el promotor de fosfoglicerol quinasa, el promotor de fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control de la transcripción animales que muestran especificidad tisular y se han usado en animales transgénicos: región de control de gen de elastasa I que está activo en células de acinos pancreáticos (Swift *et al.*, Cell 38: 639-646 (1984), Ornitz *et al.*, Cold Spring Harbor Symp, Quant. Biol. 50: 399-409 (1986), MacDonald, Hepatology 7: 425-515 (1987)); región de control de gen de la insulina que está activa en células beta pancreáticas (Hanahan *et al.*, Nature 315: 115-122 (1985)), región de control de genes de inmunoglobulina que está activa en células linfoides (Grosschedl *et al.*, Cell 38: 647 (1984), Adams *et al.*, Nature 318: 533-538 (1985); Alexander *et al.*, Mol. Cell Biol. 7: 1436-1444 (1987)), región de control de virus de tumor mamario de ratón que está activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, Cell 45: 485-495 (1986)), región de control de gen de albúmina que está activa en el hígado (Pinkert *et al.*, Genes and Devel 1: 268-276 (1987)), región de control de gen de alfa-fetoproteína que está activa en el hígado (Krumlauf *et al.*, Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648 (1985) Hammer *et al.*, Science 235: 53-58 (1987)), región de control de gen de antitripsina alfa 1 que está activa en hígado (Kelsey *et al.*, Genes y Devel 1: 161-171 (1987)), región de control del gen de beta globina que está activa en células mieloides (Magram *et al.*, Nature 315: 338-340 (1985), Kollias y col., Cell 46: 89-94 (1986)), región de control del gen de proteína básica de mielina que está activa en células oligodendrocíticas del cerebro (Readhead *et al.*, Cell 48: 703-712 (1987)), región de control del gen de cadena ligera de miosina 2 que está activa en músculo esquelético (Shani, Nature 314: 283-286 (1985)) y región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica que está activa en gonadótropos del hipotálamo (Mason *et al.*, Science 234: 1372-1378 (1986)).

En un ejemplo específico, se usa un vector que contiene un promotor unido operativamente con ácidos nucleicos que codifican una proteína deseada, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo de la misma, uno o más orígenes de replicación y, opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos). Dependiendo del sistema de expresión, también se requieren señales de inicio específicas para traducción eficaz de una secuencia de PH20. Estas señales incluyen las secuencias de codón de inicio ATG y adyacentes. En casos donde el codón de inicio y secuencias cadena arriba de PH20 o formas solubles de las mismas se inserten en el vector de expresión apropiado, no es necesaria ninguna señal de control de la traducción adicional. En casos donde solo se inserta una secuencia codificante, o una parte de la misma, deben proporcionarse señales de control de la transcripción exógenas incluyendo el codón de inicio ATG. Además, el codón de inicio debe

estar en la fase de lectura correcta para asegurar la transcripción del inserto completo. Los elementos de la transcripción y codones de inicio exógenos pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de expresión puede potenciarse por la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (Scharf *et al.* (1994) *Results Probl Cell Differ* 20: 125-62; Bittner *et al.* (1987) *Methods in Enzymol*, 153: 516-544).

- 5 Los vectores plasmídicos ejemplares para transformación de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión de pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA; véase también bibliografía publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor de fago T5 (reconocido por ARN polimerasa de *E. coli*) y un módulo de represión de operador de doble lac para proporcionar expresión de alto nivel, estrechamente regulada, de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión ribosómico sintético (RBS II) para traducción eficaz, una secuencia codificante de marcador His6x, y terminadores de la transcripción T1, origen de replicación de ColE1 y un gen de beta-lactamasa para conferir resistencia a ampicilina. Los vectores pQE permiten la colocación de un marcador de His6x en el extremo C o N terminal de la proteína recombinante. Dichos plásmidos incluyen pQE32, pQE30 y pQE31 que proporcionan múltiples sitios de clonación para las tres fases de lectura y posibilitan la expresión de proteínas marcadas con His6x en el extremo N terminal. Otros vectores plasmídicos ejemplares para transformación de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, patente de Estados Unidos 4.952.496, disponible de Novagen, Madison, WI; véase también bibliografía publicada por Novagen que describe el sistema). Dichos plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor de T7lac, terminador de T7, el operador de lac de *E. coli* inducible y el gen represor de lac; PET 12a-c, que contiene el promotor de T7, terminador de T7 y la señal de secreción de ompT de *E. coli*; y pET15b y pET19b (Novagen, Madison, WI), que contienen una secuencia líder His-Tag™ para su uso en purificación con una columna de His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión después de purificación sobre la columna, la región promotora de T7-lac y el terminador de T7.
- 25 Típicamente, los vectores pueden ser plásmidos, vectores virales, u otros conocidos en la técnica, usados para expresión del polipéptido de PH20 modificado *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, el polipéptido de PH20 modificado se expresa en células de mamífero, incluyendo, por ejemplo, Células de Ovario de Hámster Chino (CHO). Un vector ejemplar para expresión de células de mamífero es el vector de expresión HZ24. El vector de expresión HZ24 derivó de la cadena principal del vector pCI (Promega). Contiene ADN que codifica el gen de resistencia a beta-lactamasa (AmpR), un origen de F1 de replicación, una región promotora/potenciadora temprana-inmediata de Citomegalovirus (CMV) y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El vector de expresión también tiene un sitio de entrada ribosómica interno (IRES) del virus ECMV (Clontech) y el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón.
- 30

35 Pueden emplearse vectores virales, tales como vectores de adenovirus, retrovirus o virus vaccinia. En algunos ejemplos, el vector es un vector retroviral defectuoso o atenuado u otro viral (véase Patente de Estados Unidos n.º 4.980.286). Por ejemplo, puede usarse un vector retroviral (véase Miller *et al.*, *NET. Enzymol.*, 217: 581-599 (1993)). Estos vectores retrovirales se han modificado para suprimir secuencias retrovirales que no son necesarias para el empaquetamiento del genoma viral y la integración en ADN de la célula hospedadora.

40 En algunos ejemplos, los virus armados con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de PH20 modificado pueden facilitar su replicación y propagarse por ejemplo dentro de un tejido diana. El tejido diana puede ser un tejido canceroso por lo que el virus tiene capacidad de replicación selectiva dentro del tumor. El virus también puede ser un virus no lítico en el que el virus replica selectivamente bajo un promotor específico tisular. A medida que los virus replican, la coexpresión del polipéptido de PH20 con genes virales facilitará la propagación del virus *in vivo*.

45

4. Expresión

Pueden producirse polipéptidos de PH20 modificados por cualquier método conocido por los expertos en la materia incluyendo métodos *in vivo* e *in vitro*. Las proteínas deseadas pueden expresarse en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades requeridas y formas de las proteínas, tales como por ejemplo, las necesarias para administración y tratamiento. Los hospedadores de expresión incluyen organismos procariotas y eucariotas tales como *E. coli*, levadura, plantas, células de insecto, células de mamífero, incluyendo líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los hospedadores de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas así como los tipos de modificaciones postraduccionales que están presentes en las proteínas expresadas. La elección del hospedador de expresión puede realizarse basándose en estos y otros factores, tales como consideraciones reguladoras y de seguridad, costes de producción y la necesidad y los métodos para purificación.

50

55

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

60

65

Los polipéptidos de PH20 modificados también pueden utilizarse o expresarse como fusiones proteicas. Por

ejemplo, una fusión enzimática puede generarse para añadir funcionalidad adicional a una enzima. Los ejemplos de proteínas de fusión enzimática incluyen, pero sin limitación, fusiones de una secuencia señal, un marcador tal como para localización, por ejemplo, un marcador His6x o His₆ o un marcador myc, o un marcador para purificación, por ejemplo, una fusión de GST, y una secuencia para dirigir la secreción de proteínas y/o asociación a membrana.

5 Para producción a largo plazo, de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se desea expresión estable. Por ejemplo, pueden transformarse líneas celulares que expresan de forma estable un polipéptido de PH20 modificado usando vectores de expresión que contengan orígenes virales de replicación o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarse a medio selectivo. El fin del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el cultivo y la recuperación de células que expresan con éxito las secuencias introducidas. Las células resistentes de células transformadas de forma estable pueden proliferar usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para los tipos celulares.

15 Puede usarse cualquier variedad de sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero sin limitación, 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.*, Cell, 22: 817-23), que pueden emplearse en células TK o APRT, respectivamente. Además, puede usarse resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas como la base de selección. Por ejemplo, pueden usarse DHFR, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler, M *et al.*, (1980) Proc. Nat. Ac. Sci., 77: 3567-70); npt, que confiere resistencia a los aminoglucósidos 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 fosfotricina acetiltransferasa, respectivamente. Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo, trpB, que permiten que las células utilicen indol en lugar de triptófano o hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman SC y RC Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci, 85: 8047-51). También pueden usarse marcadores visibles, tales como pero sin limitación, antocianinas, beta glucuronidasa y su sustrato, GUS y luciferasa y su sustrato luciferina, para identificar transformantes y también para cuantificar la cantidad de expresión proteica transitoria o estable atribuible a un sistema de vector particular (Rhodes CA *et al.* (1995) Methods Mol. Biol. 55: 121-131).

30 Puede supervisarse la presencia y expresión de polipéptidos de PH20. Por ejemplo, la detección de un polipéptido funcional puede determinarse ensayando el medio acondicionado con respecto a actividad de enzima hialuronidasa en condiciones apropiadas. Se describen en el presente documento ensayos ejemplares para evaluar la solubilidad y actividad de proteínas expresadas.

35 a. Células procariotas

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

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

b. Células de levadura

65 Levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son hospedadores de expresión de levadura bien conocidos que pueden usarse para la producción de proteínas, tales como cualquiera descrita en el presente documento. La levadura puede transformarse

con vectores de replicación episómicos o mediante integración cromosómica estable por recombinación homóloga. Típicamente, se usan promotores inducibles para regular la expresión génica. Los ejemplos de dichos promotores incluyen GAL1, GAL7 y GAL5 y promotores de metalotioneína, tales como CUP1, AOX1 u otros promotores de *Pichia* u otra levadura. Los vectores de expresión incluyen con frecuencia un marcador seleccionable tal como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para selección y mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en levadura son con frecuencia solubles. La coexpresión con chaperoninas tales como Bip y proteína disulfuro isomerasa puede mejorar los niveles de expresión y la solubilidad. Adicionalmente, las proteínas expresadas en levadura pueden dirigirse para secreción usando fusiones de péptidos señal de secreción tales como la señal de secreción del factor alfa de tipo apareamiento de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de superficie de células de levadura tales como el receptor de adhesión de apareamiento Aga2p o la glucoamilasa de *Arxula adenivorans*. Puede modificarse técnicamente un sitio de escisión de proteasa tal como para la proteasa Kex-2 para retirar las secuencias fusionadas de los polipéptidos expresados a medida que salen de la ruta de secreción. La levadura también tiene capacidad de glucosilación en motivos Asn-X-Ser/Thr.

15 c. Insectos y células de insecto

Las células de insecto, particularmente que usen expresión de baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos tales como polipéptidos de PH20. Las células de insecto expresan altos niveles de proteína y son capaces de la mayoría de las modificaciones postraduccionales usadas por eucariotas superiores. Los baculovirus tienen una serie de hospedadores restrictiva que mejora la seguridad y reduce las preocupaciones reguladoras de expresión eucariota. Los vectores de expresión típicos usan un promotor para alto nivel de expresión tal como el promotor de polihedrina de baculovirus. Los sistemas de baculovirus usados habitualmente incluyen un baculovirus, tal como el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) o el virus de la polihedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV), y una línea celular de insecto, tal como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula para expresar se fusiona inmediatamente cadena abajo del codón de inicio de la polihedrina del virus. Las señales de secreción de mamíferos se procesan con precisión en células de insecto y pueden usarse para secretar la proteína expresada al medio de cultivo. Además, las líneas celulares *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con patrones de glucosilación similares a los sistemas celulares de mamífero. Son células de insecto ejemplares las que se han alterado para reducir la inmunogenicidad, incluyendo las que tienen vectores de expresión de baculovirus "adaptados a mamíferos" y las que carecen de la enzima FT3.

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

40 d. Expresión de mamíferos

Los sistemas de expresión de mamíferos pueden usarse para expresar proteínas incluyendo polipéptidos de PH20. Las construcciones de expresión pueden transferirse a células de mamífero mediante infección viral tal como por adenovirus o mediante transferencia de ADN directa tales como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamífero incluyen típicamente un sitio de recubrimiento terminal de ARNm, una caja TATA, una secuencia de inicio de la traducción (secuencia consenso de Kozak) y elementos de poliadenilación. También pueden añadirse elementos IRES para permitir la expresión bicistrónica con otro gen, tal como un marcador seleccionable. Dichos vectores incluyen con frecuencia potenciadores-promotores de la transcripción para expresión de alto nivel, por ejemplo el promotor-potenciador de SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV) humano y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (VSR). Estos promotores-potenciadores están activos en muchos tipos celulares. También pueden usarse promotores de tipo tisular y celular y regiones potenciadores para expresión. Las regiones promotoras/potenciadoras ejemplares incluyen, pero sin limitación, las de genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus del tumor mamario de ratón, albúmina, alfa fetoproteína, antitripsina alfa 1, beta globina, proteína básica de mielina, cadena ligera de miosina 2 y control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica. Los marcadores seleccionables pueden usarse para seleccionar y mantener células con la construcción de expresión. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero sin limitación, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, aminoglucósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa. Por ejemplo, puede realizarse expresión en presencia de metotrexato para seleccionar solamente las células que expresan el gen de DHFR. La fusión con moléculas de señalización de superficie celular tales como TCR- ζ y Fc ϵ RI- γ puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo en la superficie celular.

Están disponibles muchas líneas celulares para expresión de mamíferos incluyendo células de ratón, de rata, humanas, de mono, de pollo y de hámster. Las líneas celulares ejemplares incluyen pero sin limitación CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (no secretora) y otras líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, células Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8 y HKB.

También están disponibles líneas celulares adaptadas a medios sin suero que facilitan la purificación de proteínas secretadas del medio de cultivo celular. Los ejemplos incluyen células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, cat. n.º 11619-012) y la línea celular EBNA-1 sin suero (Pham *et al.*, (2003) *Biotechnol. Bioeng.* 84: 332-42.). También están disponibles líneas celulares que se adaptan para cultivar en medios especiales optimizados para expresión máxima.

5 Por ejemplo, las células DG44 CHO se adaptan para crecer en cultivo en suspensión en un medio sin productos animales, químicamente definido.

e. Plantas

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

25

5. Purificación

Pueden cultivarse células hospedadoras transformadas con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de PH20 modificado en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína
30 codificada del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante se secreta en general, pero puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usados. Como entenderán los expertos en la materia, los vectores de expresión que contienen ácido nucleico que codifica PH20 pueden diseñarse con secuencias señal que facilitan la secreción directa de PH20 mediante membranas celulares procariontas o eucariotas.

35 Por lo tanto, los métodos para purificación de polipéptidos de células hospedadoras dependerán de las células hospedadoras elegidas y los sistemas de expresión. Para moléculas secretadas, las proteínas se purifican en general a partir del medio de cultivo después de retirar las células. Para la expresión intracelular, las células pueden lisarse y las proteínas purificarse del extracto. Cuando se usan organismos transgénicos tales como plantas y animales transgénicos para expresión, pueden usarse tejidos u órganos como material de partida para preparar un
40 extracto de células lisadas. Adicionalmente, la producción de animales transgénicos puede incluir la producción de polipéptidos en leche o huevos, que pueden recogerse y, si es necesario, las proteínas pueden extraerse y purificarse adicionalmente usando métodos convencionales en la técnica.

45 Las proteínas, tales como polipéptidos de PH20 modificados, pueden purificarse usando técnicas de purificación de proteínas convencionales conocidas en este campo incluyendo, pero sin limitación, SDS-PAGE, fraccionamiento de tamaño y cromatografía de exclusión por tamaño, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, tal como cromatografía de intercambio aniónico. También pueden utilizarse técnicas de purificación de afinidad para mejorar la eficacia y pureza de las preparaciones. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos, receptores y otras moléculas que se unen con enzimas hialuronidasas PH20 en purificación de afinidad.
50 Por ejemplo, puede purificarse PH20 soluble de medio acondicionado.

Las construcciones de expresión también pueden modificarse técnicamente para añadir un marcador de afinidad a una proteína tal como un epítipo de myc, fusión de GST o His₆ y purificarse por afinidad con anticuerpo de myc, resina de glutatión o Ni-resina, respectivamente. Dichos marcadores pueden unirse con la secuencia de nucleótidos
55 que codifica una PH20 soluble como se describe en otra parte del presente documento, lo que puede facilitar la purificación de proteínas solubles. Por ejemplo, puede expresarse un polipéptido de PH20 modificado como una proteína recombinante con uno o más dominios polipeptídicos adicionales añadidos para facilitar la purificación de proteínas. Dichos dominios facilitadores de purificación incluyen, pero sin limitación, péptidos quelantes metálicos tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados, dominios de
60 proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada y el dominio utilizado en el sistema de purificación de extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle Wash.). La inclusión de una secuencia enlazadora escindible tal como Factor XA o enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y el polipéptido de PH20 expresado es útil para facilitar la purificación. Uno de dichos vectores de expresión posibilita la expresión de una proteína de fusión que contiene un polipéptido de PH20 en y un sitio de
65 escisión de enteroquinasa. Los restos de histidina facilitan la purificación en IMIAC (cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados), mientras que el sitio de escisión de enteroquinasa proporciona un medio para

purificar el polipéptido de la proteína de fusión.

La pureza puede evaluarse por cualquier método conocido en la técnica incluyendo electroforesis en gel, métodos de HPLC ortogonales, tinción y técnicas espectrofotométricas. La proteína expresada y purificada puede analizarse usando cualquier ensayo o método conocido por un experto en la materia, por ejemplo, cualquiera descrito en la sección G. Estos incluyen ensayos basados en las propiedades físicas y/o funcionales de la proteína, incluyendo, pero sin limitación, análisis por electroforesis en gel, inmunoensayo y ensayos de actividad hialuronidasa.

Dependiendo del sistema de expresión y las células hospedadoras usados, el polipéptido resultante puede ser heterogéneo debido a peptidasas presentes en el medio de cultivo tras la producción y purificación. Por ejemplo, el cultivo de PH20 soluble en células CHO puede dar como resultado una mezcla de polipéptidos heterogéneos.

6. Modificación de polipéptidos por PEGilación

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

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

Se han descrito en la técnica numerosos reactivos para PEGilación. Dichos reactivos incluyen, pero sin limitación, reacción del polipéptido con PEG activo por N-hidroxisuccinimidilo (NHS), succinimidil mPEG, mPEG₂-N-hidroxisuccinimida, mPEG succinimidil alfa-metilbutanoato, mPEG succinimidil propionato, mPEG succinimidil butanoato, mPEG carboximetil succinimidil éster de ácido 3-hidroxi-butanoico, PEG-succinimidil propionato homobifuncional, PEG propionaldehído homobifuncional, PEG butiraldehído homobifuncional, PEG maleimida, PEG hidrazida, p-nitrofenil-carbonato PEG, mPEG-benzotriazol carbonato, propionaldehído PEG, mPEG butiraldehído, mPEG₂ butiraldehído ramificado, mPEG acetilo, mPEG piperidona, mPEG metilcetona, mPEG maleimida "sin enlazador", mPEG vinil sulfona, mPEG tiol, mPEG ortopiridiltioéster, mPEG ortopiridil disulfuro, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsulfona PEG-NHS, acrilato PEG-NHS, fluoresceína PEG-NHS y biotina PEG-NHS (véase, por ejemplo, Monfardini *et al.*, Bioconjugate Chem. 6: 62-69, 1995; Veronese *et al.*, J. Bioactive Compatible Polymers 12: 197-207, 1997; documentos U.S. 5.672.662; U.S. 5.932.462; U.S. 6.495.659; U.S. 6.737.505; U.S. 4.002.531; U.S. 4.179.337; U.S. 5.122.614; U.S. 5.324.844; U.S. 5.446.090; U.S. 5.612.460; U.S. 5.643.575; U.S. 5.766.581; U.S. 5.795.569; U.S. 5.808.096; U.S. 5.900.461; U.S. 5.919.455; U.S. 5.985.263; U.S. 5.990.237; U.S. 6.113.906; U.S. 6.214.966; U.S. 6.258.351; U.S. 6.340.742; U.S. 6.413.507; U.S. 6.420.339; U.S. 6.437.025; U.S. 6.448.369; U.S. 6.461.802; U.S. 6.828.401; U.S. 6.858.736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; WO05000360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 1064951; EP 0822199; WO 01076640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; y WO 0187925).

En un ejemplo, el polietilenglicol tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 3 kD a aproximadamente 50 kD y típicamente de aproximadamente 5 kD a aproximadamente 30 kD. Puede conseguirse unión covalente del PEG con el fármaco (conocido como "PEGilación") por técnicas de síntesis químicas conocidas. Por ejemplo, la PEGilación de la proteína puede conseguirse haciendo reaccionar PEG activado por NHS con la proteína en condiciones de reacción adecuadas.

Aunque se han descrito numerosas reacciones para PEGilación, las que son más aplicables en general confieren direccionalidad, utilizan condiciones de reacción suaves y no necesitan procesamiento corriente abajo extensivo para retirar catalizadores tóxicos o productos secundarios. Por ejemplo, monometoxi PEG (mPEG) tiene solamente un hidroxilo terminal reactivo, y por lo tanto su uso limita algo de la heterogeneidad de la mezcla de productos de

PEG-proteína resultante. La activación del grupo hidroxilo al final del polímero en frente del grupo metoxi terminal es generalmente necesaria para conseguir PEGilación proteica eficaz, siendo el objetivo hacer al PEG derivatizado más susceptible a ataque nucleófilo. El nucleófilo atacante es habitualmente el grupo amino épsilon de un resto de lisilo, pero también pueden reaccionar otras aminas (por ejemplo, la alfa-amino N terminal o las aminas de anillo de histidina) si las condiciones locales son favorables. Es posible una unión más dirigida en proteínas que contienen una única lisina o cisteína. Este último resto puede dirigirse por PEG-maleimida para modificación específica de tiol. Como alternativa, puede hacerse reaccionar PEG hidrazida con una enzima degradante de hialuronano oxidada con peryodato y reducirse en presencia de NaCNBH₃. Más específicamente, los azúcares CMP PEGilados pueden hacerse reaccionar con una enzima degradante de hialuronano en presencia de glucosil transferasas apropiadas. Una técnica es la técnica de "PEGilación" donde varias moléculas poliméricas se acoplan con el polipéptido en cuestión. Cuando se usa esta técnica, el sistema inmunitario tiene dificultades para reconocer los epítomos en la superficie del polipéptido responsable de la formación de anticuerpos, reduciendo de este modo la respuesta inmunitaria. Para que polipéptidos introducidos directamente en el sistema circulatorio del cuerpo humano proporcionen un efecto fisiológico particular (es decir, productos farmacéuticos) la respuesta inmunitaria potencial típica es una respuesta de IgG y/o IgM, mientras que los polipéptidos que se inhalan a través del sistema respiratorio (es decir, polipéptido industrial) pueden provocar potencialmente una respuesta de IgE (es decir, respuesta alérgica). Una de las teorías que explica la respuesta inmunitaria reducida es que la molécula o las moléculas poliméricas 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 al menos un factor parcial es que cuanto más pesado sea el conjugado, más reducida será la respuesta inmunitaria resultante.

Típicamente, para preparar el polipéptido de PH20 PEGilado descrito en el presente documento, se conjugan restos de PEG, mediante unión covalente, con los polipéptidos. Las técnicas para PEGilación incluyen, pero sin limitación, enlazadores especializados y químicas de acoplamiento (véase por ejemplo, Roberts, Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 459-476, 2002), unión de múltiples restos de PEG con un único sitio de conjugación (tal como mediante el uso de PEG ramificados; véase por ejemplo, Guiotto *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 12: 177-180, 2002), PEGilación específica de sitio y/o mono-PEGilación (véase, por ejemplo, Chapman *et al.*, Nature Biotech. 17: 780-783, 1999), y PEGilación enzimática dirigida (véase, por ejemplo, Sato, Adv. Drug Deliv. Rev., 54: 487-504, 2002). Los métodos y técnicas descritos en este campo pueden producir proteínas que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 PEG o derivados de PEG unidos a una única molécula proteica (véase, por ejemplo, documento U.S. 2006/0104968).

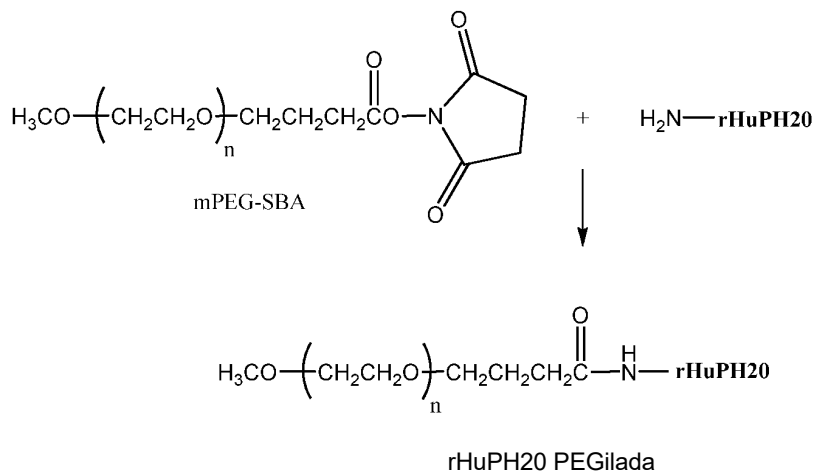
Como un método ilustrativo ejemplar para preparar un polipéptido de PH20 PEGilado, se han aplicado cada uno de PEG aldehídos, succinimidas y carbonatos a restos de PEG conjugados, típicamente succinimidil PEG, con rHuPH20. Por ejemplo, rHuPH20 se ha conjugado con reactivos de succinimidil monoPEG (mPEG) ejemplares incluyendo mPEG-Succinimidil Propionatos (mPEG-SPA), mPEG-Succinimidil Butanoatos (mPEG-SBA) y (para unión de PEG "ramificados") mPEG2-N-Hidroxilsuccinimida. Estos succinimidil ésteres PEGilados contienen cadenas principales de carbono de diferentes longitudes entre el grupo de PEG y el reticulador activado, y un grupo PEG individual o ramificado. Estas diferencias pueden usarse, por ejemplo, para proporcionar diferentes cinéticas de reacción y para restringir potencialmente sitios disponibles para unión de PEG con rHuPH20 durante el proceso de conjugación.

Los succinimidil PEG (como anteriormente) que contienen PEG lineales o ramificados pueden conjugarse con PH20. Pueden usarse PEG para generar PH20 que contienen de forma reproducible moléculas que tienen, en promedio, entre aproximadamente tres y seis o de tres a seis moléculas de PEG por hialuronidasa. Dichas composiciones de rHuPH20 PEGiladas pueden purificarse fácilmente para producir composiciones que tienen actividades específicas de aproximadamente 25.000 o 30.000 unidades/mg de proteína de actividad hialuronidasa, y que están sustancialmente libres de PH20 no PEGilada (menos del 5 % no PEGilada).

Usando diversos reactivos de PEG, pueden prepararse versiones ejemplares de un polipéptido de PH20 PEGilado, por ejemplo, usando mPEG-SBA (30 kD), mPEG-SMB (30 kD), y versiones ramificadas basadas en mPEG2-NHS (40 kD) y mPEG2-NHS (60 kD). Pueden generarse versiones PEGiladas de PH20 usando químicas de NHS, así como carbonatos, y aldehídos, usando cada uno de los siguientes reactivos: mPEG2-NHS-40K ramificado, mPEG-NHS-10K ramificado, mPEGNHS-20K ramificado, mPEG2-NHS-60K ramificado; mPEG-SBA-5K, mPEG-SBA-20K, mPEG-SBA-30K; mPEG-SMB-20K, mPEG-SMB-30K; mPEG-butiraldehído; mPEG-SPA-20K, mPEG-SPA-30K; y PEG-NHS-5K-biotina. También puede prepararse PH20 PEGilada usando reactivos de PEG disponibles de Dowpharma, una división de Dow Chemical Corporation; incluyendo polipéptido de PH20 PEGilados con p-nitrofenil-carbonato PEG de Dowpharma (30 kDa) y con propionaldehído PEG (30 kDa).

En un ejemplo, la PEGilación incluye conjugación de mPEG-SBA, por ejemplo, mPEG-SBA-30K (que tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa) u otro succinimidil éster de un derivado de ácido butanoico PEG, con un polipéptido de PH20. Los succinimidil ésteres de derivados de ácido butanoico PEG, tales como mPEG-SBA-30K se acoplan fácilmente con grupos amino de proteínas. Por ejemplo, la conjugación covalente de m-PEG-SBA-30K y rHuPH20 (que es de aproximadamente 60 kDa de tamaño) proporciona enlaces amida estables entre rHuPH20 y mPEG, como se muestra en el Esquema 1, a continuación.

Esquema 1



5

Típicamente, el mPEG-SBA-30K u otro PEG se añade al polipéptido de PH20 a una relación molar de PEG:polipéptido de 10:1 en un tampón adecuado, por ejemplo, NaCl 130 mM/HEPES 10 mM a pH 6,8 o tampón fosfato 70 mM, pH 7, seguido de esterilización, por ejemplo, esterilización por filtración y conjugación continuada, por ejemplo, con agitación, durante una noche a 4 °C en una cámara frigorífica. En un ejemplo, el PEG-PH20 conjugado se concentra y se cambia su tampón.

10

Se conocen en la técnica otros métodos de acoplamiento de succinimidil éster de derivados de ácido butanoico PEG, tales como mPEG-SBA-30K (véase por ejemplo, documentos U.S. 5.672.662; U.S. 6.737.505; y U.S. 2004/0235734). Por ejemplo, un polipéptido, tal como un polipéptido de PH20, puede acoplarse a un derivado de PEG activado por NHS mediante reacción en un tampón de borato (0,1 M, pH 8,0) durante una hora a 4 °C. La proteína PEGilada resultante puede purificarse por ultrafiltración. Otro método hace reaccionar el polipéptido con mPEG-SBA en agua desionizada a la que se añade trietilamina para aumentar el pH hasta 7,2-9. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante varias horas para completar la PEGilación.

20

Los expertos en la materia conocen métodos para PEGilación de polipéptidos de PH20, incluyendo, por ejemplo, hialuronidasas derivadas de animales y enzimas degradantes de hialuronano bacterianas. Véase, por ejemplo, Patente Europea n.º EP 0400472, que describe la PEGilación de hialuronidasas de testículo bovino y condroitín ABC liasa. Además, la Publicación de Estados Unidos n.º 2006014968 describe PEGilación de una hialuronidasa derivada de PH20 humana. Por ejemplo, la enzima degradante de hialuronano PEGilada contiene en general al menos 3 restos de PEG por molécula. En algunos ejemplos, el polipéptido de PH20 contiene de tres a seis moléculas de PEG. En otros ejemplos, la enzima puede tener una relación molar de PEG con respecto a proteína de entre 5:1 y 9:1, por ejemplo, 7:1.

25

30 F. Composiciones farmacéuticas y formulaciones, dosificaciones y administración

Se proporcionan en el presente documento para administración composiciones farmacéuticas de cualquiera de los polipéptidos de PH20 modificados de acuerdo con las presentes reivindicaciones. Se preparan composiciones farmacéuticamente aceptables a la vista de aprobaciones por una agencia reguladora u otra agencia preparada de acuerdo con la farmacopea reconocida en general para su uso en animales y en seres humanos. Típicamente, los compuestos se formulan en composiciones farmacéuticas utilizando técnicas y procedimientos bien conocidos en este campo (véase por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Cuarta Edición, 1985, 126).

35

En particular, se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que son estables como una formulación líquida durante periodos de tiempo prolongados durante al menos 1 mes a temperaturas de o de aproximadamente 2 °C a 8 °C, inclusive o durante al menos durante 3 días a una temperatura de o de aproximadamente 30 °C a 42 °C, inclusive. Las composiciones farmacéuticas, en particular formulaciones líquidas, pueden estar limitadas por la estabilidad del agente activo, que puede ser susceptible a efectos de condiciones de almacenamiento (tiempo o duración de almacenamiento, temperatura y/o agitación) y/o componentes de formulación contenidos en la composición. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas estables contienen en general un polipéptido de PH20 modificado como se describe en la Sección C.1.b que muestra estabilidad aumentada manifestada como una resistencia aumentada a una o más condiciones de desnaturalización de proteínas. Dichas condiciones de desnaturalización de proteínas pueden incluir, pero sin limitación, temperatura elevada mayor de o igual a o aproximadamente 30 °C, agitación, baja salinidad o ausencia de sal, y presencia de excipientes. La estabilidad aumentada se caracteriza por tipo de almacenamiento mejorado, fragmentación reducida y/o formación de agregados reducida, mientras que aún conserva la actividad del agente o los agentes activos, por ejemplo, la hialuronidasa PH20. Dichas formulaciones pueden proporcionarse como formulaciones líquidas "listas para usar" sin

50

reconstitución adicional y/o sin ningún requisito para dilución adicional. En algunos ejemplos, las formulaciones también pueden prepararse en una forma liofilizada o concentrada.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un polipéptido de PH20 modificado pueden co-administrarse con otro agente terapéutico. En dichos ejemplos, los polipéptidos de PH20 modificados pueden formularse por separado como una composición farmacéutica y administrarse antes de, simultáneamente con, intermitentemente con, o posteriormente a una segunda composición que contiene un agente terapéutico activo. En otros ejemplos, los polipéptidos de PH20 modificados pueden co-formularse con formulaciones farmacéuticas de otros agentes terapéuticos.

En particular, se describen en el presente documento co-formulaciones que contienen un polipéptido de PH20 modificado como se describe en el presente documento y un agente terapéutico que es un agente quimioterapéutico, un agente analgésico, un agente antiinflamatorio, un agente antimicrobiano, un agente amebicida, un agente tricomonacida, un agente anti-parkinsoniano, un agente anti-malárico, un agente anticonvulsivo, un agente antidepresivo, un agente anti-artrítico, 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 broncodilatador, un agente biocida, un agente bactericida, un agente bacteriostático, un agente bloqueador beta adrenérgico, un agente bloqueador de canal de calcio, un agente farmacológico cardiovascular, un agente anticonceptivo, un agente descongestivo, un agente diurético, un agente depresivo, un agente de diagnóstico, un agente electrolítico, un agente hipnótico, un agente hormonal, un agente hiperglucémico, un agente relajante muscular, un agente contractor muscular, un agente oftálmico, un agente parasimpatomimético, un agente energizante psíquico, un agente sedante, un agente simpatomimético, un agente tranquilizante, un agente urinario, un agente vaginal, un agente viricida, un agente vitamínico, un agente antiinflamatorio no esteroideo, un agente inhibidor de enzima convertidora de angiotensina, un polipéptido, una proteína, un ácido nucleico, un fármaco, una molécula orgánica o un inductor del sueño. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento pueden formularse con un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal, una inmunoglobulina, un antibiótico, un bisfosfonato, una citocina, un agente quimioterapéutico, un factor de coagulación o una insulina. Se describen agentes terapéuticos ejemplares que pueden co-formularse con un polipéptido de PH20 modificado en la Sección H. En particular, se describen en el presente documento co-formulaciones que contienen un polipéptido de PH20 modificado y una insulina, tal como una insulina de acción rápida, por ejemplo, una insulina regular o un análogo de insulina de acción rápida (acción veloz). Las co-formulaciones descritas en el presente documento incluyen co-formulaciones estables, por lo que los agentes activos, es decir, el polipéptido de PH20 modificado y el agente terapéutico, muestran estabilidad aumentada y conservan actividad durante periodos prolongados como se describe en el presente documento.

Las formulaciones que contienen PH20 descritas en el presente documento, incluyendo formulaciones separadas de las mismas y co-formulaciones, son estables durante periodos de tiempo prolongados, incluyendo a diversas temperaturas y en diversas condiciones de almacenamiento o uso tales como agitación. Por ejemplo, las formulaciones descritas en el presente documento son estables y conservan actividad de agente o agentes activos (por ejemplo, hialuronidasa PH20) en condiciones "de refrigerador", por ejemplo, de 2 °C a 8 °C, tal como a o aproximadamente a 4 °C, durante al menos 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, 13 meses, 14 meses, 15 meses, 16 meses, 17 meses, 18 meses, 19 meses, 20 meses, 21 meses, 22 meses, 23 meses, 24 meses, 25 meses, 26 meses, 27 meses, 28 meses, 29 meses o 30 meses o más. En otro ejemplo, las formulaciones descritas en el presente documento son estables y conservan actividad de agente o agentes activos (por ejemplo, hialuronidasa PH20) a temperatura ambiente por ejemplo de 18 °C a 32 °C, generalmente de 20 °C a 32 °C, tal como de 28 °C a 32 °C, durante al menos 2 semanas a 1 año, por ejemplo, al menos 3 semanas, 4 semanas, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses o al menos 1 año o más. En un ejemplo adicional, las formulaciones descritas en el presente documento son estables y conservan actividad de agente o agentes activos (por ejemplo, hialuronidasa PH20) a temperaturas elevadas de aproximadamente o más de 30 °C, generalmente de o de aproximadamente 30 °C a 42 °C, tal como de 32 °C a 37 °C o 35 °C a 37 °C o aproximadamente o 37 °C durante al menos 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 20 días, 21 días, 22 días, 23 días, 24 días, 25 días, 26 días, 27 días, 28 días, 29 días, 30 días, 35 días, 40 días, 45 días, 50 días, 60 días o más.

Las composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y formulaciones de liberación sostenida. Una composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y otros de dichos agentes. También se contemplan formulaciones tópicas. La formulación debería adaptarse al modo de administración.

1. Formulaciones - líquidos, inyectables, emulsiones

La formulación en general se prepara para adaptarse a la vía de administración. Se contempla en el presente documento administración parenteral, generalmente caracterizada por inyección o infusión, bien por vía subcutánea,

por vía intramuscular, por vía intravenosa o vía intradérmica. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos solubles secos estériles, tales como polvos liofilizados, listos para combinarse con un disolvente justo antes de su uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para inyección, productos insolubles secos estériles listos para combinarse con un vehículo justo antes de su uso y emulsiones estériles. Pueden prepararse inyectables en formas convencionales, bien como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o bien como emulsiones. Por ejemplo, las composiciones que contienen un polipéptido de PH20 modificado, formuladas por separado o co-formuladas con otro agente terapéutico, pueden proporcionarse como una preparación farmacéutica en forma líquida como una solución, jarabe o suspensión. En forma líquida, las preparaciones farmacéuticas pueden proporcionarse como una preparación concentrada para diluir a una concentración terapéuticamente eficaz antes de su uso. En general, las preparaciones se proporcionan en una forma de dosificación que no requiere dilución para su uso. En otro ejemplo, las preparaciones farmacéuticas pueden presentarse en forma liofilizada para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso.

Los inyectables se diseñan para administración local y sistémica. Para fines del presente documento, se desea administración local para administración directa al intersticio afectado. 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.

La concentración del compuesto farmacéuticamente activo se ajusta de modo que una inyección o infusión proporciona una cantidad eficaz para producir el efecto farmacológico deseado. La dosis exacta depende de la edad, el peso y la condición del paciente o animal como se conoce en la técnica. Las preparaciones parenterales de dosis unitaria pueden envasarse, por ejemplo, en una ampolla, un cartucho, un vial o una jeringa sin aguja. El volumen de solución líquida o preparación de polvo reconstituido, que contiene el compuesto farmacéuticamente activo, está en función de la enfermedad para tratar y el artículo particular de fabricación elegido para el envase. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles, como se conoce y se practica en la técnica. El porcentaje de compuesto activo contenido en dichas composiciones parenterales depende en alta medida de la naturaleza específica del mismo, así como la actividad del compuesto y las necesidades del sujeto.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos u otros excipientes. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden contener uno cualquiera o más de un diluyente o diluyentes, adyuvante o adyuvantes, antiadherente o antiadherentes, aglutinante o aglutinantes, recubrimiento o recubrimientos, carga o cargas, saporífero o saporíferos, colorante o colorantes, lubricante o lubricantes, emoliente o emolientes, conservante o conservantes, detergente o detergentes, sorbente o sorbentes o edulcorante o edulcorantes y una combinación de los mismos o vehículo con el que se administra un polipéptido de PH20 modificado. Por ejemplo, los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables usados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones, incluyendo preparaciones líquidas, pueden prepararse por medios convencionales con aditivos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, generalmente en forma purificada, junto con una cantidad de vehículo adecuada para proporcionar la forma para administración apropiada al paciente. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua o aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. El agua es un vehículo típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones de dextrosa y glicerol acuosas como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, inyección de Ringer con lactato y dextrosa. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Los agentes de suspensión y dispersión incluyen, pero sin limitación, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropil metilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen, pero sin limitación, lecitina o goma arábica. Los detergentes incluyen, pero sin limitación, polisorbato 80 (TWEEN 80). Los vehículos no acuosos incluyen, pero sin limitación, aceite de almendra, ésteres oleosos o aceites vegetales fraccionados. Los agentes o conservantes antimicrobianos incluyen, pero sin limitación, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico, m-cresol, fenol. Un diluyente incluye, pero sin limitación, lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico o carboximetilcelulosa. Un lubricante incluye, pero sin limitación, estearato de magnesio, estearato cálcico o talco. Un aglutinante incluye pero sin limitación, almidón, gomas naturales, tales como goma arábica, gelatina, glucosa, melaza, polivinilpirrolidona, celulosas y derivados de las mismas, povidona, crospovidonas y otros aglutinantes tales conocidos por los expertos en la materia. Los agentes isotónicos incluyen, pero sin limitación, cloruro sódico y dextrosa. Los tampones incluyen, pero sin limitación, fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato sódico. Los anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaína. Un agente

secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Otros recipientes farmacéuticos adecuados incluyen, pero sin limitación, almidón, glucosa, lactosa, dextrosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, solución salina, agua y etanol. Los vehículos farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua e hidróxido sódico, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajuste de pH. Una composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de sustancias adyuvantes no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes de pH, por ejemplo, acetato, citrato sódico, derivados de ciclodextrina, sorbitán monolaurato, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina, estabilizantes, potenciadores de la solubilidad, y otros de dichos agentes tales como por ejemplo, acetato sódico, fosfato sódico, sorbitán monolaurato, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas.

En particular, pueden añadirse agentes antimicrobianos (por ejemplo conservantes) en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas (por ejemplo, una cantidad antimicrobiana eficaz) para preparaciones parenterales envasadas en recipientes de múltiples dosis, que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorbutanol, ésteres de ácido metil y propil-p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio.

El volumen de las formulaciones, incluyendo las formulaciones que contienen PH20 formuladas por separado o co-formuladas descritas en el presente documento, puede ser cualquier volumen adecuado para el recipiente en el que se proporciona. En algunos ejemplos, las formulaciones se proporcionan en un vial, jeringa, bolígrafo, depósito para una bomba o un sistema de bucle cerrado, o cualquier otro recipiente adecuado. Por ejemplo, las formulaciones descritas en el presente documento están entre o aproximadamente entre 0,1 ml y 500 ml, tal como 0,1 ml y 100 ml, 1 ml y 100 ml, 0,1 ml y 50 ml, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 0,1 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml o más.

25

a. Polvos liofilizados

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

30

El polvo liofilizado, estéril, se prepara disolviendo un compuesto de enzima en una solución de tampón. La solución de tampón puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o la solución reconstituida, preparada a partir del polvo. La esterilización por filtración posterior de la solución seguida de liofilización en condiciones convencionales conocidas por los expertos en la materia proporciona la formulación deseada. Puede prepararse una formulación líquida como se ha descrito anteriormente en el presente documento. La mezcla resultante se esteriliza por filtración o se trata para retirar partículas y para asegurar la esterilidad, y se reparte en viales para liofilización. Por ejemplo, el polvo liofilizado puede prepararse disolviendo un excipiente, tal como dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado, en un tampón adecuado, tal como citrato, fosfato sódico o potásico u otro de dichos tampones conocidos por los expertos en la materia. Después, se añade una enzima seleccionada a la mezcla resultante, y se agita hasta que se disuelve.

35

Cada vial se prepara para contener una única dosificación o múltiples dosificaciones del compuesto. El polvo liofilizado puede almacenarse en condiciones apropiadas, tal como aproximadamente 4 °C hasta temperatura ambiente. La reconstitución de este polvo liofilizado con una solución de tampón apropiada proporciona una formulación para uso en administración parenteral.

45

b. Formulaciones ejemplares

Se conocen en la técnica formulaciones de dosis individual de PH20. Por ejemplo, Hylenex® recombinante (inyección de hialuronidasa humana) contiene, por ml, 8,5 mg de NaCl (145 mM), 1,4 mg de fosfato sódico dibásico (9,9 mM), 1,0 mg de albúmina humana, 0,9 mg de edetato disódico (2,4 mM), 0,3 mg de CaCl₂ (2,7 mM) y NaOH para ajustar el pH a 7,4. Otras formulaciones de hialuronidasa soluble humana, tales como las formulaciones de rHuPH20 descritas en la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º US2011/0053247, incluyen NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0; o histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0. Cualquier de los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento pueden formularse de forma similar.

50

Además de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de PH20 modificado y/u otro agente terapéutico, las composiciones farmacéuticas ejemplares descritas en el presente documento, incluyendo formulaciones que contienen PH20 formuladas por separado y co-formuladas, pueden contener una concentración de NaCl y se preparan a un pH requerido para mantener la estabilidad del agente o los agentes activos (por ejemplo, hialuronidasa PH20 y/u otro agente terapéutico co-formulado). Para formulaciones multidosis y otras formulaciones almacenadas durante un tiempo prolongado, las composiciones generalmente también contienen uno o más conservantes. También pueden incluirse agentes estabilizantes adicionales y otros excipientes. Se describen posteriormente componentes ejemplares.

60

65

i. Sal (por ejemplo NaCl)

En ejemplos del presente documento, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento contienen una concentración de sal, tal como cloruro sódico (NaCl), para mantener la estabilidad del agente o los agentes activos (por ejemplo, hialuronidasa PH20). Se requiere en general sal, tal como NaCl, para conservar la estabilidad y actividad de PH20. Concentraciones salinas bajas de generalmente menos de 120 mM pueden tener efectos deletéreos en la actividad de PH20 a lo largo del tiempo y dependiendo de las condiciones de temperatura. Por lo tanto, la ausencia de sal (por ejemplo NaCl) o una baja concentración de sal (por ejemplo NaCl) pueden dar como resultado inestabilidad de la proteína. En algunos ejemplos del presente documento, sin embargo, polipéptidos de PH20 modificados que muestran estabilidad aumentada en ausencia de baja salinidad o ausencia de sal, tales como NaCl bajo o ausencia de NaCl (véase, por ejemplo, Sección C.1.b.iii), no son susceptibles de desnaturalización. Además, la presencia de sal (por ejemplo NaCl) puede tener diferentes efectos en otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, la solubilidad de insulina y análogos de insulina tiende a aumentar con menor concentración salina (por ejemplo, <140 mM) y altas concentraciones salinas pueden dar como resultado cristalización/agregación de insulina, especialmente a temperaturas menores (véase por ejemplo, Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 61/520.962; Solicitudes de Estados Unidos n.º de Serie 13/507.263 y 13/507.262; y Solicitud de PCT Internacional n.º PCT/US2012/042816). Por lo tanto, se preparan composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento de acuerdo con los requisitos del agente o los agentes activos. Está dentro del nivel de un experto en la materia evaluar la estabilidad del agente o los agentes activos en la formulación y en diversas condiciones de almacenamiento (véase por ejemplo, Sección G). En ejemplos particulares del presente documento, las composiciones farmacéuticas, incluyendo las formulaciones que contienen PH20 formuladas por separado o co-formuladas descritas en el presente documento, contienen NaCl a una concentración de entre o aproximadamente entre 10 mM y 200 mM, tal como 10 mM y 50 mM, 50 mM y 200 mM, 50 mM y 120 mM, 50 mM y 100 mM, 50 mM y 90 mM, 120 mM y 160 mM, 130 mM y 150 mM, 80 mM y 140 mM, 80 mM y 120 mM, 80 mM y 100 mM, 80 mM y 160 mM, 100 mM y 140 mM, 120 mM y 120 mM o 140 mM y 180 mM.

ii. pH y tampón

En ejemplos del presente documento, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se preparan a un pH para mantener la estabilidad del agente o los agentes activos (por ejemplo, hialuronidasa PH20). Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se preparan a un pH de entre o aproximadamente entre 6,5 y 7,8, tal como entre o aproximadamente entre 6,5 y 7,2, 7,0 y 7,8, 7,0 y 7,6 o 7,2 y 7,4. La referencia al pH en el presente documento se basa en la medición de pH a temperatura ambiente. Se entiende que el pH puede cambiar durante el almacenamiento a lo largo del tiempo, pero típicamente permanecerá entre o entre aproximadamente pH 6,5 y 0 y aproximadamente 7,8. Por ejemplo, el pH puede variar en $\pm 0,1$, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 o más. Las co-formulaciones ejemplares descritas en el presente documento tienen un pH de o de aproximadamente $7,0 \pm 0,2$, $7,1 \pm 0,2$, $7,2 \pm 0,2$, $7,3 \pm 0,2$, $7,4 \pm 0,2$, $7,5 \pm 0,2$ o $7,6 \pm 0,2$ cuando se preparan. Si es necesario, el pH puede ajustarse usando agentes acidificantes para reducir el pH o agentes alcalinizantes para aumentar el pH. Los agentes acidificantes ejemplares incluyen, pero sin limitación, ácido acético, ácido cítrico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, solución de fosfato sódico monobásica y ácido fosfórico. Los agentes alcalinizantes ejemplares incluyen, pero sin limitación, solución de fosfato sódico dibásico, carbonato sódico o hidróxido sódico.

Las composiciones se preparan en general usando un agente tamponante que mantiene el intervalo de pH. Puede usarse cualquier tampón en formulaciones descritas en el presente documento siempre que no afecten de forma adversa a la estabilidad del agente o los agentes activos (por ejemplo, hialuronidasa PH20) y apoyen el intervalo de pH requerido necesario. Los ejemplos de tampones particularmente adecuados incluyen Tris, succinato, acetato, tampones de fosfato, citrato, aconitato, malato y carbonato. Los expertos en la materia, sin embargo, reconocerán que las formulaciones descritas en el presente documento no están limitadas a un tampón particular, siempre que el tampón proporcione un grado aceptable de estabilidad del pH o "capacidad de tampón" en el intervalo indicado. En general, un tampón tiene una capacidad de tampón adecuada a una distancia de aproximadamente 1 unidad de pH de su pK (Lachman *et al.* En: *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy* 3ª Ed. (Lachman, L., Lieberman, HA. y Kanig, J.L., Eds.), Lea y Febiger, Filadelfia, p. 458-460, 1986). La idoneidad del tampón puede estimarse basándose en tabulaciones de pK publicadas o puede determinarse empíricamente por métodos bien conocidos en la técnica. El pH de la solución puede ajustarse al criterio de valoración deseado dentro del intervalo como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, usando cualquier ácido o base aceptable.

Los tampones que pueden incluirse en las co-formulaciones descritas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, Tris (trometamina), histidina, tampones fosfato, tales como fosfato sódico dibásico y tampones de citrato. Dichos agentes tamponantes pueden estar presentes en las co-formulaciones a concentraciones entre o aproximadamente entre 1 mM y 100 mM, tal como 10 mM y 50 mM o 20 mM y 40 mM, tal como a o aproximadamente a 30 mM. Por ejemplo, dichos agentes tamponantes pueden estar presentes en las co-formulaciones en una concentración de o aproximadamente de 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM o más.

iii. Conservante o conservantes

En ejemplos del presente documento, las formulaciones multidosis o formulaciones almacenadas durante periodos prolongados contienen una cantidad antimicrobiana eficaz de conservante o mezcla de conservantes en una cantidad para tener un efecto bacteriostático o fungistático. En ejemplos particulares, los conservantes están presentes en una concentración suficiente para proporcionar los requisitos antimicrobianos de, por ejemplo, la Farmacopea de Estados Unidos (USP) y la Farmacopea Europea (EP), incluyendo los requisitos antimicrobianos de EP (EPA) y los requisitos antimicrobianos de EP preferidos (EPB) (véase Tabla 4). Ya que la presencia de conservantes, y en particular conservantes fenólicos particulares, pueden tener efectos deletéreos en la estabilidad de PH20, dichas formulaciones típicamente contienen un polipéptido de PH20 modificado que muestra estabilidad aumentada en presencia de conservantes, tales como cualquiera descrito en la Sección C.1.b.i del presente documento. En general, la cantidad mantiene la estabilidad del agente o los agentes activos (por ejemplo hialuronidasa PH20).

Una cantidad antimicrobiana eficaz de conservante es una cantidad que muestra actividad antimicrobiana mediante destrucción o inhibición de la propagación de organismos microbianos en una muestra de la composición como se evalúa en un ensayo de eficacia de conservante antimicrobiano (APET). Un experto en la materia está familiarizado con el ensayo de eficacia de conservante antimicrobiano y estándares a cumplir según la USP y EPA o EPB para cumplir los requisitos mínimos. En general, el ensayo de eficacia de conservante antimicrobiano implica exponer una composición con inóculos establecidos de microorganismos adecuados, es decir, bacterias, levaduras y hongos, almacenar la preparación inoculada a una temperatura establecida, retirar muestras a intervalos temporales especificados y contar los organismos en la muestra (véase, Sutton y Porter, (2002) PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 56(4): 300-311; The United States Pharmacopeial Convention, Inc., (efectivo el 1 de enero de 2002), The United States Pharmacopeia 25ª Revisión, Rockville, MD, Capítulo <51> Antimicrobial Effectiveness Testing; y European Pharmacopoeia, Capítulo 5.1.3, Efficacy of Antimicrobial Preservation). Los microorganismos usados en la exposición en general incluyen tres cepas de bacterias, concretamente *E. coli* (ATCC n.º 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC n.º 9027) y *Staphylococcus aureus* (ATCC n.º 6538), levadura (*Candida albicans* ATCC n.º 10231) y hongo (*Aspergillus niger* ATCC n.º 16404), todas las cuales se añaden de modo que la composición inoculada contenga 10^5 o 10^6 unidades formadores de colonias (ufc) de microorganismo por ml de composición. Las propiedades conservantes de la composición se consideran adecuadas si, en las condiciones del ensayo, hay un descenso significativo o ningún aumento, como se especifica en la Tabla 3 en el número de microorganismos en la composición inoculada después de los momentos y a las temperaturas establecidas. Los criterios para evaluación se proporcionan con respecto a la reducción logarítmica en el número de microorganismos viables en comparación con la muestra inicial o el punto temporal previo.

Los ejemplos no limitantes de conservantes que pueden incluirse en las co-formulaciones descritas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, fenol, meta-cresol (m-cresol), metilparabeno, alcohol bencílico, timerosal, cloruro de benzalconio, 4-cloro-1-butanol, diclorhidrato de clorhexidina, digluconato de clorhexidina, L-fenilalanina, EDTA, bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1-3-diol), acetato fenilmercúrico, glicerol (glicerina), imidurea, clorhexidina, deshidroacetato sódico, orto-cresol (o-cresol), para-cresol (p-cresol), clorocresol, ceftrimida, cloruro de bencetonio, etilparabeno, propilparabeno o butilparabeno y cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, las formulaciones descritas en el presente documento pueden contener un único conservante. En otros ejemplos, las formulaciones contienen al menos dos conservantes diferentes o al menos tres conservantes diferentes. Por ejemplo, las formulaciones descritas en el presente documento pueden contener dos conservantes tales como L-fenilalanina y m-cresol, L-fenilalanina y metilparabeno, L-fenilalanina y fenol, m-cresol y metilparabeno, fenol y metilparabeno, m-cresol y fenol u otras combinaciones similares. En un ejemplo, el conservante en la formulación contiene al menos un conservante fenólico. Por ejemplo, la formulación contiene fenol, m-cresol o fenol y m-cresol.

En las formulaciones descritas en el presente documento, la cantidad total del o los agentes conservantes como un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) en la formulación puede ser, por ejemplo, entre de o entre aproximadamente de 0,1 % a 0,4 %, tal como 0,1 % a 0,3 %, 0,15 % a 0,325 %, 0,15 % a 0,25 %, 0,1 % a 0,2 %, 0,2 % a 0,3 % o 0,3 % a 0,4 %. En general, las formulaciones contienen menos de 0,4 % (p/v) de conservante. Por ejemplo, las co-formulaciones descritas en el presente documento contienen al menos o aproximadamente al menos 0,1 %, 0,12 %, 0,125 %, 0,13 %, 0,14 %, 0,15 %, 0,16 %, 0,17 %, 0,175 %, 0,18 %, 0,19 %, 0,2 %, 0,25 %, 0,3 %, 0,325 %, 0,35 % pero menos del 0,4 % de conservante total.

En algunos ejemplos, las formulaciones descritas en el presente documento contienen entre o entre aproximadamente 0,1 % y 0,25 % de fenol y entre o aproximadamente entre 0,05 % y 0,2 % de m-cresol, tal como entre o aproximadamente entre 0,10 % y 0,2 % de fenol y entre o aproximadamente entre 0,06 % y 0,18 % de m-cresol, o entre o aproximadamente entre 0,1 % y 0,15 % de fenol y entre o aproximadamente entre 0,08 % y 0,15 % de m-cresol. Por ejemplo, las formulaciones descritas en el presente documento contienen o contienen aproximadamente 0,1 % de fenol y 0,075 % de m-cresol; 0,1 % de fenol y 0,15 % de m-cresol; 0,125 % de fenol y 0,075 % de m-cresol; 0,13 % de fenol y 0,075 % de m-cresol; 0,13 % de fenol y 0,08 % de m-cresol; 0,15 % de fenol y 0,175 % de m-cresol; o 0,17 % de fenol y 0,13 % de m-cresol.

iv. Estabilizantes

En ejemplos del presente documento, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento opcionalmente pueden contener uno o más agentes estabilizantes adicionales para mantener la estabilidad del agente o los agentes activos (por ejemplo, hialuronidasa PH20). Se incluyen entre los tipos de estabilizantes que pueden estar contenidos en las formulaciones descritas en el presente documento aminoácidos, derivados de aminoácidos, aminas, azúcares, polioles, sales y tampones, tensioactivos y otros agentes. Las formulaciones descritas en el presente documento contienen al menos un estabilizante. Por ejemplo, las formulaciones descritas en el presente documento contienen al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más estabilizantes. Por lo tanto, pueden incluirse uno cualquiera o más de un aminoácido, derivados de aminoácidos, aminas, azúcares, polioles, sales y tampones, tensioactivos y otros agentes en las formulaciones del presente documento. En general, las formulaciones del presente documento contienen al menos un tensioactivo y un tampón apropiado. Opcionalmente, las formulaciones descritas en el presente documento pueden contener otros estabilizantes adicionales. Otros componentes incluyen, por ejemplo, uno o más modificadores de la tonicidad, uno o más agentes antioxidantes u otros estabilizantes.

Los estabilizantes de aminoácidos ejemplares, derivados de aminoácidos o aminas incluyen, pero sin limitación, L-Arginina, Glutamina, Glicina, Lisina, Metionina, Prolina, Lis-Lys, Gly-Gly, óxido de trimetilamina (TMAO) o betaína. Los azúcares y polioles ejemplares incluyen, pero sin limitación, glicerol, sorbitol, manitol, inositol, sacarosa o trehalosa. Las sales y tampones ejemplares incluyen, pero sin limitación, cloruro de magnesio, sulfato sódico, Tris tal como Tris (100 mM) o Benzoato sódico. Los tensioactivos ejemplares incluyen, pero sin limitación, poloxámero 188 (por ejemplo, Pluronic® F68), polisorbato 80 (PS80), polisorbato 20 (PS20). Otros estabilizantes incluyen, pero sin limitación, ácido hialurónico (HA), albúmina de suero humano (HSA), ácido fenilbutírico, ácido taurocólico, polivinilpirrolidona (PVP) o cinc.

En ejemplos particulares del presente documento, las formulaciones contienen uno o más detergentes, tales como tensioactivos, para mantener la estabilidad del agente o los agentes activos (por ejemplo, hialuronidasa PH20). Por ejemplo, los tensioactivos pueden inhibir la agregación de PH20 y minimizar la pérdida de absorción. Los tensioactivos en general son tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos que pueden incluirse en las formulaciones del presente documento incluyen, pero sin limitación, ésteres de ácidos grasos y parciales y éteres de alcoholes polihídricos tales como glicerol o sorbitol, poloxámeros y polisorbatos. Por ejemplo, los tensioactivos ejemplares en las formulaciones del presente documento incluyen uno cualquiera o más de poloxámero 188 (PLURONICS® tal como PLURONIC® F68), TETRONICS®, polisorbato 20, polisorbato 80, PEG 400, PEG 3000, Tween® (por ejemplo, Tween® 20 o Tween® 80), Triton® X-100, SPAN®, MYRJ®, BRIJ®, CREMOPHOR®, polipropilenglicoles o polietilenglicoles. En algunos ejemplos, las formulaciones del presente documento contienen poloxámero 188, polisorbato 20, polisorbato 80, generalmente poloxámero 188 (pluronic F68). Las formulaciones descritas en el presente documento generalmente contienen al menos un tensioactivo, tal como 1, 2 o 3 tensioactivos.

En las formulaciones descritas en el presente documento, la cantidad total del o los tensioactivos como un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) en la formulación puede ser, por ejemplo, entre de o entre aproximadamente de 0,005 % a 1,0 %, a 0,5 % tal como de 0,01 % a 0,1 % o de 0,01 % a 0,02 %. En general, las formulaciones contienen al menos 0,01 % de tensioactivo y contienen menos de 1,0 %, tal como menos de 0,5 % o menos de 0,1 % de tensioactivo. Por ejemplo, las formulaciones descritas en el presente documento pueden contener exactamente o aproximadamente 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,015 %, 0,02 %, 0,025 %, 0,03 %, 0,035 %, 0,04 %, 0,045 %, 0,05 %, 0,055 %, 0,06 %, 0,065 %, 0,07 %, 0,08 %, o 0,09 % de tensioactivo. En ejemplos particulares, las formulaciones descritas en el presente documento contienen o contienen aproximadamente de 0,01 % a o a aproximadamente 0,05 % de tensioactivo.

Pueden incluirse modificadores de tonicidad en la formulación descrita en el presente documento para producir una solución con la osmolalidad deseada. Las formulaciones descritas en el presente documento tienen una osmolalidad de entre o aproximadamente entre 245 mOsm/kg a 305 mOsm/kg. Por ejemplo, la osmolalidad es o es de aproximadamente 245 mOsm/kg, 250 mOsm/kg, 255 mOsm/kg, 260 mOsm/kg, 265 mOsm/kg, 270 mOsm/kg, 275 mOsm/kg, 280 mOsm/kg, 285 mOsm/kg, 290 mOsm/kg, 295 mOsm/kg, 300 mOsm/kg o 305 mOsm/kg. En algunos ejemplos, las formulaciones tienen una osmolalidad de o de aproximadamente 275 mOsm/kg. Los modificadores de la tonicidad incluyen, pero sin limitación, glicerina, NaCl, aminoácidos, polialcoholes, trehalosa y otras sales y/o azúcares. La cantidad particular puede determinarse empíricamente para conservar actividad enzimática y/o tonicidad.

En otros casos, se incluye glicerina (glicerol) en las formulaciones. Por ejemplo, las formulaciones descritas en el presente documento contienen típicamente glicerina menos de 60 mM, tal como menos de 55 mM, menos de 50 mM, menos de 45 mM, menos de 40 mM, menos de 35 mM, menos de 30 mM, menos de 25 mM, menos de 20 mM, menos de 15 mM, 10 mM o menos. La cantidad de glicerina depende típicamente de la cantidad de NaCl presente: cuanto más NaCl esté presente en la formulación, menos glicerina se requiere para conseguir la osmolalidad u osmolaridad deseada. Por lo tanto, por ejemplo, en formulaciones que contienen mayores concentraciones de NaCl, es necesario incluir poca glicerina o no es necesario incluir nada de glicerina en la formulación. Por el contrario, en formulaciones que contienen concentraciones de NaCl ligeramente menores, puede incluirse glicerina. Por ejemplo,

las formulaciones descritas en el presente documento pueden contener glicerina a una concentración de 40 mM a 60 mM, tal como menos de 50 mM, tal como de 20 mM a 50 mM, por ejemplo a o aproximadamente a 50 mM.

5 Las formulaciones descritas en el presente documento también pueden contener antioxidantes para reducir o
prevenir la oxidación, en particular oxidación del polipéptido de PH20. Por ejemplo, la oxidación puede efectuarse
por altas concentraciones de tensioactivo u oligómeros de hialuronano. Los antioxidantes ejemplares incluyen, pero
sin limitación, cisteína, triptófano y metionina. En ejemplos particulares, el antioxidante es metionina. Las
10 formulaciones descritas en el presente documento pueden incluir un antioxidante a una concentración de entre o de
aproximadamente entre 5 mM y o y aproximadamente 50 mM, tal como 5 mM y 40 mM, 5 mM y 20 mM o 10 mM y
20 mM. Por ejemplo, puede proporcionarse metionina en las formulaciones del presente documento a una
concentración de entre o de aproximadamente entre 5 mM y o y aproximadamente 50 mM, tal como 5 mM y 40 mM,
5 mM y 20 mM o 10 mM y 20 mM. Por ejemplo, puede incluirse un antioxidante, por ejemplo, metionina, a una
15 concentración que es o es aproximadamente 5 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM,
18 mM, 19 mM, 20 mM, 21 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM, 25 mM, 26 mM, 27 mM, 28 mM, 29 mM, 30 mM, 35 mM, 40
mM, 45 mM o 50 mM. En algunos ejemplos, las formulaciones contienen metionina de 10 mM a 20 mM, tal como
metionina a o aproximadamente a 10 mM o 20 mM.

Las formulaciones descritas en el presente documento también pueden contener un estabilizante de aminoácidos,
que contribuye a la estabilidad de la preparación. El estabilizante puede ser un aminoácido no polar o básico. Los
20 aminoácidos no polares y básicos ejemplares incluyen, pero sin limitación, alanina, histidina, arginina, lisina, ornitina,
isoleucina, valina, metionina, glicina y prolina. Por ejemplo, el aminoácido estabilizante es glicina o prolina,
típicamente glicina. El estabilizante puede ser un único aminoácido o puede ser una combinación de 2 o más de
dichos aminoácidos. Los aminoácidos estabilizantes pueden ser aminoácidos naturales, análogos de aminoácidos,
aminoácidos modificados o equivalentes de aminoácidos. En general, el aminoácido es un aminoácido L. Por
25 ejemplo, cuando se usa prolina como el estabilizante, esta es en general L-prolina. También es posible usar
equivalentes de aminoácidos, por ejemplo, análogos de prolina. La concentración de estabilizante de aminoácidos,
por ejemplo, glicina, incluido en la formulación varía de aminoácido 0,1 M a 1 M, típicamente de 0,1 M a 0,75 M,
generalmente de 0,2 M a 0,5 M, por ejemplo, al menos o aproximadamente 0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,25 M, 0,3 M,
0,35 M, 0,4 M, 0,45 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,7 M, 0,75 M o más aminoácido. El aminoácido, por ejemplo glicina, puede
30 usarse en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, tal como clorhidrato, bromhidrato, sulfato, acetato, etc. La
pureza del aminoácido, por ejemplo glicina, debería ser al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 99,5 % o más.

En ejemplos del presente documento, si es necesario, se incluyen inhibidores de hialuronidasa en una formulación
para estabilizar PH20, en particular para reducir los efectos de agentes y condiciones de otro modo
35 desestabilizantes, tales como, por ejemplo, baja salinidad, alto pH, la presencia de conservantes y temperaturas
elevadas, presentes en la formulación. Dicho componente en general no se requiere para composiciones
farmacéuticas que contengan un polipéptido de PH20 modificado como se describe en el presente documento que
muestre estabilidad aumentada en dichas condiciones. Cuando se proporciona, el inhibidor de hialuronidasa se
proporciona al menos a su concentración de equilibrio. Un experto en la materia está familiarizado con diversas
40 clases de inhibidores de hialuronidasa (véase por ejemplo, Girish *et al.* (2009) *Current Medicinal Chemistry*, 16:
2261-2288, y referencias citadas en la misma). Un experto en la materia conoce o puede determinar por métodos
convencionales en la técnica la concentración en equilibrio de un inhibidor de hialuronidasa en una reacción o
composición estable del presente documento.

45 Un inhibidor de hialuronidasa ejemplar para su uso en las composiciones del presente documento es hialuronano
(HA). El ácido hialurónico (HA, también conocido como hialuronano e hialuronato) es el sustrato natural para PH20.
HA es un glucosaminoglucano no sulfatado que está ampliamente distribuido por todos los tejidos conectivos,
epiteliales y neurales. Es un polímero de hasta 25.000 unidades de disacáridos, compuestos a su vez de ácido D-
glucurónico y D-N-acetilglucosamina. El peso molecular de HA varía de aproximadamente 5 kDa a 200.000 kDa.
50 Puede usarse cualquier tamaño de HA en las composiciones como un estabilizante. En algunos ejemplos, el HA es un
disacárido, compuesto de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina. En otros ejemplos, el HA es un
oligosacárido, tal como un tetrasacárido, que contiene 2 unidades de disacáridos repetidas, o como alternativa, el
HA usado en las coformulaciones descritas en el presente documento puede contener múltiples unidades de
disacáridos repetidas, tales como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o más unidades
55 de disacáridos. En otro ejemplo, el HA usado en las formulaciones descritas en el presente documento tiene un peso
molecular que es de o de aproximadamente 5 kDa a o a aproximadamente 5.000 kDa; de o de aproximadamente 5
kDa a o a aproximadamente 1.000 kDa; de o de aproximadamente 5 kDa a o a aproximadamente 500 kDa; o de o
de aproximadamente 5 kDa a o a aproximadamente 200 kDa. Los oligosacáridos de HA ejemplares para uso en las
formulaciones del presente documento tienen un peso molecular de o de aproximadamente 6,4 kDa, 74,0 kDa o
60 234,4 kDa. Las formulaciones pueden contener de 1 mg/ml a 20 mg/ml de HA, de 8 mg/ml a 12 mg/ml, tal como al
menos o aproximadamente 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10
mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml o 20 mg/ml o
más HA. En algunos ejemplos, la relación molar de HA con respecto a PH20 es o es de aproximadamente
100.000:1, 95.000:1, 90.000:1, 85.000:1, 80.000:1, 75.000:1, 70.000:1, 65.000:1, 60.000:1, 55.000:1, 50.000:1,
65 45.000:1, 40.000:1, 35.000:1, 30.000:1, 25.000:1, 20.000:1, 15.000:1, 10.000:1, 5.000:1, 1.000:1, 900 :1, 800:1,
700:1, 600:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1 o 100:1 o menos.

En algunos ejemplos, se usa un compuesto nicotínico como un agente estabilizante. Los compuestos nicotínicos incluyen, pero sin limitación, nicotinamida, ácido nicotínico, niacina, niacinamida, vitamina B3 y/o sales de los mismos y/o cualquier combinación de los mismos. En aplicaciones particulares, el agente estabilizante puede incluir un compuesto nicotínico, un aminoácido o aminoácidos (véase por ejemplo, Publicación Internacional n.º WO2010149772). Por ejemplo, el aminoácido puede ser arginina, ácido glutámico y/o sales de los mismos o combinaciones de los mismos.

2. Composiciones para otras vías de administración

10 Dependiendo de la afección tratada también se contemplan en el presente documento otras vías de administración, tales como aplicación tópica, parches transdérmicos, administración oral y rectal.

15 Por ejemplo, son formas de dosificación farmacéutica para administración rectal supositorios rectales, cápsulas y comprimidos para efecto sistémico. Los supositorios rectales incluyen cuerpos sólidos para inserción en el recto que se funden o se ablandan a la temperatura corporal liberando uno o más principios activos farmacológica o terapéuticamente. Son sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en supositorios rectales bases o vehículos y agentes para aumentar el punto de fusión. Los ejemplos de bases incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, carbowax (polioxietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono, di y triglicéridos de ácidos grasos. Pueden usarse combinaciones de las diversas bases. Los agentes para inducir el punto de fusión de 20 supositorios incluyen espermaceti y cera. Pueden prepararse supositorios rectales bien mediante el método de compresión o por moldeo. El peso típico de un supositorio rectal es de aproximadamente 2 a 3 g. Se fabrican comprimidos y cápsulas para administración rectal usando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y por los mismos métodos como para formulaciones para administración oral. Pueden proporcionarse formulaciones adecuadas para administración rectal como supositorios de dosis unitaria. Estos pueden prepararse mezclando el 25 compuesto activo con uno o más vehículos sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, y después moldeando la mezcla resultante.

30 Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno fosfato cálcico); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica.

35 Las formulaciones adecuadas para administración bucal (sublingual) incluyen, por ejemplo, grageas que contienen el compuesto activo en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; y pastillas que contienen el compuesto en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica.

40 Se preparan mezclas tópicas como se describe para la administración local y sistémica. Las mezclas resultantes pueden ser soluciones, suspensiones, 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 o cualquier otra formulación adecuada para 45 administración tópica.

50 Los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos pueden formularse como aerosoles para aplicación tópica, tal como por inhalación (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 4.044.126, 4.414.209 y 4.364.923, que describen aerosoles para 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 una solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, solas o en combinación con un vehículo inerte tal como lactosa. En dicho caso, las partículas de la formulación típicamente tendrán diámetros de menos de 50 micrómetros, o menos de 10 micrómetros.

55 Los compuestos pueden formularse para aplicación local o tópica, tal como para aplicación tópica a la piel y membranas mucosas, tales como en el ojo, en forma de geles, cremas y lociones y para aplicación al ojo o para aplicación intracisternal o intraespinal. Se contempla la administración tópica para suministro transdérmico y también para administración a los ojos o la mucosa, o para terapias de inhalación. También pueden administrarse soluciones nasales del compuesto activo solo o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

60 Se proporcionan formulaciones adecuadas para administración transdérmica. Pueden proporcionarse en cualquier formato adecuado, tal como parches discretos adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Dichos parches contienen el compuesto activo en una solución acuosa opcionalmente tamponada de, por ejemplo, 0,1 a 0,2 M de concentración con respecto al compuesto activo. También pueden suministrarse formulaciones adecuadas para administración transdérmica mediante iontoforesis 65 (véase, por ejemplo, Tyle, P, Pharmaceutical Research 3 (6): 318-326 (1986)) y típicamente toman la forma de una solución acuosa tamponada opcionalmente del compuesto activo.

También pueden administrarse composiciones farmacéuticas mediante formulaciones de liberación controlada y/o dispositivos de suministro (véase por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 3.536.809, 3.598.123, 3.630.200, 3.845.770, 3.916.899, 4.008.719, 4.769.027, 5.059.595, 5.073.543, 5.120.548 5.591.767, 5.639.476, 5.674.533 y 5.733.566).

5

3. Dosificaciones y administración

Los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento pueden formularse como composiciones farmacéuticas para administración en dosificación individual o dosificación múltiple. El polipéptido de PH20 se incluye en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios indeseables en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente ensayando los polipéptidos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos tal como usando los ensayos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Taliani *et al.* (1996) *Anal. Biochem.*, 240: 60-67; Filocamo *et al.* (1997) *J Virology*, 71: 1417-1427; Sudo *et al.* (1996) *Antiviral Res.* 32: 9-18; Bouffard *et al.* (1995) *Virology*, 209:52-59; Bianchi *et al.* (1996) *Axial. Biochem.*, 237: 239-244; Hamatake *et al.* (1996) *Intervirology* 39: 249-258; Steinkuhler *et al.* (1998) *Biochem.*, 37: 8899-8905; D'Souza *et al.* (1995) *J Gen. Virol.*, 76: 1729-1736; Takeshita *et al.* (1997) *Axial. Biochem.*, 247: 242-246; véase también por ejemplo, Shimizu *et al.* (1994) *J. Viol.* 68: 8406-8408; Mizutani *et al.* (1996) *J. Virol.* 70: 7219-7223; Mizutani *et al.* (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 227: 822-826; Lu *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 93: 1412-1417; Hahm *et al.*, (1996) *Virology*, 226: 318-326; Ito *et al.* (1996) *J. Gen. Virol.*, 77: 1043-1054; Mizutani *et al.* (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212: 906-911; Cho *et al.* (1997) *J. Virol. Meth.* 65:201-207) y después extrapolarse a partir de los mismos para dosificaciones para seres humanos.

La cantidad de una PH20 modificada para administrar para el tratamiento de una enfermedad o afección puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse ensayos *in vitro* y modelos animales para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosificación precisa, que puede determinarse de forma empírica, puede depender de la enzima particular, la vía de administración, el tipo de enfermedad para tratar y la gravedad de la enfermedad.

Por lo tanto, se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento están en función de la enfermedad que se trate y pueden determinarse de forma empírica usando protocolos de ensayo conocidos o mediante extrapolación a partir de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Debe observarse que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección para aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deberían ajustarse a lo largo del tiempo según las necesidades individuales y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración expuestos en el presente documento son solamente ejemplares y no se pretende que limiten el alcance o el uso de composiciones y combinaciones que los contienen. Las composiciones pueden administrarse cada hora, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o una vez. En general, se eligen regímenes de dosificación para limitar la toxicidad. Debería observarse que el médico a cargo sabrá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia para reducir la dosificación debido a toxicidad, o disfunciones de la médula ósea, hígado o riñón u otros tejidos. Por el contrario, el médico a cargo también sabrá cómo y cuándo ajustar el tratamiento a mayores niveles si la respuesta clínica no es adecuada (evitando efectos secundarios tóxicos).

Típicamente, una dosis terapéuticamente eficaz de una enzima PH20 modificada es o es de aproximadamente 10 unidades (U) a 500.000 unidades, de 100 unidades a 100.000 unidades, de 500 unidades a 50.000 unidades, de 1000 unidades a 10.000 unidades, de 5000 unidades a 7500 unidades, de 5000 unidades a 50.000 unidades, o de 1.000 unidades a 10.000 unidades, en general de 1.000 a 50.000 unidades, en una solución o suspensión estabilizada o una forma liofilizada. Por ejemplo, puede administrarse un polipéptido de PH20 a una dosis de al menos o aproximadamente al menos o 10 U, 20 U, 30 U, 40 U, 50 U, 100 U, 150 U, 200 U, 250 U, 300 U, 350 U, 400 U, 450 U, 500 U, 600 U, 700 U, 800 U, 900 U, 1000 U, 2.000 U, 3.000 U, 4.000 Unidades, 5.000 U o más. Las formulaciones pueden proporcionarse en formas de dosis unitaria tales como, pero sin limitación, ampollas, jeringas y comprimidos o cápsulas envasados individualmente.

La enzima PH20 puede administrarse sola o con otro agente u otros agentes farmacológicamente eficaces o agente o agentes terapéuticos, en un volumen total de 0,1-100 ml, 1-50 ml, 10-50 ml, 10-30 ml, 1-20 ml o 1-10 ml, típicamente 10-50 ml. Típicamente, los volúmenes de inyecciones o infusiones de una composición que contiene PH20 son de al menos o al menos aproximadamente 0,01 ml, 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml o más. Las formulaciones descritas en el presente documento contienen un polipéptido de PH20 modificado en una cantidad entre o aproximadamente entre 30 unidades/ml y 3000 U/ml, 300 U/ml y 2000 U/ml o 600 U/ml y 2000 U/ml o 600 U/ml y 1000 U/ml, tal como al menos o aproximadamente al menos 30 U/ml, 35 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 100 U/ml, 200 U/ml, 300 U/ml, 400 U/ml, 500 U/ml, 600 U/ml, 700 U/ml, 800 U/ml, 900 U/ml, 1000 U/ml, 2000 U/ml o 3000 U/ml. Por ejemplo, las formulaciones descritas en el presente documento contienen una PH20 que está en una cantidad que es al menos de 100 U/ml a 1000 U/ml, por ejemplo al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente o 600 U/ml.

El polipéptido de PH20 puede proporcionarse como una solución en una cantidad que es de al menos o aproximadamente o es de 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 300 U/ml, 400 U/ml, 500 U/ml, 600 U/ml, 800 U/ml o 1000 U/ml, o puede proporcionarse en una forma más concentrada, por ejemplo en una cantidad que es al menos o aproximadamente o es de 2000 U/ml, 3000 Unidades/ml, 4000 U/ml, 5000 U/ml, 8000 U/ml, 10.000 U/ml o 20.000 U/ml para su uso directamente o para dilución con la concentración eficaz antes de su uso. Las composiciones de polipéptidos de PH20 pueden proporcionarse como una formulación líquida o liofilizada.

Cuando la PH20 se coformula con un agente terapéutico, las dosificaciones pueden proporcionarse como una relación de la cantidad de un polipéptido de PH20 con respecto a la cantidad del agente terapéutico administrado. Por ejemplo, puede administrarse un polipéptido de PH20 a 1 U de hialuronidasa/U de agente terapéutico (1:1) a 50:1 o más, por ejemplo, a o aproximadamente a 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 20:1, 25 :1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1 o más.

Las formulaciones descritas en el presente documento, incluyendo coformulaciones y/o formulaciones estables, pueden prepararse para administración de dosis individual, administración de dosis múltiple o administraciones de infusión continua. También se contempla en el presente documento la implantación de un sistema de liberación lenta o liberación sostenida, de modo que se mantenga un nivel constante de dosificación (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 3.710.795).

Por ejemplo, se proporcionan formulaciones de compuestos farmacéuticamente terapéuticamente activos y derivados de los mismos para administración a seres humanos y animales en formas de dosificación unitaria o formas de dosificación múltiple. Por ejemplo, los compuestos pueden formularse como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles, soluciones o suspensiones orales o emulsiones de aceite-agua que contienen cantidades adecuadas de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de compuesto o compuestos terapéuticamente activos suficientes para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el transportador, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Los ejemplos de formas de dosis unitarias incluyen ampollas y jeringas y comprimidos o cápsulas envasados individualmente. Pueden administrarse formas de dosis unitaria en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitarias idénticas envasadas en un único recipiente para administrar en formas de dosis unitarias segregadas. Los ejemplos de formas de dosis múltiples incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas o frascos de pintas o galones. Por lo tanto, la forma de dosis múltiple es una multitud de dosis unitarias que no se segregan en el envasado. En general, pueden prepararse formas de dosificación o composiciones que contienen principio activo en el intervalo de 0,005 % a 100 % con el resto compuesto de vehículo no tóxico

Se formulan composiciones descritas en el presente documento típicamente para administración por vía subcutánea, aunque se contemplan otras vías de administración, tales como cualquier vía conocida por los expertos en la materia incluyendo administración intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intralesional, inyección intraperitoneal, epidural, vaginal, rectal, local, ótica, transdérmica o cualquier vía de administración. Los expertos en la materia conocen formulaciones adecuadas para dichas vías. La administración puede ser local, tópica o sistémica dependiendo del locus del tratamiento. La administración local a un área que necesita tratamiento puede conseguirse, por ejemplo, pero sin limitación, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito de herida después de cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante. También pueden administrarse composiciones con otros agentes biológicamente activos, bien secuencialmente, bien intermitentemente o bien en la misma composición.

La vía más adecuada en cualquier caso depende de una diversidad de factores, tales como la naturaleza de la enfermedad, la tolerancia del sujeto a una vía de administración particular, la gravedad de la enfermedad, y la composición particular que se use. Típicamente, las composiciones descritas en el presente documento se administran por vía parenteral. En algunos ejemplos, se administran composiciones de polipéptidos de PH20 modificados de modo que alcancen el intersticio de piel o tejidos, degradando de este modo el espacio intersticial para posterior suministro de un agente terapéutico. Por lo tanto, en algunos ejemplos, se contempla la administración directa bajo la piel, tal como mediante métodos de administración subcutánea. Por lo tanto, en un ejemplo, puede conseguirse administración local mediante inyección, tal como de una jeringa u otro artículo de fabricación que contiene un dispositivo de inyección tal como una aguja. En otro ejemplo, puede conseguirse administración local mediante infusión, lo que puede facilitarse mediante el uso de una bomba u otro dispositivo similar. También se contemplan otros modos de administración. Por ejemplo, pueden administrarse por vía intravenosa polipéptidos de PH20 modificados, incluyendo formas conjugadas con semivida aumentada tales como formas PEGiladas de los mismos. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

Pueden emplearse métodos de administración para reducir la exposición de polipéptidos de PH20 modificados seleccionados a procesos degradantes, tales como degradación proteolítica e intervención inmunológica mediante respuestas antigénicas e inmunogénicas. Los ejemplos de dichos métodos incluyen administración local en el sitio de tratamiento. La PEGilación de productos terapéuticos aumenta la resistencia a la proteólisis, aumenta la semivida en plasma y reduce la antigenicidad e inmunogenicidad. Se conocen en la técnica ejemplos de metodologías de

PEGilación (véase por ejemplo, Lu y Felix, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 43: 127-138, 1994; Lu y Felix, *Peptide Res.*, 6: 140-6, 1993, Felix *et al.*, *Int. J. Peptide Res.*, 46: 253-64, 1995, Benhar *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269: 13398-404, 1994; Brumeanu *et al.*, *J. Immunol.*, 154: 3088-95, 1995, véase también Caliceti *et al* (2003) *Adv. Drug Rev.* 55 (10): 1261-77 y Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S). También puede usarse PEGilación en el suministro de moléculas de ácido nucleico *in vivo*. Por ejemplo, la PEGilación de adenovirus puede aumentar la estabilidad y la transferencia génica (véase, por ejemplo, Cheng *et al.* (2003) *Pharm. Res.* 20 (9): 1444-51).

Se conocen diversos otros sistemas de suministro y pueden utilizarse para administrar polipéptidos de PH20 seleccionados, tales como pero sin limitación, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor y suministro de moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de PH20 seleccionados tales como sistemas de suministro de retrovirus.

Por lo tanto, en ciertos ejemplos, también pueden emplearse liposomas y/o nanopartículas con la administración de polipéptidos de PH20 solubles. Se forman liposomas a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y espontáneamente forman vesículas de bicapas concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (MLV)). Las MLV tienen en general diámetros de 25 nm a 4 μ m. La sonicación de MLV da como resultado la formación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 angstroms que contienen una solución acuosa en el núcleo.

Los fosfolípidos pueden formar una diversidad de estructuras distintas de liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la relación molar del lípido con respecto a agua. A relaciones bajas del lípido con respecto a agua, se forman liposomas. Las características físicas de liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden mostrar baja permeabilidad frente a sustancias iónicas y polares, pero a temperaturas elevadas experimentan una transición de fase que altera notablemente su permeabilidad. La transición de fase implica un cambio desde una estructura estrechamente empaquetada, ordenada, conocida como el estado de gel, a una estructura poco empaquetada, menos ordenada, conocida como el estado fluido. Esto sucede a una temperatura de transición de fase característica y da como resultado un aumento de la permeabilidad a iones, azúcares y fármacos.

Los liposomas interactúan con células mediante diferentes mecanismos: endocitosis mediante células fagocíticas del sistema reticuloendotelial tales como macrófagos y neutrófilos; adsorción a la superficie celular, bien mediante fuerzas hidrófobas o electrostáticas débiles no específicas, o bien mediante interacciones específicas con componentes de la superficie celular; fusión con la membrana de célula plasmática mediante inserción de la bicapa lipídica del liposoma en la membrana plasmática, con liberación simultánea de contenidos liposómicos al citoplasma; y mediante transferencia de lípidos liposómicos a membranas celulares o subcelulares, o viceversa, sin ninguna asociación de los contenidos del liposoma. La variación de la formulación del liposoma puede alterar el mecanismo que está operativo, aunque pueden actuar más de uno al mismo tiempo. Las nanocápsulas generalmente pueden inmovilizar compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debido a sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (de un tamaño de aproximadamente 0,1 μ m) deberían diseñarse usando polímeros que pueden degradarse *in vivo*. Se contemplan para su uso en el presente documento nanopartículas de polialquil-cianoacrilato biodegradables que cumplen estos requisitos, y dichas partículas pueden prepararse fácilmente.

4. Co-formulación de insulina-PH20 ejemplar.

Se describen en el presente documento co-formulaciones estables de una insulina de acción rápida, tal como un análogo de insulina de acción rápida (acción veloz) y un polipéptido de PH20 modificado. Puede incluirse cualquiera de los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento en una co-formulación con insulina, tal como cualquiera de las co-formulaciones descritas en la Solicitud de Estados Unidos n.º Serie 13/507.263 o 13/507.262 o en una Solicitud de PCT Internacional n.º de Serie PCT/US2012/042816.

En particular, el polipéptido de PH20 modificado es un polipéptido PH20 modificado que muestra estabilidad aumentada en condiciones de desnaturalización, tales como cualquiera expuesta en las Secciones C.1.b. En particular, el polipéptido de PH20 es un polipéptido de PH20 modificado que muestra estabilidad aumentada con respecto a uno o más conservantes fenólicos, tal como cualquiera expuesto en la Sección C.1.b.i. Por ejemplo, el polipéptido de PH20 es un polipéptido PH20 modificado que contiene un reemplazo de aminoácido con P en una posición correspondiente a la posición 204 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3, tal como F204P en referencia a cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7 o 32-66. En otros ejemplos, el polipéptido de PH20 es un polipéptido de PH20 modificado que contiene un reemplazo de aminoácido con R en una posición correspondiente a la posición 58 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3, tal como V58R en referencia a cualquiera de SEQ ID NO: 3, 7 o 32-66.

La insulina de acción rápida puede ser una insulina regular o un análogo de insulina de acción rápida (acción veloz). La insulina es un polipéptido que cuando se procesa está compuesto de 51 aminoácidos que contienen una cadena A y B. En general, la insulina contiene una cadena A de aproximadamente 21 aminoácidos y una cadena B de aproximadamente 30 aminoácidos. Las cadenas A y B se unen por enlaces disulfuro. Las insulinas regulares

ejemplares incluyen, por ejemplo, una insulina humana (con una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 862 y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 863) o una insulina porcina (con una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta como las posiciones de restos de aminoácidos 88-108 de SEQ ID NO: 864, y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta como las posiciones de restos de aminoácidos 25-54 de SEQ ID NO: 864). Son análogos de insulina de acción rápida ejemplares variantes de insulina que contienen una o más modificaciones de aminoácidos en comparación con una insulina humana expuesta en SEQ ID NO: 862 y 863 (cadenas A y B). Por ejemplo, los expertos en la materia conocen análogos de insulina ejemplares, e incluyen, pero sin limitación, glulisina que tiene una cadena expuesta en SEQ ID NO: 862 y una cadena B que es una variante de SEQ ID NO: 863 (cadena B; LysB3, GluB29), HMR-1 153 que tiene una cadena A expuesta en SEQ ID NO: 862 y una cadena B que es una variante de SEQ ID NO: 863 (cadena B; LysB3, IleB28), insulina aspart que tiene una cadena A expuesta en SEQ ID NO: 862 y una cadena B que es una variante de SEQ ID NO: 863 (cadena B; AspB28), e insulina lispro que tiene una cadena A expuesta en SEQ ID NO: 862 y una cadena B que es una variante de SEQ ID NO: 863 (cadena B; LysB28, ProB29). En cada caso anterior, la nomenclatura de los análogos se basa en una descripción de la sustitución de aminoácido en posiciones específicas en la cadena A o B de insulina, numeradas desde el extremo N de la cadena, en la que el resto de la secuencia es de insulina humana natural. Se exponen ejemplos de dichas formas análogas en SEQ ID NO: 862 (cadena A) y que tienen una cadena B expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 865-867.

Las co-formulaciones son estables como una formulación líquida durante periodos de tiempo prolongados durante al menos 1 mes a temperaturas de o de aproximadamente 2 °C a 8 °C, inclusive, o durante al menos 3 días a una temperatura de o de aproximadamente 30 °C a 42 °C, inclusive. Por ejemplo, las co-formulaciones son estables y conservan actividad de la hialuronidasa PH20 e insulina en condiciones de "refrigerador", por ejemplo, de 2 °C a 8 °C, tal como a o aproximadamente 4 °C, durante al menos 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, o 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, 13 meses, 14 meses, 15 meses, 16 meses, 17 meses, 18 meses, 19 meses, 20 meses, 21 meses, 22 meses, 23 meses, 24 meses, 25 meses, 26 meses, 27 meses, 28 meses, 29 meses o 30 meses o más. En otro ejemplo, las formulaciones descritas en el presente documento son estables y conservan actividad de la hialuronidasa PH20 e insulina a temperatura ambiente por ejemplo de 18 °C a 32 °C, en general de 20 °C a 32 °C, tal como de 28 °C a 32 °C, durante al menos 2 semanas a 1 año, por ejemplo, al menos 3 semanas, 4 semanas, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses o al menos 1 año o más. En un ejemplo adicional, las formulaciones descritas en el presente documento son estables y conservan actividad de la hialuronidasa PH20 e insulina a temperaturas elevadas de aproximadamente o más de 30 °C, en general de o de aproximadamente 30 °C a 42 °C, tal como de 32 °C a 37 °C o de 35 °C a 37 °C o de aproximadamente o 37 °C durante al menos 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 20 días, 21 días, 22 días, 23 días, 24 días, 25 días, 26 días, 27 días, 28 días, 29 días, 30 días, 35 días, 40 días, 45 días, 50 días, 60 días o más.

Los expertos en la materia conocen bien ensayos para evaluar la estabilidad de agentes activos. La sección G proporciona ensayos ejemplares para evaluar la estabilidad de hialuronidasa PH20. La estabilidad de insulina puede evaluarse usando métodos similares bien conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, la estabilidad y solubilidad de insulina puede evaluarse mediante evaluación visual (por ejemplo, incluyendo cambios de color, claridad, presencia de agregados o agrupamiento y adhesión de material, o escarchado), clarificación con ácido, microscopía óptica, cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC), bioensayos *in vitro* o *in vivo* y cromatografía de exclusión por tamaño desnaturalizante y no desnaturalizante (SEC). Los bioensayos *in vitro* o *in vivo* para actividad de insulina incluyen, pero sin limitación, un ensayo de unión competitiva que usa células que expresan receptores de insulina (por ejemplo, membranas de células placentarias humanas) y una insulina radiomarcada (véase por ejemplo, Weiss *et al.*, (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 40018-40024; Duttaroy *et al.*, (2005) *Diabetes* 54: 251-258); captación de glucosa estimulada por insulina (Louveau *et al.*, (2004) *J Endocrin.* 181: 271-280, Duttaroy *et al.*, (2005) *Diabetes* 54: 251-258); ensayos para evaluar la producción de glucosa en presencia de insulina (Wang *et al.*, (2000) *J. Biochem.*, 275: 14717-14721, Duttaroy *et al.*, (2005) *Diabetes* 54: 251-258); y estudios que usan modelos animales diabéticos y/o sanos (Atkinson *et al.*, (1999) *Nature Med.* 5: 601-604); ratones Nagoya-Shibata-Yasuda (NSY), ratas gordas diabéticas de Zucker (ZDF) y ratas Gato-Katazaki (GK) (Cefalu (2006) *ILAR Journal* 47: 186-198).

Los ejemplos de dichas formulaciones contienen de 100 U/ml a 1000 U/ml de un polipéptido de PH20, y en particular a o aproximadamente o al menos 600 U/ml; 10 U/ml a 1000 U/ml de una insulina de acción rápida, y en particular a o al menos o aproximadamente a 100 U/ml; NaCl a una concentración de entre o aproximadamente entre 80-140 mM; un pH de entre o aproximadamente entre 7,0 y 7,8; un agente tamponante que mantiene el intervalo de pH de entre o de aproximadamente entre 7,0 y 7,8; de 0,1 % a 0,4 % de conservante como una concentración en masa (p/v). Opcionalmente, puede incluirse un agente estabilizante adicional. Por ejemplo, las co-formulaciones descritas en el presente documento contiene de 1 mM a 100 mM de un agente tamponante. Por ejemplo, las co-formulaciones descritas en el presente documento contienen de 0,005 % a 0,5 % de tensioactivo. Las co-formulaciones ejemplares descritas en el presente documento también pueden contener glicerina (glicerol) menos 60 mM y antioxidante de 2 mM a o a aproximadamente 50 mM.

Las siguientes formulaciones estables son ejemplares solamente y proporcionan una plataforma a partir de la que puede realizarse ajustes menores. Se entiende que pueden realizarse cambios muy pequeños en las concentraciones de los diversos excipientes y otros componentes (por ejemplo, $\pm 15\%$ de las concentraciones indicadas), o cambios pequeños en el pH, conservando al mismo tiempo parte de si no toda la solubilidad y estabilidad de insulina y estabilidad de PH20. También puede realizarse cambios adicionales añadiendo o retirando excipientes. Por ejemplo, puede cambiarse el tipo de tensioactivo estabilizante.

Por ejemplo, las co-formulaciones ejemplares en el presente documento contienen de 100 U/ml a 1000 U/ml de un polipéptido de PH20 modificado, y en particular al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 600 U/ml de un polipéptido de PH20 modificado; de 10 U/ml a 1000 U/ml de una insulina de acción rápida, y en particular al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 100 U/ml de una insulina de acción rápida; Tris de o de aproximadamente 10 mM a o a aproximadamente 50 mM (por ejemplo, Tris de o de aproximadamente 20 mM a 40 mM, tal como o como aproximadamente Tris 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM o 40 mM); NaCl de o de aproximadamente 80 mM a o a aproximadamente 160 mM (por ejemplo NaCl a o aproximadamente a 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM o 160 mM), metionina de o de aproximadamente 2 mM a o a aproximadamente 50 mM (por ejemplo, metionina a o aproximadamente a 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM); glicerina de o de aproximadamente 0 mM a o a aproximadamente 50 mM (por ejemplo, glicerina a o aproximadamente a 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM); poloxámero 188 de o de aproximadamente 0,005 % a o a aproximadamente 0,5 %, tal como de 0,01 % a 0,05 % (por ejemplo, poloxámero 188 a o aproximadamente a 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 % o 0,05 %); fenol de o de aproximadamente 0,05 % a o aproximadamente 0,25 % (por ejemplo, fenol a o aproximadamente a 0,1 %, 0,12 %, 0,125 %, 0,13 %, 0,14 %, 0,15 %, 0,16 % o 0,17 %); y m-cresol de o de aproximadamente 0,05 % a o aproximadamente 0,4 % (por ejemplo, m-cresol a o aproximadamente a 0,075 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,12 %, 0,13 %, 0,14 %, 0,15 %, 0,16 % o 0,17 %). Las formulaciones se preparan con un pH de o de aproximadamente 7,0 a o a aproximadamente 7,6 (por ejemplo, a o aproximadamente a pH 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 o 7,6). En ejemplos adicionales, se incluye cinc a una concentración de o aproximadamente de 0,017 mg/100 U, 0,018 mg/100 U, 0,02 mg/100 U, 0,022 mg/100 U o 0,024 mg/100 U de insulina.

En ejemplos particulares, la insulina de acción rápida es insulina aspart, insulina lispro o insulina glulisina. Son co-formulaciones ejemplares descritas en el presente documento que contienen un polipéptido de PH20 modificada e insulina lispro las que contienen Tris de o aproximadamente de 25 mM a o a aproximadamente 35 mM (por ejemplo, Tris a o aproximadamente 30 mM); NaCl de o de aproximadamente 70 mM a o a aproximadamente 100 mM (por ejemplo, NaCl a o aproximadamente 80 mM o 100 mM); metionina de o de aproximadamente 10 mM a o a aproximadamente 30 mM (por ejemplo, metionina a o aproximadamente 10 mM o 20 mM); glicerina de o de aproximadamente 40 mM a o a aproximadamente 60 mM (por ejemplo, glicerina a o aproximadamente 50 mM); poloxámero 188 de o de aproximadamente 0,005 % a o a aproximadamente 0,05 % (por ejemplo, poloxámero 188 a o a aproximadamente 0,01 %); de o de aproximadamente 0,017 mg de cinc/100 U de insulina a o a aproximadamente 0,024 mg de cinc/100 U de insulina (por ejemplo, 0,017 mg de cinc/100 U de insulina, 0,018 mg/100 U, 0,02 mg/100 U, 0,022 mg/100 U o 0,024 mg de cinc/100 U de insulina); fenol de o de aproximadamente 0,08 % a o a aproximadamente 0,17 % (por ejemplo, fenol 0,1 %, 0,125 % o 0,13 %); y m-cresol de o de aproximadamente 0,07 % a o a aproximadamente 0,17 % (por ejemplo, m-cresol 0,075 %, 0,08 %, 0,13 % o 0,15 %). Por ejemplo, las co-formulaciones pueden contener fenol a o aproximadamente 0,1 % y m-cresol 0,015 %; fenol a o aproximadamente 0,125 % y m-cresol 0,075 %; fenol a o aproximadamente 0,13 % y m-cresol 0,075 %; fenol a o aproximadamente 0,13 % y m-cresol 0,08 %; o fenol a o aproximadamente 0,17 % y m-cresol 0,13 %. Dichas formulaciones de insulina lispro y un polipéptido de PH20 modificado se preparan con un pH de o de aproximadamente de 7,0 a o a aproximadamente 7,5 (típicamente un pH de o aproximadamente de pH 7,2).

Son co-formulaciones ejemplares descritas en el presente documento que contienen un polipéptido de PH20 modificado e insulina aspart los que contienen Tris de o de aproximadamente 25 mM a o a aproximadamente 35 mM (por ejemplo, Tris a o aproximadamente 30 mM); NaCl de o de aproximadamente 70 mM a o a aproximadamente 120 mM (por ejemplo, NaCl a o aproximadamente 80 mM o 100 mM); metionina de o de aproximadamente 2 mM a o a aproximadamente 30 mM, tal como de 2 mM a 10 mM o de 5 mM a 30 mM (por ejemplo, metionina a o aproximadamente a 5 mM, 10 mM o 20 mM); poloxámero 188 de o de aproximadamente 0,005 % a o a aproximadamente 0,05 % (por ejemplo, poloxámero 188 a o aproximadamente 0,01 %); fenol de o de aproximadamente 0,08 % a o a aproximadamente 0,17 % (por ejemplo, fenol 0,1 %, 0,125 % o 0,13 %); y m-cresol de o de aproximadamente 0,07 % a o a aproximadamente 0,17 % (por ejemplo, m-cresol 0,075 %, 0,08 %, 0,13 % o 0,15 %). Por ejemplo, las co-formulaciones pueden contener fenol a o aproximadamente 0,1 % y m-cresol 0,015 %; fenol a o aproximadamente 0,125 % y m-cresol 0,075 %; fenol a o aproximadamente 0,13 % y m-cresol 0,075 %; fenol a o aproximadamente 0,13 % y m-cresol 0,08 %; o fenol a o aproximadamente 0,17 % y m-cresol 0,13 %. Dichas formulaciones de insulina aspart y un polipéptido de PH20 modificado se preparan con un pH de o de aproximadamente 7,0 a o a aproximadamente 7,6 (típicamente un pH de o aproximadamente pH 7,4 o 7,3).

Son formulaciones ejemplares adicionales descritas en el presente documento que contienen un polipéptido de PH20 modificado e insulina aspart las que no contienen fenol. Dichas formulaciones ejemplares contienen Tris de o de aproximadamente 25 mM a o a aproximadamente 35 mM (por ejemplo, Tris a o aproximadamente 30 mM); NaCl de o de aproximadamente 70 mM a o a aproximadamente 120 mM (por ejemplo, NaCl a o aproximadamente 80 mM

o 100 mM); metionina de o de aproximadamente 2 mM a o a aproximadamente 30 mM, tal como metionina 2 mM a 10 mM o 5 mM a 30 mM (por ejemplo, metionina a o aproximadamente a 5 mM, 10 mM o 20 mM); poloxámero 188 de o de aproximadamente 0,005 % a o a aproximadamente 0,05 % (por ejemplo, poloxámero 188 a o aproximadamente 0,01 %); y m-cresol de o de aproximadamente 0,07 % a o a aproximadamente 0,4 %, tal como m-cresol de o de aproximadamente 0,2 % a 0,4 % (por ejemplo, m-cresol 0,3 %, 0,315 %, 0,35 %, 0,4 %). Dichas formulaciones de insulina aspart y polipéptido de PH20 modificado se preparan con un pH de o aproximadamente de 7,0 a o a aproximadamente 7,6 (típicamente un pH de o aproximadamente de pH 7,4 o 7,3).

Son co-formulaciones ejemplares descritas en el presente documento que contienen un polipéptido de PH20 modificado e insulina glulisina las que contienen Tris de o de aproximadamente 25 mM a o a aproximadamente 35 mM (por ejemplo, Tris a o aproximadamente 30 mM); NaCl de o de aproximadamente 100 mM a o a aproximadamente 150 mM (por ejemplo, NaCl a o aproximadamente 100 mM o 140 mM); metionina de o de aproximadamente 10 mM a o a aproximadamente 30 mM (por ejemplo, metionina a o aproximadamente 10 mM o 20 mM); glicerina de o de aproximadamente 40 mM a o a aproximadamente 60 mM (por ejemplo, glicerina a o aproximadamente 50 mM); poloxámero 188 de o de aproximadamente 0,005 % a o a aproximadamente 0,05 % (por ejemplo, poloxámero 188 a o aproximadamente 0,01 %); fenol de o de aproximadamente 0,08 % a o a aproximadamente 0,17 % (por ejemplo, fenol 0,1 %, 0,125 % o 0,13 %); y m-cresol de o de aproximadamente 0,07 % a o a aproximadamente 0,17 % (por ejemplo, m-cresol 0,075 %, 0,08 %, 0,13 % o 0,15 %). Por ejemplo, las co-formulaciones pueden contener fenol a o aproximadamente 0,1 % fenol y m-cresol 0,015 %; fenol a o aproximadamente 0,125 % y m-cresol 0,075 %; fenol a o aproximadamente 0,13 % y m-cresol 0,075 %; fenol a o aproximadamente 0,13 % y m-cresol 0,08 %; o fenol a o aproximadamente 0,17 % y m-cresol 0,13 %. Dichas formulaciones de insulina glulisina y un polipéptido de PH20 modificado se preparan con un pH de o aproximadamente de 7,0 a o a aproximadamente 7,6 (típicamente un pH de o aproximadamente pH 7,4).

5. Envasado, artículos de fabricación y kits

Pueden envasarse compuestos farmacéuticos de polipéptidos de PH20 modificados, o ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos, o derivados o variantes de los mismos como artículos de fabricación que contienen material de envasado, una composición farmacéutica que es eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno, y un marcador que indica que la composición farmacéutica o molécula terapéutica va a usarse para tratar la enfermedad o el trastorno. También pueden envasarse en un artículo de fabricación combinaciones de un polipéptido de PH20 modificado seleccionado, o un derivado o variante del mismo y un agente terapéutico.

Los artículos de fabricación descritos en el presente documento contienen materiales de envasado. Los expertos en la materia conocen bien materiales de envasado para su uso en el envasado de productos farmacéuticos. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 5.323.907, 5.052.558 y 5.033.252. Los ejemplos de materiales envasados farmacéuticos incluyen, pero sin limitación, paquetes de blíster, frascos, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, botellas, y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y modo pretendido de administración y tratamiento. Los artículos de fabricación pueden incluir una aguja u otro dispositivo de inyección para facilitar la administración (por ejemplo, administración sub-epidérmica) para fines de inyección local. Se contempla una amplia serie de formulaciones de los compuestos y composiciones descritos en el presente documento incluyen un polipéptido de PH20 modificado y un agente terapéutico, tal como una insulina de acción rápida, que se sabe que trata una enfermedad o trastorno particular. La elección del envase depende de la PH20 y/o el agente terapéutico, y si dichas composiciones se envasaran juntas o por separado. En un ejemplo, la PH20 puede envasarse como una mezcla con el agente terapéutico. En otro ejemplo, los componentes pueden envasarse como composiciones separadas.

También pueden tratarse como kits polipéptidos de PH20 modificados, agentes terapéuticos y/o artículos de fabricación de los mismos. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en el presente documento y un artículo para administración proporcionado como un artículo de fabricación. Por ejemplo, un polipéptido de PH20 puede proporcionarse con un dispositivo para administración, tal como una jeringa, un inhalador, una copa de dosificación, un gotero o un aplicador. Las composiciones pueden estar contenidas en el artículo para administración o pueden proporcionarse por separado para añadir posteriormente. El kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones para aplicación incluyendo dosificaciones, regímenes de dosificación e instrucciones para modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica descrita en el presente documento y un artículo para diagnóstico. Por ejemplo, dichos kits pueden incluir un artículo para medir la concentración, cantidad o actividad de la proteasa seleccionada en un sujeto.

G. Métodos para evaluar la actividad y estabilidad de PH20

Pueden usarse ensayos para evaluar la estabilidad y la actividad de los polipéptidos de PH20 descritos en el presente documento. Los ensayos pueden usarse para evaluar la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 en condiciones particulares, temperatura y/o a lo largo del tiempo. Dichos ensayos pueden usarse, por ejemplo, para determinar la estabilidad del polipéptido de PH20 en condiciones de desnaturalización específicas, incluyendo, pero sin limitación, temperaturas elevadas mayores de o aproximadamente o 30 °C (por ejemplo, de 30 °C a 42 °C tal como o aproximadamente 37 °C), agitación, presencia de excipientes (por ejemplo, conservante), o baja NaCl o

ausencia de NaCl (sal). Por ejemplo, la estabilidad en condiciones específicas puede supervisarse evaluando la actividad, solubilidad y estabilidad (por ejemplo, formación de agregados, etc.) en ausencia de exposición a la condición de desnaturalización y después en diversos puntos temporales en lo sucesivo en presencia de la condición. Por lo tanto, la estabilidad puede evaluarse a lo largo del tiempo. La estabilidad también puede evaluarse comparando uno cualquiera o más de actividad, solubilidad o agregación en presencia de una o más condiciones de desnaturalización en comparación con un polipéptido de PH20 nativo, de tipo silvestre o de referencia. Los ensayos también pueden usarse para realizar pequeños ajustes a las formulaciones descritas en el presente documento conservando al mismo tiempo la estabilidad de ambos agentes activos.

1. Actividad hialuronidasa

La actividad de un polipéptido de PH20 modificado puede evaluarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ensayo de USP XXII para hialuronidasa determina la actividad indirectamente midiendo la cantidad de sustrato de ácido hialurónico no degradado o hialuronano, (HA) que permanece después de que se permita que la enzima reaccione con el HA durante 30 min a 37 °C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Puede usarse un Patrón de Referencia de Hialuronidasa (USP) o solución de Hialuronidasa Patrón del Formulario Nacional (NF) en un ensayo para determinar la actividad, en unidades, de cualquier hialuronidasa. En un ejemplo, la actividad se mide usando un ensayo de microturbidez. Este se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une con un reactivo que lo precipita, tal como suero acidificado o cloruro de cetilpiridinio (CPC). La actividad se mide incubando hialuronidasa con hialuronato sódico (ácido hialurónico) durante un periodo de tiempo establecido (por ejemplo, 10 minutos) y precipitando después el hialuronato sódico no digerido con la adición de suero acidificado o CPC. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un periodo de desarrollo adicional. La reducción de la turbidez que resulta de la actividad hialuronidasa en el sustrato de hialuronato sódico es una medida de la actividad enzimática hialuronidasa.

En otro ejemplo, la actividad hialuronidasa se mide usando un ensayo de microtitulación en el que se mide el ácido hialurónico biotinilado residual después de incubación con hialuronidasa (véase por ejemplo, Frost y Stern (1997) *Axial. Biochem.* 251: 263-269, publicación de patente de Estados Unidos n.º 20050260186). Los grupos carboxilo libres en los restos de ácido glucurónico de ácido hialurónico están biotinilados, y el sustrato de ácido hialurónico biotinilado está acoplado covalentemente a una placa de microtitulación. Después de incubación con hialuronidasa, el sustrato de ácido hialurónico biotinilado residual se detecta usando una reacción de avidina-peroxidasa, y se compara con el obtenido después de la reacción con patrones de hialuronidasa de actividad conocida.

Se conocen en la técnica otros ensayos para medir la actividad hialuronidasa y pueden usarse en los métodos del presente documento (véase, por ejemplo., Delpech *et al.*, (1995) *Anal. Biochem.* 229: 35-41; Takahashi *et al.*, (2003) *Anal. Biochem.* 322: 257-263).

Muchos ensayos de hialuronidasa se han basado en la medición de la generación de nuevos grupos de N-acetilamino reductores (Bonner y Cantey, *Clin. Chim. Acta* 13: 746-752, 1966), o pérdida de viscosidad (De Saiegui *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 121: 548-554, 1967) o turbidez (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 la actividad endoglucosidasa.

También pueden usarse sustratos de glucosaminoglucanos sustancialmente purificados en un ensayo de desplazamiento en gel. Los glucosaminoglucanos se mezclan con PH20 recombinante, tal como una PH20 soluble, para ensayar con respecto a actividad endoglucosidasa que da como resultado un desplazamiento en la movilidad del sustrato dentro del gel. Los ejemplos de dichos sustratos incluyen, pero sin limitación, condroitín-4 y 6 sulfato, dermatán sulfato, heparán-sulfato, que pueden obtenerse de Sigma Chemical. Puede obtenerse hialuronano del cordón umbilical humano de ICN. Por ejemplo, cada sustrato de ensayo puede diluirse hasta a aproximadamente 0,1 mg/ml en un intervalo de tampón de pH 3,5-7,5. En dicho ensayo ejemplar, pueden mezclarse muestras de o de aproximadamente 10 µl de PH20 soluble purificada o medio acondicionado de células que expresan PH20 con o aproximadamente con 90 µl de sustrato de ensayo en tampón deseado e incubarse durante 3 horas a 37 °C. Después de la incubación, las muestras se neutralizan con tampón de muestra (Tris EDTA pH 8,0, azul bromofenol y glicerol) seguido de electroforesis. Pueden detectarse glucosaminoglucanos usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, pueden detectarse, glucosaminoglucanos tiñendo los geles usando azul alciano 0,5 % en ácido acético glacial 3 % durante una noche seguido de decoloración en ácido acético glacial 7 %. La degradación se determina por comparación de movilidad de sustrato en presencia y ausencia de enzima.

La actividad hialuronidasa también puede detectarse por zimografía en gel de sustrato (Guentenhoner *et al.* (1992) *Matrix* 12: 388-396). En este ensayo, se aplica una muestra a un gel de SDS-PAGE que contiene ácido hialurónico y las proteínas en la muestra se separaron por electroforesis. El gel se incubó después en un tampón de ensayo de enzima y posteriormente se tiñe para detectar el ácido hialurónico en el gel. La actividad se visualiza como una zona aclarada en el gel de sustrato.

La capacidad de un polipéptido de PH20, incluyendo un polipéptido de PH20 modificado descrito en el presente

documento, para actuar como agente de propagación o difusión también puede evaluarse. Por ejemplo, puede inyectarse colorante de azul de tripano por vía subcutánea con o sin un polipéptido de PH20 en la piel lateral en cada lado de ratones desnudos. Después se mide el área coloreada, tal como con un microcalibrador, para determinar la capacidad del polipéptido de PH20 para actuar como un agente de propagación (publicación de patente de Estados Unidos n.º 20060104968).

La actividad funcional de un polipéptido de PH20 puede compararse y/o normalizarse con respecto a un patrón de referencia usando cualquiera de estos ensayos. Esto puede realizarse para determinar cuál es una cantidad funcionalmente equivalente de un polipéptido de PH20. Por ejemplo, la capacidad de un polipéptido de PH20 para actuar como un agente de propagación y difusión puede evaluarse inyectándolo en la piel lateral de ratones con azul de tripano, y puede determinarse la cantidad requerida para conseguir la misma cantidad de difusión como, por ejemplo, 100 unidades de un patrón de referencia. La cantidad de polipéptido de PH20 requerida es, por lo tanto, funcionalmente equivalente a 100 unidades de hialuronidasa.

2. Solubilidad

La solubilidad de un polipéptido de PH20 puede determinarse por cualquier método conocido por un experto en la materia. Un método para determinar la solubilidad es división por detergente. Por ejemplo, puede distinguirse un polipéptido de PH20 soluble, por ejemplo, por su división en la fase acuosa de una solución de Triton® X-114 a 37 °C (Bordier *et al.*, (1981) J. Biol. Chem., 256: 1604-1607). Los polipéptidos anclados a membrana, tales como hialuronidasas ancladas al lípido, incluyendo hialuronidasas ancladas a GPI, se dividirán a la fase rica en detergente, pero se dividirán a la fase acuosa o pobre en detergente después del tratamiento con fosfolipasa C. La fosfolipasa C es una enzima que escinde el enlace de fosfoglicerol hallado en proteínas ancladas a GPI. El tratamiento con PLC provocará la liberación de proteínas ligadas a GPI desde la membrana celular externa.

3. Pureza, cristalización o agregación

La estabilidad de un polipéptido de PH20 descrito en el presente documento también puede evaluarse usando otros métodos y ensayos conocidos en la técnica. Además de evaluar la estabilidad basándose en la actividad hialuronidasa, la estabilidad puede evaluarse mediante inspección visual, porcentaje de recuperación, pureza de proteínas y aparente temperatura de fusión.

Por ejemplo, la pureza de proteínas puede medirse mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC). La pureza de proteínas, como se determina por RP-HPLC, es el porcentaje del pico principal de proteína de PH20 presente, en comparación con todas las especies de proteínas presentes. Por lo tanto, RP-HPLC y métodos similares conocidos por un experto en la materia, pueden evaluar la degradación de la enzima. La pureza de las proteínas puede evaluarse a lo largo del tiempo. La pureza de proteínas también puede evaluarse en presencia de una o más condiciones de desnaturalización y en diversas cantidades de las mismas. El porcentaje de recuperación también puede determinarse como el porcentaje relativo de polipéptido en diversas condiciones (condiciones de desnaturalización, tiempo de almacenamiento, modo de almacenamiento tal como recipiente o vaso, u otros parámetros similares que pueden alterarse) en comparación con una muestra de referencia. La estabilidad de polipéptidos de PH20 también puede determinarse midiendo la oxidación de la hialuronidasa por RP-HPLC. El porcentaje de oxidación es una medida de la suma de las áreas pico de los picos principal (ox-1) y secundario (ox-2).

En un ejemplo, la temperatura de fusión de un polipéptido de PH20, tal como un polipéptido de PH20 modificado, puede determinarse midiendo el radio hidrodinámico de partículas mediante dispersión dinámica de la luz en diversas condiciones (por ejemplo, condiciones de desnaturalización u otras condiciones de almacenamiento). Un aumento del tamaño de partícula y una reducción de la temperatura de fusión indica desnaturalización y posterior agregación de la hialuronidasa.

Otros métodos conocidos por un experto en la materia que pueden usarse para determinar la estabilidad de la hialuronidasa en las coformulaciones descritas en el presente documento, incluyen electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), inmunotransferencia, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas, dicroísmo circular (DC) y ensayos de fluorescencia basados en colorante.

4. Farmacodinámica/farmacocinética

El efecto de la administración de un polipéptido de PH20, tal como un polipéptido de PH20 modificado, solo o en combinación con otro agente terapéutico, en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de cualquier agente administrado también pueden evaluarse *in vivo* usando modelos animales y/o sujetos humanos, tal como en la situación de un ensayo clínico. Pueden realizarse estudios farmacocinéticos o farmacodinámicos usando modelos animales o puede realizarse durante estudios con pacientes a los que se ha administrado un polipéptido de PH20 o polipéptido de PH20 modificado.

Los modelos animales incluyen, pero sin limitación, ratones, ratas, conejos, perros, cobayas y modelos de primates

no humanos, tales como monos cynomolgus o macacos rhesus. En algunos casos, se realizan estudios de farmacocinética o farmacodinámica usando animales sanos. En otros ejemplos, los estudios se realizan usando modelos animales de una enfermedad para la que se considera la terapia con hialuronano, tales como modelos animales de cualquier enfermedad o trastorno asociado con hialuronano, por ejemplo un modelo tumoral.

5 Las propiedades farmacocinéticas de un polipéptido de PH20, tal como un polipéptido de PH20 modificado, pueden evaluarse midiendo dichos parámetros como la concentración máxima (pico) ($C_{m\acute{a}x}$), el tiempo pico (es decir, cuando se produce la máxima concentración; $T_{m\acute{a}x}$), la concentración mínima (es decir, la concentración mínima entre dosis; $C_{m\acute{i}n}$), la semivida de eliminación ($T_{1/2}$) y el área bajo la curva (es decir, el área bajo la curva generada por la representación de tiempo frente a concentración; ABC), después de la administración. La biodisponibilidad absoluta de la hialuronidasa puede determinarse comparando el área bajo la curva de hialuronidasa después de suministro subcutáneo (ABC_{sc}) con la ABC de hialuronidasa después de suministro intravenoso (ABC_{iv}). La biodisponibilidad absoluta (F), puede calcularse usando la fórmula: $F = ([ABC]_{sc} \times dosis_{sc}) / ([ABC]_{iv} \times dosis_{iv})$. Puede administrarse una serie de dosis y diferente frecuencia de dosificación en los estudios farmacocinéticos para evaluar el efecto del aumento o la reducción de concentraciones de enzima, tal como polipéptido de PH20 modificado, en la dosis.

H. Métodos de tratamiento y terapia de combinación

20 Se describen en el presente documento métodos y usos de cualquiera de los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento que muestran actividad hialuronidasa basándose en su capacidad para degradar glucosaminoglucano o glucosaminoglucanos tales como hialuronano. Debido a dicha actividad, los polipéptidos de PH20 modificados pueden usarse como un factor de propagación para aumentar el suministro y/o la biodisponibilidad de agentes terapéuticos administrados por vía subcutánea. El suministro de cualquier agente terapéutico, incluyendo pero sin limitación, péptidos, proteínas, moléculas pequeñas farmacológicas, ácidos nucleicos o virus puede facilitarse o potenciarse mediante la coadministración con un polipéptido de PH20 modificado descrito en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse polipéptidos de PH20 modificados para aumentar el suministro de agentes terapéuticos tales como anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales), citocinas, inmunoglobulina, una insulina, o factores de coagulación, a un locus deseado, tal como aumentando la penetración de agentes quimioterapéuticos en tumores sólidos. Los polipéptidos de PH20 modificados también pueden usarse para tratar una enfermedad de hialuronano o trastorno que se caracteriza por un exceso o acumulación de hialuronano. Por ejemplo, pueden usarse polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento para tratar un tumor; para tratar la acumulación de glucosaminoglucano en el cerebro; para tratar un trastorno cardiovascular; para tratar un trastorno oftálmico; para tratar enfermedad pulmonar; para tratar celulitis; y/o para tratar un trastorno proliferativo.

35 Otros métodos y usos de un polipéptido de PH20 modificado incluyen cualquiera que conozca un experto en la materia. Por ejemplo, se han preparado diversas formas de hialuronidasas PH20 y se han aprobado para uso terapéutico en seres humanos. Por ejemplo, las preparaciones de hialuronidasa derivadas de animal incluyen Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular ovina purificada, y Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular bovina. Hylenex® (Halozyme Therapeutics) es una hialuronidasa recombinante humana producida por células de ovario de hámster chino (CHO) modificadas por ingeniería genética que contienen ácido nucleico que codifica rHuPH20 (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 7.767.429). Los usos terapéuticos aprobados para hialuronidasas incluyen uso como un adyuvante para aumentar la absorción y dispersión de otros agentes terapéuticos para hipodermoclastia (administración de líquido subcutáneo), y como un accesorio en la urografía subcutánea para mejorar la reabsorción de agentes radiopacos. Además de estas indicaciones, las hialuronidasas pueden usarse como un producto terapéutico o agente cosmético para el tratamiento de enfermedades y afecciones adicionales. Por ejemplo, la hialuronidasa se usa habitualmente, por ejemplo, para bloqueo peribulbar en anestesia local antes de la cirugía oftálmica. La presencia de la enzima evita la necesidad de bloqueos adicionales y reduce el tiempo hasta la aparición de aquinesia (pérdida de movimiento del ojo). El bloqueo peribulbar y sub-Tenon son las aplicaciones más comunes de la hialuronidasa para procedimientos oftálmicos. La hialuronidasa también puede promover aquinesia en cirugía cosmética, tal como blefaroplastias y eliminación de arrugas. Se entiende que pueden usarse hialuronidasas PH20 solubles descritas en el presente documento, incluyendo hialuronidasas esPH20, en cualquier método de tratamiento o terapia de combinación para el que se use una hialuronidasa PH20 (véase por ejemplo, publicaciones de Estados Unidos n.º US20040268425; 40 US20050260186; US20060104968; y solicitudes de Estados Unidos n.º de serie 12/381.844, publicada como publicación de Estados Unidos n.º US20100074885; 12/386.249, publicada como publicación de Estados Unidos n.º US20090311237; 12/387.225, publicada como publicación de Estados Unidos n.º US20090304665; y 12/386.222, publicada como publicación de Estados Unidos n.º US2010003238).

60 Se describen métodos ejemplares, no limitantes, y sus usos, en las siguientes subsecciones.

1. Métodos de suministro de agentes terapéuticos

65 Como se ha observado anteriormente, la hialuronidasa es una sustancia de propagación o difusión que modifica la permeabilidad del tejido conectivo mediante la hidrólisis de ácido hialurónico, un polisacárido hallado en la sustancia fundamental intercelular de tejido conectivo y de ciertos tejidos especializados, tales como el cordón umbilical y el

humor vítreo. Cuando no está presente ningún factor de propagación, los materiales inyectados por vía subcutánea, tales como fármacos, proteínas, péptidos y ácido nucleico, se propagan muy lentamente. La coinyección con hialuronidasa, sin embargo, puede provocar propagación rápida. La velocidad de difusión es proporcional a la cantidad de enzima, y el grado de difusión es proporcional al volumen de solución.

5 Los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento pueden usarse para promover o potenciar los agentes de suministro y moléculas a cualquiera de una diversidad de tejidos de mamífero *in vivo*. Se puede usar para facilitar la difusión y, por lo tanto, promover el suministro, de agentes farmacológicos de moléculas pequeñas así como agentes farmacológicos de moléculas mayores, tales como proteínas, ácidos nucleicos y ácidos
10 ribonucleicos, y composiciones macromoleculares que pueden contener una combinación de componentes incluyendo, pero sin limitación, ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos, lípidos, moléculas basadas en lípidos y fármacos (véase por ejemplo., publicaciones de Estados Unidos n.º US20040268425; US20050260186; y US20060104968). Los polipéptidos de PH20 modificados pueden administrarse y/o coformularse con un agente
15 terapéutico para mejorar la biodisponibilidad así como características farmacocinéticas (PK) y/o farmacodinámicas (PD) de agentes coformulados o coadministrados. Los parámetros de PK/PD que pueden mejorarse usando PH20 soluble, tal como esPH20, incluyen medidas tales como $C_{m\acute{a}x}$ (la concentración máxima de agente obtenida después de absorción, por ejemplo, en el torrente sanguíneo), $T_{m\acute{a}x}$ (el tiempo requerido para conseguir la concentración máxima), $T_{1/2}$ (el tiempo requerido para que la concentración descienda a la mitad), $C_{m\acute{i}n}$ (la concentración mínima de agente después de metabolismo y excreción), ABC (área bajo la curva de concentración frente a tiempo, una medida
20 de la cantidad general de biodisponibilidad), concentraciones en diversos tejidos de interés (incluyendo, por ejemplo, la velocidad de consecución de concentraciones deseadas, los niveles generales, y la duración del mantenimiento de los niveles deseados), y $E_{m\acute{a}x}$ (el efecto máximo conseguido).

Los métodos de tratamiento descritos en el presente documento incluyen terapias de combinación con un agente
25 terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o trastorno para el que trata el agente terapéutico. Cualquier agente terapéutico que alivie o reduzca de otro modo la gravedad de una enfermedad o afección puede combinarse con un polipéptido de PH20 modificado descrito en el presente documento para aumentar la biodisponibilidad de dicho agente terapéutico. En particular, los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento
30 pueden usarse en todas y cada una de las combinaciones descritas en solicitudes véase, por ejemplo, publicaciones de Estados Unidos n.º US20040268425; US20050260186; US20060104968 y solicitudes de Estados Unidos n.º de serie 12/381.844, publicada como publicación de Estados Unidos n.º US20100074885; 12/386.249, publicada como publicación de Estados Unidos n.º US20090311237; 12/387.225, publicada como publicación de Estados Unidos n.º US20090304665; y 12/386.222, publicada como publicación de Estados Unidos n.º US2010003238 en lugar de la hialuronidasa o enzima degradante de hialuronidasa desvelada.

35 Pueden administrarse polipéptidos de PH20 modificados antes, después de, intermitentemente con o simultáneamente con la preparación de agente terapéutico. En general, el polipéptido de PH20 modificado se administra antes de o simultáneamente con la administración de la preparación de agente terapéutico para permitir que la PH20 degrade el ácido hialurónico en el espacio intersticial. La PH20 puede administrarse en un sitio
40 diferente del sitio de administración de la molécula terapéutica o la PH20 soluble puede administrarse en un sitio igual que el sitio de administración de la molécula terapéutica.

Los ejemplos de agentes farmacéuticos, terapéuticos y cosméticos y moléculas que pueden administrarse con hialuronidasa incluyen, pero sin limitación, un agente quimioterapéutico o antineoplásico, un agente analgésico, un
45 agente antibiótico, un agente antiinflamatorio, un agente antimicrobiano, un agente amebicida, un agente tricomonacida, un agente antiparkinsoniano, un agente antimalárico, un agente anticonvulsivo, un agente antidepresivo, 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 bronquial, un agente biocida, un agente bactericida, un agente
50 bacteriostático, un agente bloqueador beta adrenérgico, un agente bloqueador de canales de calcio, un agente farmacológico cardiovascular, un agente anticonceptivo, un agente cosmético o estético, un agente descongestionantes, un agente diurético, un agente depresivo, un agente de diagnóstico, un agente de electrolito, un agente hipnótico, un agente hormonal, un agente hiperglucémico, un agente relajante muscular, un agente contractivo muscular, un agente oftálmico, un agente parasimpatomimético, un agente energizante psíquico, un
55 agente sedante, un inductor del sueño, un agente simpatomimético, un agente tranquilizante, un agente urinario, un agente vaginal, un agente viricida, un agente vitamínico, un agente antiinflamatorio no esteroideo, o un agente inhibidor de enzima convertora de angiotensina, y cualquier combinación de los mismos. En particular, los agentes terapéuticos incluyen anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, bisfosfonatos, insulinas, factores de coagulación, citocinas e inmunoglobulinas.

60 Por ejemplo, pueden usarse polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento para aumentar el suministro de agentes quimioterapéuticos. También se han usado hialuronidasas para potenciar la actividad de productos quimioterapéuticos y/o la accesibilidad de tumores a productos quimioterapéuticos (Schuller *et al.*, 1991, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 32: 173, n.º de resumen 1034; Czejka *et al.*, 1990, Pharmazie 45: H.9; Baumgartner
65 *et al.* (1988) Reg. Cancer Treat. 1: 55-58; Zanker *et al.* (1986) Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 27: 390). La quimioterapia de combinación con hialuronidasa es eficaz en el tratamiento de una diversidad de cánceres

incluyendo cáncer de vejiga urinaria (Horn *et al.*, 1985, J. Surg. Oncol. 28: 304-307), carcinoma de células escamosas (Kohno *et al.*, 94, J. Cancer Res. Oncol. 120: 293-297), cáncer de mama (Beckenlehner *et al.*, 1992, J. Cancer Res. Oncol. 118: 591-596), y cáncer gastrointestinal (Scheithauer *et al.*, 1988, Anticancer Res. 8: 391-396). En este ejemplo, la hialuronidasa PH20 modificada potencia la penetración de agentes quimioterapéuticos u otros antineoplásicos en tumores sólidos, tratando de este modo la enfermedad.

Las composiciones que contienen PH20 soluble pueden inyectarse por vía intratumoral con agentes antineoplásicos o por vía intravenosa para cánceres diseminados o tumores difíciles de alcanzar. El agente antineoplásico puede ser un producto quimioterapéutico, un anticuerpo, un péptido, o un vector de terapia génica, virus o ADN. Adicionalmente, puede usarse hialuronidasa para reclutar células tumorales al grupo de ciclación para sensibilización en tumores previamente quimiorrefractarios que han adquirido resistencia a múltiples fármacos (St Croix *et al.*, (1998) Cancer Lett September 131(1): 35-44).

Los agentes antineoplásicos ejemplares que pueden administrarse después de, simultáneamente con o antes de la administración de una PH20 soluble, tales como una esPH20 soluble, incluyen, pero sin limitación acivinas; aclarubicinas; acodazoles; acroninas; adozelesinas; aldesleucinas; alentuzumabs; alitretinoínas (ácidos 9-cis-retinoicos); alopurinoles; altretaminas; alvocidibs; ambazonas; ambomicinas; ametantronas; amifostinas; aminoglutetimidias; amsacinas; anastrozoles; anaxironas; ancitabinas; antramincinas; apazicuonas; argimesnas; trióxidos arsénicos; asparaginasas; asperlinas; atrimustinas; azacitidinas; azetepas; azotomicinas; banoxantronas; batabulinas; batimastats; BCG vivo; benaxibinas; bendamustinas; benzodepas; bexarotenos; bevacizumab; bicalutamidas; bietaserpinas; biricodares; bisantrenos; bisantrenos; dimesilatos de bisnafida; bizelesinas; bleomicinas; bortezomibs; brequinares; bropiriminas; budotitanos; busulfanes; cactinomicinas; calusteronas; canertinibs; capecitabinas; caracemidas; carbetimeros; carboplatinos; carbocouanas; carmofures; carmustinas con polifeprosanos; carmustinas; carubicinas; carzelesinas; cedefingoles; celecoxibs; cemadotinas; clorambucilos; cioteroneles; ciplactino; cirolemicinas; cisplatinos; cladribinas; clanfenures; clofarabinas; crisnatoles; ciclofosfamidias; citarabinas liposómicas; citarabinas; dacarbazinas; dactinomicinas; darbeopetinas alfa; daunorrubicinas liposómicas; daunorrubicinas/daunomicinas; daunorrubicinas; decitabinas; denileucinas difitoxes; dextriguldipinas; dexas; dexrazoxanos; dezaguaninas; diazicuonas; dibrospidios; dienogests; dinalinas; disermolidas; docetaxeles; dofequidares; doxiluridinas; doxorubicinas liposómicas; doxorubicina HCL; inyección de liposoma de doxorubicina HCL; doxorubicinas; droloxifenos; propionatos de dromostanolona; duazomicinas; ecomustinas; edatrexatos; edotecarinas; eflornitinas; elacridares; elinafidias; soluciones B de Elliott; elsamitruccinas; emitefures; enloplatinos; enpromatos; enzastaurinas; epipropidinas; Epirubicinas; epoetinas alfa; eptaloprosts; erbulozoles; esorrubicinas; estramustinas; etanidazoles; etoglúcidos; fosfatos de etopósidos; etopósidos VP-16; etopósidos; etoprinas; exemestanos; exisulindes; fadrozoles; fazarabinas; fenretinidas; filgrastims; floxuridinas; fludarabinas; fluorouracilos; 5-fluorouracilos; fluoximesteronas; flurocitabinas; fosquidonas; fostriecinas; fostriecinas; fotretaminas; fulvestrants; galarrubicinas; galocitabinas; gemcitabinas; gemtuzumabs/ozogamicinas; geroquinoles; gimetacanos; gimeracilos; gloxazonas; glufosfamidas; acetatos de goserelina; hidroximureas; ibritumomabs/tiuxetanos; idarubicinas; ifosfamidas; ilmofosinas; ilomastats; mesilatos de imatinib; imexones; improsulfanes; indisulams; improcuonas; interferones alfa-2a; interferones alfa-2b; interferones alfa; interferones beta; interferones gamma; interferones; interleucinas-2 y otras interleucinas (incluyendo interleucinas recombinantes); intoplicinas; iobenguanos [131-1]; iroplatinos; irinotecanes; irsogladinas; ixabepilonas; quetotrexatos; L-alanosinas; lanreotidas; lapatinibs; ledoxantronas; letrozoles; leucovorinas; leuprolides; leuprorelinas (leuprolides); levamisoles; lexacalcitoles; liarozoles; lobaplatinos; lometrexoles; lomustinas/CCNU; lomustinas; lonafarnibs; losoxantronas; lurtotecanes; lurtotecanes; mafosulfanos; marimastats; masoprocoles; maitansinas; mecloretaminas; mecloretaminas/mostazas de nitrógeno; acetatos de megestrol; megestroles; melengestroles; melfalanes; melfalanes L-PAM; menogarilos; mepitiostanos; mercaptopurinas; 6-mercaptopurina; mesnas; metesindes; metotrexatos; metoxsalenos; metomidatos; metoprinas; meturedpas; miboplatinos; miproxifenos; misonidazoles; mitindomidias; mitocarcinas; mitocrominas; mitoflaxonas; mitogilinas; mitoguzonas; mitomalquinas; mitomicinas C; mitomicinas; mitonafidas; mitoquidonas; mitoesperes; mitotanos; mitoxantronas; mitozolomidias; mivobulinas; mizoribinas; mofarotenos; mopidamoles; mubritinibs; ácidos micofenólicos; fenpropionatos de nandrolona; nedaplatinos; nelarabinas; nemorrubicinas; nitracinas; nocodazoles; nofetumomabs; nogalamincinas; nolatrexedes; nortopixantronas; octreótidos; orelvequinas; ormaplatinos; ortataxeles; oteracilos; oxaliplatinos; oxisuranos; oxofenarsinas; paclitaxeles; pamidronatos; patupilonas; pegademasas; pegaspargasas; pegfilgrastims; peldesinas; peliomincinas; pelitrexoles; pemetrexedes; pentamustinas; pentostatinas; peplomicinas; perfosfamidas; perfosinas; picoplatinos; pinafidias; pipobromanes; piposulfanes; pirfenidonas; piroxantronas; pixantronas; plevitrexedes; mitramincinas de plicamicina; plicamicinas; plomestanos; plomestanos; porfímeros sódicos; porfímeros; porfiromincinas; prednimustinas; procarbaminas; propamidinas; prospidios; pumitepas; puromincinas; pirazofurinas; quinacinas; ranimustinas; rasburicinas; riboprinas; ritrosulfanes; rituximabs; rogletimidas; roquinimexes; rufocromomicinas; sabarrubicinas; safingoles; sargramostims; satraplatinos; sebriplatinos; semustinas; simtrazenos; sizofiranos; sobuzoxanos; sorafenibs; esparfosatos; ácidos esparfósicos; esparsomicinas; espirogermanios; espiromustinas; espiroplatinos; espiroplatinos; escualaminas; estreptonigrinas; estreptovaricinas; estreptozocinas; sufosfamidas; sulofenures; malato de sunitinib; 6-TG; tacedinalinas; talcos; talisomicinas; talimustinas; tamoxifenos; tariquidares; tauromustinas; tecogalanes; tegafures; teloxantronas; temoporfinas; temozolomidias; tenipósidos/VM-26; tenipósidos; teroxironas; testolactonas; tiamiprinas; tioguaninas; tiotepas; tiamiprinas; tiazofurinas; tilomisoles; tiloronas; timcodares; timonácicos; tirapazaminas; topixantronas; topotecanes; toremifenos; tosimumomabs; trabectedinas (ecteinascidina 743); trastuzumabs; trestolonas; tretinoínas/ATRA; triciribinas; trilostanos; trimetrexatos; tetranitratos de triplatin; triptorelinas; trofosfamidas;

tubulozoles; ubenimexes; mostazas de uracilo; uredepas; valrubicinas; valspodares; vaporeotidas; verteporfinas; vinblastinas; vincristinas; vindesinas; vinepidinas; vinfluninas; vinformidas; vinglicinatos; vinleucinoles; vinleurosinas; vinorelbinas; vinrosidinas; vintriptoles; vinzolidinas; vorozoles; xantomycinas A (guameciclinas); zeniplatinos; zilascorbs [2-H]; zinstatinas; zoledronato; zorubicinas; y zosuquidares, por ejemplo:

- 5 Aldesleucinas (por ejemplo, PROLEUKIN®); Alemtuzumabs (por ejemplo, CAMPATH®); Alitretinoínas (por ejemplo, PANRETIN®); Alopurinoles (por ejemplo, ZYLOPRIM®); Aletretaminas (por ejemplo, HEXALEN®); Amifostinas (por ejemplo, ETHYOL®); Anastrozoles (por ejemplo, ARMIDEX®); Trióxidos de arsénico (por ejemplo, TRISENOX®); Asparaginasas (por ejemplo, ELSPAR®); BCG vivo (por ejemplo, TICE® BCG); Bexarotenos (por ejemplo, TARGRETIN®); Bevacizumab (AVASTIN®); Bleomicinas (por ejemplo, BLENOXANE®); Busulfán intravenoso (por ejemplo, BUSULFEX®); Busulfanes orales (por ejemplo, MYLERAN™); Calusteronas (por ejemplo, METHOSARB®); Capecitabinas (por ejemplo, XELODA®); Carboplatinos (por ejemplo, PARAPLATIN®); Carmustinas (por ejemplo, BCNU®, BiCNU®); Carmustinas con Polifeprosanos (por ejemplo, GLIADEL® Wafer); Celecoxibs (por ejemplo, CELEBREX®); Clorambucilos (por ejemplo, LEUKERAN®); Cisplatinos (por ejemplo, PLATINOL®); Cladribinas (por ejemplo, LEUSTATIN®, 2-CdA®); Ciclofosfamidias (por ejemplo, CYTOXAN®, NEOSAR®); Citarabinas (por ejemplo, CYTOSAR-U®); Citarabinas liposómicas (por ejemplo, DepoCyt®); Dacarbazinas (por ejemplo, DTIC-Domeu); Dactinomycinas (por ejemplo, COSMEGEN®); Darbepoetinas Alfa (por ejemplo, ARANESP®); Daunorrubicinas liposómicas (por ejemplo, DAUNOXOME®); Daunorrubicinas/Daunomicinas (por ejemplo, CERUBIDINE®); Denileucinas Diftoxes (por ejemplo, ONTAK®); Dexrazoxanos (por ejemplo, ZINECARD®); Docetaxeles (por ejemplo, TAXOTERE®); Doxorubicinas (por ejemplo, ADRIAMYCIN®, RUBEX®); Doxorubicinas liposómicas, incluyendo inyecciones de liposoma de doxorubicina HCL (por ejemplo, DOXIL®); Propionatos de dromostanolona (por ejemplo, Inyección de DROMOSTANOLONE® y MASTERONE®); Soluciones B de Elliott (por ejemplo, Elliott's B Solution®); Epirubicinas (por ejemplo, ELLENCE®); Epoetinas alfa (por ejemplo, EPOGEN®); Estramustinas (por ejemplo, EMCYT®); Fosfatos de etopósidos (por ejemplo, ETOPOPHOS®); Etopósidos VP-16 (por ejemplo, VEPESID®); Exemestanos (por ejemplo, AROMASIN®); Filgrastims (por ejemplo, NEUPOGEN®); Floxuridinas (por ejemplo, FUDR®); Fludarabinas (por ejemplo, FLUDARA®); Fluorouracilos incluyendo 5-FU (por ejemplo, ADRUCIL®); Fulvestrants (por ejemplo, FASLODEX®); Gemcitabinas (por ejemplo, GEMZAR®); Gemtuzumabs/Ozogamicinas (por ejemplo, MYLOTARG®); Acetatos de goserelina (por ejemplo, ZOLADEX®); Hidroxiureas (por ejemplo, HYDREA®); Ibritumomabs/Tiuxetanos (por ejemplo, ZEVALIN®); Idarubicinas (por ejemplo, IDAMYCIN®); Ifosfamidas (por ejemplo, IFEX®); Mesilatos de imatinib (por ejemplo, GLEEVEC®); Interferones alfa-2a (por ejemplo, ROFERON-A®); Interferones alfa 2b (por ejemplo, INTRON A®); Irinotecanes (por ejemplo, CAMPTOSAR®); Letrozoles (por ejemplo, FEMARA®); Leucovorinas (por ejemplo, WELLCOVORIN®, LEUCOVORIN®); Levamisoles (por ejemplo, ERGAMISOL®); Lomustinas/CCNU (por ejemplo, CeeNU®); Mecloretaminas/mostazas de nitrógeno (por ejemplo, MUSTARGEN®); Acetatos de megestrol (por ejemplo, MEGACE®); Melfalanes/L-PAM (por ejemplo, ALKERAN®); Mercaptopurina incluyendo 6-MP (por ejemplo, PURINETHOL®); Mesnas (por ejemplo, MESNEX®); Metotrexatos; Metoxsalenos (por ejemplo, UVADEX®); Mitomicinas C (por ejemplo, MUTAMYCIN®, MITOZYTREX®); Mitotanos (por ejemplo, LYSODREN®); Mitoxantronas (por ejemplo, NOVANTRONE®); Fenpropionatos de Nandrolona (por ejemplo, DURABOLIN-50®); Nofetumomabs (por ejemplo, VERLUMA®); Oprelvequinas (por ejemplo, NEUMEGA®); Oxaliplatinos (por ejemplo, ELOXATIN®); Paclitaxeles (por ejemplo, PAXENE®, TAXOL®); Pamidronatos (por ejemplo, AREDIA®); Pegademasas (por ejemplo, ADAGEN®); Pegaspargasas (por ejemplo, ONCASPARGAS®); Pegfilgrastims (por ejemplo, NEULASTA®); Pentostatinas (por ejemplo, NIPENT®); Pipobromanes (por ejemplo, VERCYTE®); Plicamicina/mitramicinas (por ejemplo, MITHRACIN®); Porfimeros sódicos (por ejemplo, PHOTOFRIN®); Procarbacias (por ejemplo, MATULANE®); Quinacrinas (por ejemplo, ATABRINE®); Rasburicasas (por ejemplo, ELITEK®); Rituximabs (por ejemplo, RITUXAN®); Sargramostims (por ejemplo, PROKINE®); Estreptozocinas (por ejemplo, ZANOSAR®); Malatos de Sunitinib (por ejemplo, SUTENT®); Talcos (por ejemplo, SCLEROSOL®); Tamoxifenos (por ejemplo, NOLVADEX®); Temozolomidias (por ejemplo, TEMODAR®); Tenipósidos/VM-26 (por ejemplo, VUMON®); Testolactonas (por ejemplo, TESLAC®); Tioguaninas incluyendo 6-TG; Tiotepas (por ejemplo, THIOPLEX®); Topotecanes (por ejemplo, HYCAMTIN®); Toremifenos (por ejemplo, FARESTON®); Tositumomabs (por ejemplo, BEXXAR®); Trastuzumabs (por ejemplo, HERCEPTIN®); Tretinoínas/ATRA (por ejemplo, VESANOID®); Mostazas de Uracilo; Valrubicinas (por ejemplo, VALSTAR®); Vinblastinas (por ejemplo, VELBAN®); Vincristinas (por ejemplo, ONCOVIN®); Vinorelbinas (por ejemplo, NAVELBINE®); y Zoledronatos (por ejemplo, ZOMETA®).
- 55 Por ejemplo, los agentes antibióticos ejemplares incluyen, pero sin limitación,, Aminoglucósidos; Anfenicóles; Ansamicinas; Carbacefemos; Carbapenemos; Cefalosporinas o Cefemos; Cefamicinas; Clavams; Lipopéptidos cíclicos; Diaminopirimidinas; Cetólidos; Lincosamidas; Macrólidos; Monobactamos; Nitrofuranos; Oxacefems; Oxazolidinonas; Penemos, tienamicinas y beta lactamas misceláneas; Penicilinas; Antibióticos polipeptídicos; Quinolonas; Sulfonamidas; Sulfonas; Tetraciclinas; y otros antibióticos (tales como Clofocoles, ácidos Fusídicos, Hexedinas, Metenaminas, Nitrofurantoinas Nitroxolinas, Ritipenems, Taurolidinas, Xibomoles).
- 60

También se incluyen entre agentes terapéuticos ejemplares factores de coagulación u otros modificadores sanguíneos tales como factores antihemofílicos, complejos coagulantes antiinhibidor, antitrombina III, factor de coagulación V, factor de coagulación VIII, factor de coagulación IX, fracciones proteicas del plasma, factores de von Willebrand; agentes antiplaquetarios (incluyendo, por ejemplo, abciximabs, anagrelidas, cilostazoles, bisulfatos de clopidogrel, dipiridamoles, epoprostenoles, eptifibatidas, tirofibanes, factores estimulantes de colonias (CSF)

65

(incluyendo, por ejemplo, CSL de Granulocitos y CSF de Granulocitos y macrófagos); Estimulantes de la eritropoyesis (incluyendo, por ejemplo, eritropoyetinas tales como darbepoetinas alfas) y epoetinas alfa, hemostáticos y albúminas (incluyendo, por ejemplo, aprotininas, combinaciones de factores antihemófilos y plasma, Acetatos de Desmopresina y albúminas); inmunoglobulinas, así como inmunoglobulinas de la hepatitis B, inhibidores de trombina (incluyendo por ejemplo inhibidores de trombina directos y lepirudina) y drotrecoginas alfa; anticoagulantes (incluyendo, por ejemplo, dalteparinas, enoxaparinas y otras heparinas, y warfarinas).

Los anticuerpos ejemplares u otros agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, Cetuximab (IMC-C225; Erbitux®); Trastuzumab (Herceptin®); Rituximab (Rituxan®; MabThera®); Bevacizumab (Avastin®); Alemtuzumab (Campath®; Campath-1H®; Mabcampath®); Panitumumab (ABX-EGF; Vectibix®); Ranibizumab (Lucentis®); Ibritumomab; Tiuxetano de Ibritumomab (Zevalin®); Tositumomab; Yodo I 131 Tositumomab (BEXXAR®); Catumaxomab (Removab®); Gemtuzumab; ozogamicina de Gemtuzumab (Mylotarg®); Abatacept (CTLA4-Ig; Orenia®); Belatacept (L104EA29YIg; LEA29Y; LEA); Ipilimumab (MDX-010; MDX-101); Tremelimumab (ticilimumab; CP-675,206); PRS-010 (véase por ejemplo, documento US20090042785); PRS-050 (documentos US7585940; US20090305982); Aflibercept (VEGF Trap, AVE005, Holash *et al.*, (2002) PNAS 99: 11393-11398); Volociximab (M200); F200 (fragmento de Fab IgG4 quimérico (humano/murino) de Volociximab (M200)); IgG1 quimérico de ratón/humano MORAb-009 (documento US20050054048); proteína de fusión Soluble: Fv anti mesotelina unido a una exotoxina A de *Pseudomonas truncada* (SS1P (CAT-5001); documento US20070189962); Cixutumumab (IMC-A12); Nimotuzumab (h-R3) (Spicer (2005) *Curr Open Mol Ther* 7:182-191); Zalutumumab (HuMax-EGFR; Lammerts van Bueren *et al.* (2008) PNAS 105:6109-14); Necitumumab IMC-11F8 (Li *et al.* (2008) *Structure* 16:216-227); Sym004 (Pedersen *et al.* 2010 *Cancer Res* 70:588-597); y mAb-425.

En particular, los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, inmunoglobulinas, Interferón beta, Interferones alfa-2a, Interferón alfa-I, Interferones alfa n3, Interferón beta-1, Interferón beta-1a, Interferones gamma-Ib, Peg-interferón alfa-2 y Peginterferón alfa-2b, insulina, un bisfosfato (por ejemplo, Pamidronatos o Zoledronatos), Docetaxeles, Doxorrubicinas, Doxorrubicinas liposómicas y bevacizumabs.

Otros agentes terapéuticos ejemplares que pueden combinarse mediante coadministración y/o coformulación con un polipéptido de PH20 modificado descrito en el presente documento incluyen, pero sin limitación, Adalimumabs, Agalsidasas Beta, Alefacepts, Ampicilinas, Anakinras, Vacunas Antipoliomielíticas, anti timocitos, Acitromicinas, Becaplerminas, Caspofunginas, Cefazolinas, Cefepimas, Cefotetanos, Ceftacidimas, Ceftriaxonas, Cetuximabs, Cilastatinas, ácidos clavulánicos, Clindamicinas, Darbepoetinas alfa, Daclizumabs, difteria, antitoxinas diftéricas, toxoides diftéricos, Efalizumabs, Epinefrinas, eritropoyetinas alfa, Etanercept, Filgrastims, Fluconazoles, hormonas folículo-estimulantes, folitropinas alfa, Folitropinas beta, Fosfenitoínas, Gadodiamidas, Gadopentetatos, Gatifloxacinas, Glatirámicos, GM-CSF, Goserelinas, acetatos de Goserelina, Granisetrones, B de *Haemophilus influenzae*, Haloperidoles, Vacunas de la hepatitis B, Vacunas de la hepatitis A, Vacunas de la hepatitis B, Tiuxetanos de Ibritumomab, Ibritumomabs, Tiuxetanos, Inmunoglobulinas, Vacunas de *Haemophilus influenzae*, Vacunas de virus de la gripe, Infliximabs, Insulinas, Insulinas Glarginas, Interferones, Interferones alfa, Interferones Beta, Interferones Gamma, Interferones alfa-2a, Interferones alfa-2b, Interferones alfa-1, Interferones alfa-n3, Interferones Beta, Interferones Beta-1a, Interferones Gamma, Interferones alfa-consenso, Iodixanoles, Iohexoles, Iopamidoles, Ioversoles, Ketorolacos, Laronidasas, Levofloxacinas, Lidocaínas, Linezolidas, Lorazepam, Vacunas de sarampión, Virus de sarampión, Virus de las paperas, Vacunas de virus del sarampión-paperas-rubéola, Vacunas de la rubéola, Medroxiprogesteronas, Meropenems, Metilprednisolonas, Midazolams, Morfinas, Ocreótidias, Omalizumabs, Ondansetrones, Palivizumabs, Pantoprazoles, Pegaspargasas, Pegfilgrastims, Peg-Interferón Alfa-2a, Peg-Interferón Alfa-2b, Pegvisomantes, Vacunas de Pertussis, Piperacilinas, Vacunas Neumocócicas y Vacunas Conjugadas Neumocócicas, Prometacinas, Reteplasas, Somatropinas, Sulbactams, Sumatriptanos, Tazobactams, Tenecteplasas, toxoides purificados del tétanos, Ticarcilinas, Tositumomabs, Triamcinolonas, acetónidos de triamcinolonas, hexacetónidos de triamcinolonas, vancomicinas, inmunoglobulinas de varicela zoster, vacunas de varicela, otras vacunas, Alemtuzumabs, Alitretinoínas, Alopurinoles, Altretaminas, Amifostinas, Anastrozoles, arsénicos, trióxidos de arsénico, asparaginasas, vacunas de Bacilo Calmette-Guerin (BCG), BCG vivo, Bexaroteno, Bleomicinas, Busulfanes, Busulfán intravenoso, Busulfanes orales, Calusteronas, Capecitabinas, Carboplatinos, Carmustinas, Carmustinas con Polifeprosanes, Celecoxibs, Clorambucilos, Cisplatinos, Cladribinas, Ciclofosfamidias, Citarabinas, Citarabinas liposómicas, Dacarbacinas, Dactinomocinas, Daunorrobucinas liposómicas, Daunorubicinas, Daunomicinas, Denileucinas Diftitoxes, Dexrazoxanos, Docetaxeles, Doxorrubicinas, Doxorrubicinas liposómicas, Propionatos de dromostanolona, Soluciones B de Elliott, Epirubicinas, Epotinas alfa, Estramustinas, Etopósidos, Fosfatos de etopósido, Etopósido VP-16, Exemestanos, Floxuridinas, Fludarabinas, Fluorouracilos, 5-Fluorouracilos, Fulvestrants, Gemcitabinas, Gemtuzumabs, Ozogamicinas, Ozogamicinas de gemtuzumab, Hidroxiureas, Idarubicinas, Ifosfamidas, Mesilatos de imatinib, Irinotecanes, Letrozoles, Leucovorinas, Levamisoles, Lomustinas, CCNU, Mecloretaminas, Mostazas de nitrógeno, Megestroles, Acetatos de megestrol, Melfalanes, L-PAM, Mercaptopurinas, 6-Mercaptopurinas, Mesnas, Metotrexatos, Metoxsalenos, Mitomicinas, Mitomicinas C, Mitotanos, Mitoxantronas, Nandrolonas, Fenpropionatos de nandrolona, Nofetumomabs, Oprelvequinas, Oxaliplatinos, Paclitaxeles, Pamidronatos, Pegademasas, Pentostatinas, Pipobromanes, Plicamicinas, Mitramicinas, Porfímeros, Porfímeros sódicos, Procarbacinas, Quinacinas, Rasburicasas, Rituximabs, Sargamostims, Estreptozocinas, Talcos, Tamoxifenos, Temozolomidas, Tenipósidos, Testolactonas, Tioguaninas, 6-Tioguaninas, Trietiltofosforamidias (teotepas), Topotecanes, Toremifenos, Trastuzumabs, Tretinoínas, Mostazas de uracilo, Valrubicinas, Vinblastinas, Vincristinas, Aminorelbinas, Zoledronatos, Acivicinas, Aclarobucinas,

Acodazoles, Acroninas, Adozelesinas, Alesleucinas, Ácidos Retinoicos, Alitretinoínas, Ácidos 9-Cis-Retinoicos, Alvocidibs, Ambazonas, Ambomicinas, Ametantronas, Aminoglutetimidas, Amsacinas, Anaxironas, Ancitabinas, Antramincinas, Apaciuonas, Argimesnas, Asperlinas, Atrimustinas, Azacitidinas, Azetepas, Azotomicinas, Banoxantronas, Batabulinas, Batimastats, Benaxibines, Bendamustinas, Benzodepas, Bicalutamidas, Bietaserpinas,
 5 Biricodares, Bisantrenos, Dimesilatos de Bisnafida, Bicelesinas, Bortezomibs, Brequinare, Bropiriminas, Budotitanas, Cactinomincinas, Canertinibs, Caracemidas, Carbetímeros, Carbocuanas, Carmofures, Carubicinas, Carcelesinas, Cedefingoles, Cemadotinas, Cloramucilos, Cioteroneles, Cirolemicinas, Clanfenures, Clofarabinas, Crisnatoles, Decitabinas, Dexniguldipinas, Dexormaplatinos, Dezaguaninas, Diacicuonas, Dibrospidios, Dienogests, Dinalinas, Disermolidas, Dofequidares, Doxifluridinas, Droloxifenos, Duazomocinas, Ecomustinas, Edatrexatos,
 10 Edotecarinas, Eflomitinas, Elacridares, Elinafidas, Elsamitruccinas, Emitefures, Enloplatinos, Empromatos, Enzastaurinas, Epiropidinas, Eptaloprosts, Erbulozoles, Esorubicinas, Etanidazoles, Etoqlúcidos, Etoprinas, Exisulindes, Fadzozoles, Fazarabinas, Fenretinidas, Floximesterona, Fluocitabinas, Fosquidonas, Fostriecinas, Fotretaminas, Galarubicinas, Galocitabinas, Geroquinole, Gimatacanos, Gimeracilos, Gloxazonas, Glufosfamidas, Ilmofosinas, Ilmastats, Imexones, Improsulfanos, Indisulfanos, Inprocuonas, Interleucinas, Interleucinas 2, Interleucinas recombinantes, Intoplicinas, Iobenguanos, Ipropolatinos, Irsogadinas, Ixabepilones, Ketotrexatos, L-Alanosinas, Lanreotidas, Lapatinibs, Ledoxantronas, Leuprolides, Leuprorelinas, Lexacalcitole, Liarozoles, Lobaplatinos, Lometrexoles, Lonafarnibs, Losoxantronas, Lurtotecanos, Mafosfamidas, Manosulfanos, Marimastats, Masoprocoles, Maitansinas, Mecloretaminas, Melengestrols, Melfalanes, Menogarilos, Mepitostanos, Metesindes, Metomidatos, Metoprinas, Meturedepas, Miboplatinos, Miproxifenos, Misonidazoles, Mitindomidat, Mitocarcinas,
 20 Mitocrominas, Mitoflaxonas, Mitogilinas, Mitoguzonas, Mitomalcinas, Mitonafidas, Mitoquidonas, Mitosperes, Mitozolomidat, Mivobulinas, Mizeribinas, Mofarotenos, Mopidamoles, Mubritinibs, Ácidos micofenólicos, Nedaplatinos, Neizarabinas, Nemorubicinas, Nitracinas, Nocodazoles, Nogalamincinas, Nolatrexedes, Nortopixantronas, Ormaplatinos, Ortataxeles, Oteracilos, Oxisuranos, Oxofenarsinas, Patupilonas, Peldesinas, Peliomicinas, Pelitrexoles, Pemetrexedes, Pentamustinas, Peplomicinas, Perfosfamidas, Perifosinas, Picoplatinos, Pinafidat, Pipsulfanos, Pirfenidonas, Piroxantronas, Pixantronas, Plevitrexedes, Plomestanos, Porfiromicinas, Prednimustinas, Propamidinas, Prospidios, Pumitepas, Puromincinas, Pirazofurinas, Ranimustinas, Riboprinas, Ritrosulfanos, Rogletimidat, Roquinimexes, Rufocromomicinas, Sabarubicinas, Safingoles, Satraplatinos, Sebriplatinos, Semustinas, Simtracenos, Sizofiranos, Sobuzoxanos, Sorafenibs, Esparfosatos, Ácidos Esparfósicos, Esparsomicinas, Espirogermanios, Espiromustinas, Espiroplatinos, Escualaminas, Estreptonigrinas,
 30 Estreptovaricinas, Sufosfamidas, Sulofenures, Tacedinalinas, Talisomicinas, Talimustinas, Tariquidares, Tauromustinas, Tecogalanes, Tegafures, Teloxantronas, Temoporfina, Teroxironas, Tiamiprinas, Tiamiprinas, Tiazofurinas, Tilomisoles, Tilonas, Timcodares, Timonacics, Tirapazaminas, Topixantronas, Trabectedinas, Ecteinascidina 743, Trestolonas, Triciribinas, Trilostanos, Trimetrexatos, Tetranitratos de Triplatino, Triptorelinas, Trofosfamidas, Tubulozoles, Ubenimexes, Uredepas, Valspodares, Vapreotidas, Verteporfina, Vinblastinas, Vindesinas, Vinepidinas, Vinfluninas, Vinformidas, Vinglicinatos, Vinleucinoles, Vinleucosinas, Vinrosidinas, Vintriptoles, Vinzolidinas, Vorozoles, Xantomincinas A, Guameciclinas, Zeniplatinos, Zilascorbs [2-H], Zinostatinas, Zorubicinas, Zosuquidares, Acetazolamidat, Aciclovires, Adipidonas, Alatrofloxacinas, Alfentanilos, Extractos alérgicos, Inhibidores de Alfa 1-proteínasa, Alprostadilos, Amicacinas, Aminoácidos, Ácidos Aminocaproicos, Aminofilinas, Amitriptilinas, Amobarbitales, Amrinonas, Analgésicos, Vacunas antipoliomielíticas, Sueros antirrábicos,
 40 Inmunoglobulinas antitetánicas, Vacunas tetánicas, Antitrombinas III, Sueros Antiveneno, Argatrobanes, Argininas, Ácidos ascórbicos, Atenololes, Atracurios, Atropinas, Aurotioglucosas, Azatioprinas, Aztreonams, Bacitracinas, Baclofenos, Basiliximabs, Ácidos benzoicos, Benzotropinas, Betametasonas, Biotinas, Bivalirudinas, Anidoxinas de botulismo, Bretilios, Bumetanidas, Bupivacaínas, Buprenorfina, Butorfanoles, Calcitoninas, Calcitrioles, Calcio, Capreomicinas, Carboprosts, Carnitinas, Cefamandoles, Cefoperazonas, Cefotaximas, Cefoxitinas, Ceftizoximas, Cefuroximas, Cloranfenicoles, Cloroprocaínas, Cloroquinas, Clorotiazidas, Clorpromacinas, Ácidos condroitinsulfúricos, Coriogonadotropinas Alfa, Cromios, Cidofovirs, Cimetidinas, Ciprofloxacinas, Cisatracurios, Clonidinas, Codeínas, Colchicinas, Colistinas, Colágenos, Triflutatos de Corticorelina Ovinos, Corticotrofinas, Cosintropinas, Cianocobalaminas, Ciclosporinas, Cisteínas, Dacliximabs, Dalfopristinas, Dalteparinas, Danaparoides, Dantrolenos, Deferoxaminas, Desmopresinas, Dexametasonas, Dexmedetomidinas, Dexpanthenoles,
 50 Dextranos, Dextranos de hierro, Ácidos diatrizoicos, Diazepams, Diazoxidat, Dicitlominas, Digibinds, Digoxinas, Dihidroergotaminas, Diltiazems, Difenidraminas, Dipiridamoles, Dobutaminas, Dopaminas, Doxacurios, Doxaprams, Doxercalciferoles, Doxiciclinas, Droperidoles, Difilinas, Ácidos Edéticos, Edrofonios, Enalaprilats, Efedrinat, Epoprostenoles, Ergocalciferoles, Ergonovinas, Ertapenemos, Eritromincinas, Esmololes, Estradioles, Estrógenos, Ácidos etacrínicos, Etanolaminas, Etanoles, Aceites Etiodizados, Ácidos Etidrónicos, Etomidatos, Factores VIII, Famotidinas, Fenoldopams, Fentanilos, Flumacencilos, Fluoresceínas, Flufenazinas, Ácidos fólicos, Fomepizoles, Fomivirsenes, Fondaparinuxes, Foscarnets, Fosfenitoínas, Furosemidas, Gadoteridoles, Gadoversetamidat, Ganciclovires, Gentamicinas, Glucagones, Glucosas, Glicinas, Glucopirrolatos, Gonadorelinas, Gonadotropinas Coriónicas, Polisacáridos de *Haemophilus B*, Heminas, Herbales, Histaminas, Hidralazinas, Hidrocortisonas, Hidromorfonas, Hidroxocobalaminas, Hidroxizinas, Hiosciaminas, Ibutilidas, Imiglucerasas, Carmines de Índigo,
 60 Indometacinas, Yoduros, Iopromidas, Ácidos iotalámicos, Ácidos loxáglicos, Ioxilanos, Isoniazidas, Isoproterenoles, Vacunas de la Encefalitis Japonesa, Kanamicinas, Ketaminas, Labetaloles, Lepirudinas, Levobupivacaínas, Levotiroxinas, Lincomincinas, Liotironinas, Hormonas luteinizantes, Vacunas de enfermedad de Lyme, Mangafodipires, Mantoles, Vacunas de polisacáridos meningocócicos, Meperidinas, Mepivacaínas, Mesoridazinas, Metaraminole, Metadonas, Metocarbamoles, Metohexitales, Metildopatos, Metilergonovinas, Metoclopramidat,
 65 Metoprololes, Metronidazoles, Minociclinas, Mivacurios, Ácidos Morruicos, Moxifloxacinas, Muromonab-CD3, Mofetiles micofenolato, Nafcilinas, Nalbufinas, Nalmefenos, Naloxonas, Neostigminas, Niacinamidat, Nicardipinas,

Nitroglicerinas, Nitroprúsidos, Norepinefrinas, Orfenadrinas, Oxacilinas, Oximorfonas, Oxitetraclinas, Oxitcinas, Pancurios, Pantenoles, Ácidos pantoténicos, Papaverinas, Peginterferón-alfa (por ejemplo, interferón alfa 2a o 2b), Penicilinas G, Pentamidinas, Pentazocinas, Pentobarbitales, Perflutrenos, Perfenazinas, Fenobarbitales, Fentolaminas, Fenilefrinas, Fenitoínas, Fisostigminas, Fitonadionas, Polimixinas B, Pralidoximas, Prilocaínas, Procainamidas, Procaínas, Proclorperazinas, Progesteronas, Propranololes, Hidróxidos de Piridostigmina, Piridoxinas, Quinidinas, Quinupristinas, Inmunoglobulinas de la rabia, Vacunas de la rabia, Ranitidinas, Remifentanilos, Riboflavinas, Rifampinas, Ropivacaínas, Samarios, Escopolaminas, Selenios, Sermorelinas, Sincálicos, Somatremes, Espectinomocinas, Estreptoquininas, Estreptomocinas, Succinilcolinas, Sufentanilos, Sulfametoxazoles, Tacrolimus, Terbutalinas, Teriparátidos, Testosteronas, Anti toxinas tetánicas, Tetracaínas, Tetradecil sulfatos, Teofilinas, Tiaminas, Tietilperacinas, Tiopentales, Hormonas estimulantes del tiroides, Tinzaparinas, Tirofibanos, Tobramicinas, Tolazolinas, Tolbutamidas, Torsemidas, Ácidos tranexámicos, Treprostiniles, Trifluoperacinas, Trimetobenzamidas, Trimetoprimis, Trometaminas, Tuberculinas, Vacunas tifoideas, Urofolitropinas, Uroquininas, Ácidos valproicos, Vasopresinas, Vecuronios, Verapamilos, Voriconazoles, Warfarinas, Vacunas de la fiebre amarilla, Zidovudinas, Cincos, Clorhidratos de Ziprasidona, Aclacinomicinas, Actinomicinas, Adriamicinas, Azaserinas, 6-Azauridinas, Carzinofilinas, Cromomicinas, Denopterinas, 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucinas, Enocitabinas, Floxuridinas, Olivomicinas, Piritrexims, Pteropterinas, Tegafures, Tubercidinas, Alteplazas, Arcitumomabs, Bevacizumabs, Toxina Botulínica de Tipo A, Toxina Botulínica de Tipo B, Pendetidas de Capromab, Daclizumabs, Dornasas alfa, Drotrecoginas alfa, Pentetatos de Imciromab y Yodo 131.

20 Suministro de insulina

Los métodos descritos en el presente documento incluyen métodos de coadministración de un polipéptido de PH20 modificado y una insulina para aumentar el suministro subcutáneo de la insulina, tal como una insulina de acción rápida (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 7.767.429; Patente de Estados Unidos n.º 7.846.431; Publicación de Estados Unidos n.º US20090304665, y Solicitud de Estados Unidos n.º de Serie 13/507.263, 13/507.262 y 13/507.261). Dichos métodos incluyen métodos de administración directa, y métodos de infusión continua y por bomba, incluyendo sistemas de bomba abierta y cerrada. Por ejemplo, son insulinas ejemplares que pueden administrarse con una hialuronidasa PH20 descrita en el presente documento insulinas de acción rápida o análogos de insulina. Por ejemplo, una insulina coadministrada incluye una insulina regular, insulina aspart, insulina lispro, insulina glulisina u otras variantes análogas similares. Son insulinas ejemplares insulinas que contienen una cadena A expuesta en SEQ ID NO: 862 y una cadena B expuesta en SEQ ID NO: 863 o variantes que contienen una o más modificaciones de aminoácidos en comparación con una insulina humana expuesta en SEQ ID NO: 862 y 863 (cadenas A y B). Por ejemplo, los expertos en la materia conocen análogos de insulina ejemplares e incluyen, pero sin limitación, los expuestos en SEQ ID NO: 862 (cadena A) y que tienen una cadena B expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 865-867.

Las coformulaciones pueden administrarse por vía subcutánea para tratar cualquier afección que sea susceptible de tratamiento con insulina. Los usos terapéuticos incluyen, pero sin limitación, tratamiento para diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2, diabetes gestacional y para control glucémico en pacientes críticamente enfermos. Por ejemplo, las coformulaciones de una insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano pueden administrarse por vía subcutánea en dosis discretas, tales como mediante una jeringa o un bolígrafo de insulina, antes de una comida como terapia de insulina prandial en sujetos con diabetes para conseguir el control glucémico. Las coformulaciones también pueden administrarse por vía subcutánea o por vía intraperitoneal usando una bomba de insulina o en el contexto de un sistema de bucle cerrado para controlar continuamente los niveles de glucosa en sangre a lo largo del día y la noche y/o para controlar las excursiones glucémicas postprandiales. Está dentro de la experiencia de un médico tratante identificar dichas enfermedades o afecciones.

Para cualquier enfermedad o afección, incluyendo todas las ejemplificadas anteriormente, para las que se indica o se ha usado una insulina de acción rápida y para las que están disponibles otros agentes y tratamientos, las coformulaciones pueden usarse en combinación con las mismas. Dependiendo de la enfermedad o afección, las combinaciones ejemplares incluyen, pero sin limitación, combinaciones con fármacos antidiabéticos, incluyendo, pero sin limitación, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, tiazolidinedionas, inhibidores de alfa-glucosidasa, análogos peptídicos, incluyendo análogos peptídicos de tipo glucagón (GLP) y análogos peptídicos inhibidores gástricos (GIP) e inhibidores de DPP-4. En otro ejemplo, las coformulaciones de una insulina de acción rápida y polipéptido de PH20 modificado descrito en el presente documento pueden administrarse en combinación con, antes de, intermitentemente con, o después de una o más insulinas adicionales, incluyendo insulina de acción rápida, e insulinas de acción basal.

2. Métodos de enfermedades y afecciones asociadas con hialuronano (por ejemplo, tumores)

En particular, la hialuronidasa PH20 puede usarse para tratar enfermedades o afecciones asociadas con hialuronano. Típicamente, las enfermedades y afecciones asociadas con hialuronano se asocian con expresión de hialuronano elevada en un tejido, célula o fluido corporal (por ejemplo, tejido tumoral o tejido asociado a tumor, sangre o espacio intersticial) en comparación con un control, por ejemplo, otro tejido, célula o fluido corporal. La expresión de hialuronano elevada puede estar elevada en comparación con un tejido, célula o fluido corporal normal, por ejemplo, un tejido, célula o fluido corporal que es análogo a la muestra que se ensaya, pero aislado de un sujeto

diferente, tal como un sujeto que es normal (es decir, no tiene una enfermedad o afección, o no tiene el tipo de enfermedad o afección que tiene el sujeto que se ensaya), por ejemplo, un sujeto no tiene una enfermedad o afección asociada con hialuronano. La expresión de hialuronano elevada puede estar elevada en comparación con un tejido análogo de otro sujeto que tiene una enfermedad o afección similar, pero cuya enfermedad no es tan grave y/o no está asociada a hialuronano o expresa relativamente menos hialuronano y por lo tanto está asociada con hialuronano en menor grado. Por ejemplo, el sujeto que se ensaya puede ser un sujeto con un cáncer asociado a hialuronano, donde las cantidades de HA en el tejido, célula o fluido están relativamente elevadas en comparación con un sujeto que tiene un cáncer menos grave, tal como un estadio temprano, diferenciado u otro tipo de cáncer. En otro ejemplo, la célula, tejido o fluido contiene niveles elevados de hialuronano en comparación con una muestra de control, tal como un fluido, tejido, extracto (por ejemplo, extracto celular o nuclear), ácido nucleico o preparación peptídica, línea celular, biopsia, patrón u otra muestra, con una cantidad conocida o cantidad relativa de HA, tal como una muestra, por ejemplo una línea celular tumoral, que se sabe que expresa niveles relativamente bajos de HA, tales como líneas celulares tumorales ejemplares descritas en el presente documento que expresan bajos niveles de HA, por ejemplo, la línea celular HCT 116, la línea celular HT29, la línea celular NCI H460, la línea celular DU145, la línea celular Capan-1 y tumores de modelos tumorales generados usando dichas líneas celulares.

Las enfermedades y afecciones asociadas a hialuronano incluyen las asociadas con alta presión de fluido intersticial, tal como presión de disco, trastornos proliferativos, tales como cáncer e hiperplasia prostática benigna, y edema. El edema puede resultar de o manifestarse en, por ejemplo, trasplante de órganos, ictus o traumatismo cerebral. Los trastornos proliferativos incluyen, pero sin limitación, cáncer, proliferación de células del músculo liso, esclerosis sistémica, cirrosis del hígado, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, cardiomiopatía idiopática, lupus eritematoso, retinopatía, por ejemplo, retinopatía diabética u otras retinopatías, hiperplasia cardíaca, trastornos asociados al sistema reproductor, tales como hiperplasia prostática benigna (BPH) y quistes ováricos, fibrosis pulmonar, endometriosis, fibromatosis, hamartomas, linfangiomatosis, sarcoidosis, tumores desmoides. Los cánceres incluyen tumores sólidos y linfáticos/sanguíneos y enfermedad metastásica, y tumores indiferenciados. Los tumores susceptibles de tratamiento típicamente muestran expresión celular y/o estromal de un hialuronano, en comparación con un tejido no canceroso del mismo tipo tisular o en comparación con un tumor no metastásico del mismo tipo tumoral. Los cánceres incluyen uno cualquiera o más de cáncer ovárico, carcinoma in situ (ISC), carcinoma de células escamosas (SCC), cáncer de próstata, cáncer pancreático, otros cánceres gástricos, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, cáncer de cerebro y cáncer de colon.

Los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento, tales como formas PEGiladas de los mismos, pueden usarse para tratar tumores. Por lo tanto, además de sus efectos antineoplásicos indirectos, las hialuronidasas también tienen efectos anticarcinogénicos directos. La hialuronidasa evita el crecimiento de tumores trasplantados a ratones (De Maeyer *et al.*, 1992, *Int. J. Cancer* 51: 657-660) e inhibe la formación de tumor tras 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 n.º 415). Se ha demostrado que la hialuronidasa PH20 trata diversos tumores (véase por ejemplo, *Publicación de Estados Unidos n.º US2010/0003238* y *Solicitud de Estados Unidos n.º de serie 13/135.817*, publicada como *Publicación de Estados Unidos n.º US20120020951*).

El cáncer rico en hialuronano puede ser un cáncer en el que las células cancerosas producen HALO, cánceres que tienen expresión elevada de hialuronano (como se determina por inmunotinción, por ejemplo, tinción histológica de secciones del tumor), cánceres que tienen HAS2 (Hialuronano sintasa 2) elevada, cánceres que no producen hialuronidasa (HYAL1) *in vitro*. Los cánceres ricos en hialuronano pueden identificarse por cualquier método para evaluar la expresión de hialuronano, y otros métodos conocidos para evaluar la expresión de proteína/ARNm.

Se han identificado varios cánceres ricos en hialuronano. En algunos casos, la expresión de hialuronano se correlaciona con mal pronóstico, por ejemplo, la tasa de supervivencia y/o tasa de supervivencia sin recurrencia reducidas, metástasis, angiogénesis, invasión de células cancerosas en otros tejidos/áreas y otros indicadores de mal pronóstico. Dicha correlación se ha observado, por ejemplo, en tumores ricos en hialuronano incluyendo cáncer ovárico, SCC, ISC, cáncer prostático, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer pancreático, (véase, por ejemplo, Anttila *et al.*, *Cancer Research*, 60: 150-155 (2000), Karvinen *et al.*, *British Journal of Dermatology*, 148: 86-94 (2003), Lipponen *et al.*, *Eur. Journal of Cancer*, 849-856 (2001), Pirinen *et al.*, *Int. J. Cancer*: 95: 12-17 (2001), Auvinen *et al.*, *American Journal of Pathology*, 156 (2): 529-536 (2000); Ropponen *et al.*, *Cancer Research*, 58: 342-347 (1998)). Por lo tanto, los cánceres ricos en hialuronano pueden tratarse mediante la administración de una hialuronidasa, tal como una PH20 soluble, para tratar uno o más síntomas del cáncer. Los tumores ricos en hialuronano incluyen, pero sin limitación, los de próstata, mama, colon, ovario, estómago, cabeza y cuello y otros tumores y cánceres.

Otras enfermedades o afecciones asociadas a hialuronano que se asocian con exceso de glucosaminoglucanos y que pueden tratarse con un polipéptido de PH20 modificado descrito en el presente documento incluyen, pero sin limitación, enfermedad cardiovascular (por ejemplo, después de reperfusión por isquemia; en arteriosclerosis); vitrectomía y trastornos y afecciones oftálmicos (por ejemplo, en métodos para licuar el humor vítreo del ojo; reducir la presión postoperatoria; otros procedimientos quirúrgicos oculares tales como glaucoma, cirugía del humor vítreo y la retina y en trasplante de la córnea); en hipodermolisis (es decir, infusión de líquidos y electrolitos en la hipodermis

de la piel); aplicaciones cosméticas (por ejemplo, en el tratamiento de celulitis, edema de “piel de cerdo” o edema de “piel de naranja”); trasplante de órganos (por ejemplo, asociado con edemas intersticiales en relación con injerto de un órgano); enfermedad pulmonar.

5 3. Otros usos

En ejemplos adicionales de su uso terapéutico, pueden usarse polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento, para dichos fines como un antídoto para la necrosis local a partir de inyección paravenosa de sustancias necróticas tales como alcaloides de la vinca (Few *et al.* (1987) *Amer. J. Matern. Child Nurs.* 12, 23-26), tratamiento de quistes ganglionares (Paul *et al.* (1997) *J Hand Surg.* 22 (2): 219-21) y tratamiento de necrosis tisular debida a insuficiencia venosa (Elder *et al.*, 1997) *Lancet* 648 - 649). También pueden usarse polipéptidos de PH20 modificados para tratar quistes ganglionares (también conocidos como un quiste de muñeca, quiste de biblia o quiste de tendón dorsal), que son la masa de tejido blando más habitual de la mano y son sacos llenos de fluidos que pueden sentirse bajo la piel.

Pueden usarse polipéptidos de PH20 modificados en el tratamiento de lesión de la médula espinal degradando proteoglucanos de condroitín sulfato (CSPG). Después de lesión de la médula espinal, se producen cicatrices gliales que contienen CSPG por astrocitos. Los CSPG desempeñan un papel crucial en la inhibición del crecimiento de axones. Además, se ha mostrado que la expresión de CSPG aumenta después de lesión del sistema nervioso central (SNC). También puede utilizarse PH20 soluble para el tratamiento de discos herniados en un proceso conocido como quimionucleólisis. La condroitinasa ABC, una enzima que escinde sustratos similares a la hialuronidasa, puede inducir la reducción de presión intradiscal en la columna lumbar. Hay tres tipos de lesiones de disco. Un disco protruido es uno que está intacto pero sobresale. En un disco extruido, la envoltura fibrosa se ha desgarrado y el NP ha supurado, pero aún está conectado al disco. En un disco secuestrado, se ha soltado un fragmento del NP del disco y está libre en el canal espinal. La quimionucleólisis es típicamente eficaz en discos protruidos y extruidos, pero no en lesiones de disco secuestrado.

4. Anticoncepción

Los polipéptidos de PH20 modificados descritos en el presente documento pueden usarse como vacunas en aplicaciones anticonceptivas. PH20 está presente en el tracto reproductor masculino, y se expresa tanto en el testículo como en el epidídimo y está presente en el espermatozoide. PH20 desempeña un papel en la fertilización facilitando la entrada del espermatozoide a través de la capa del cumulus que rodea el óvulo no fertilizado. PH20 también es capaz de unirse con ácido hialurónico (HA) en la zona pelúcida durante las fases tempranas de la fertilización. Esta unión también inicia la señalización intracelular que ayuda en la reacción del acrosoma. Se ha mostrado que la inmunización con PH20 es un anticonceptivo eficaz en cobayas macho (Primakoff *et al.* (1988) *Nature* 335: 543-546, Tung *et al.* (1997) *Biol. Reprod.* 56: 1133-1141). También se ha mostrado que es un anticonceptivo eficaz en cobayas hembra debido a la generación de anticuerpos anti PH20 que evitan la unión del espermatozoide y el óvulo. En los ejemplos del presente documento, los polipéptidos de PH20 modificados pueden ser enzimas inactivas, tales como cualquiera descrita en las Secciones C.2. Los polipéptidos pueden administrarse directamente o pueden administrarse como un virus recombinante para suministrar el antígeno.

I. Ejemplos

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

Ejemplo 1

50 GENERACIÓN DE HIALURONIDASA PH20 HUMANA RECOMBINANTE (RHUPH20)

A. Generación de una línea celular que expresa rHuPH20 soluble

Se generó una hialuronidasa PH20 humana recombinante designada rHuPH20 como se ha descrito en la Publicación de Estados Unidos n.º US20110053247 publicada. Brevemente, el plásmido pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24) (expuesto en SEQ ID NO: 5) se usó para transfectar Ovario de Hámster Chino (células CHO) (véase por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 7.767.429 y 7.781.607 y Publicación de Estados Unidos n.º 2006-0104968). El vector plasmídico HZ24 para expresión de rHuPH20 soluble contiene una cadena principal de vector pCI (Promega), ADN que codifica los aminoácidos 1-482 de hialuronidasa PH20 humana (SEQ ID NO: 2), un sitio de entrada de ribosomas interno (IRES) del virus ECMV (Clontech), y el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón. La cadena principal del vector pCI también incluye ADN que codifica el gen de resistencia a beta-lactamasa (AmpR), un origen f1 de replicación, una región promotora/potenciadora inmediata-temprana de citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El ADN que codifica la construcción rHuPH20 soluble contiene un sitio NheI y una secuencia consenso de Kozak antes del ADN que codifica la metionina en la posición de aminoácido 1 de la secuencia señal de 35 aminoácidos nativa de PH20 humana, y un codón de terminación después del ADN que codifica la tirosina correspondiente a la posición de

aminoácido 482 de la hialuronidasa PH20 humana expuesta en SEQ ID NO: 2, seguido de un sitio de restricción BamHI.

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

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

15 Las células se retiraron de las cubetas después de electroporación y se transfirieron a 5 ml de medio CD-CHO modificado para células DHFR(-), complementado con Glutamina 4 mM y Pluronic F68/l 18 ml/l (Gibco), y se permitió que crecieran en un pocillo de una placa de cultivo tisular de 6 pocillos sin selección durante 2 días a 37 °C en CO₂ 5 % en un incubador humidificado.

20 Dos días después de la electroporación, se retiraron 0,5 ml de medio de cultivo tisular de cada pocillo y se ensayaron con respecto a la presencia de actividad hialuronidasa, usando el ensayo de microturbidez descrito en el Ejemplo 8. Los resultados se exponen en la Tabla 6.

25

Tabla 6: actividad hialuronidasa inicial de células DG44 CHO transfectadas con HZ24 a las 40 horas después de la transfección		
	Dilución	Actividad (Unidades/ml)
Transfección 1 330V	1 a 10	0,25
Transfección 2 350V	1 a 10	0,52
	Dilución	Actividad (Unidades/ml)
Control Negativo	1 a 10	0,015

30 Se recogieron células de la Transfección 2 (350 V) del pocillo de cultivo tisular, se contaron y se diluyeron hasta 1×10^4 a 2×10^4 células viables por ml. Se transfirió una alícuota de 0,1 ml de la suspensión celular a cada pocillo de cinco placas de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron cien microlitros de medio CD-CHO (GIBCO) que contenía complemento de GlutaMAX™-1 4 mM (GIBCO™, Invitrogen Corporation) y sin complementos de hipoxantina y timidina a los pocillos que contenían células (volumen final de 0,2 ml). Se identificaron diez clones de las 5 placas cultivadas sin metotrexato (Tabla 7).

35

Tabla 7. Actividad hialuronidasa de clones identificados	
ID de Placa/Pocillo	Hialuronidasa Relativa
1C3	261
2C2	261
3D3	261
3E5	243
3C6	174
2G8	103
1B9	304
2D9	273
4D10	302

Se expandieron seis clones de HZ24 en cultivo y se transfirieron a matraces de agitación como suspensiones celulares individuales. Los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11 y 4D10 se sembraron en placas de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos usando una estrategia de dilución infinita bidimensional en la que las células se diluyeron 1:2 en vertical por la placa, y 1:3 en horizontal por la placa, comenzando a 5000 células en el pocillo de arriba a la izquierda. Los clones diluidos se cultivaron en un fondo de 500 células DG44 CHO no transfectadas por pocillo, para proporcionar los factores de crecimiento necesarios para los días iniciales de cultivo. Se prepararon diez placas por subclón, con 5 placas que contenían metotrexato 50 nM y 5 placas sin metotrexato.

El clon 3D3 produjo 24 subclones visuales (13 del tratamiento sin metotrexato, y 11 del tratamiento con metotrexato 50 nM). Se midió la actividad hialuronidasa significativa en los sobrenadantes de 8 de los 24 subclones (>50 unidades/ml) y estos 8 subclones se expandieron a matraces de cultivo tisular T-25. Los clones aislados del protocolo de tratamiento con metotrexato se expandieron en presencia de metotrexato 50 nM. El clon 3D35M se expandió adicionalmente en metotrexato 500 nM dando lugar a clones productores de actividad hialuronidasa en más de 1.000 Unidades/ml en matraces de agitación (clon 3D35M o Gen1 3D35M). Se preparó después un banco de células maestro (MCB) de las células 3D35M.

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

La línea celular Gen1 3D35M descrita en el Ejemplo 1.A se adaptó a mayores niveles de metotrexato para producir clones de generación 2 (Gen2). Se sembraron células 3D35M a partir de cultivos que contenían metotrexato establecidos en medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 1,0 µM. Las células se adaptaron a un mayor nivel de metotrexato cultivando y pasándolas 9 veces durante un periodo de 46 días en un incubador humidificado a 37 °C, CO₂ 7 %. La población amplificada de células se clonó mediante dilución limitante en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían medio con metotrexato 2,0 µM. Después de aproximadamente 4 semanas, los clones se identificaron y se seleccionó el clon 3E10B para expansión. Se incubaron células 3E10B en medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 2,0 µM durante 20 pases. Se creó un banco de células maestro (MCB) de la línea celular 3E10B y se congeló y se usó para estudios posteriores.

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

Las células 2B2 resultantes son células DG44 CHO deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr-) que expresan PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20). La PH20 soluble está presente en células 2B2 en un número de copias de aproximadamente 206 copias/célula. El análisis de transferencia de Southern de ADN de células 2B2 genómico digerido con Spe I, Xba I y BamH I/Hind III usando una sonda específica de rHuPH20 reveló el siguiente perfil de digestión de restricción: una banda de hibridación principal de ~7,7 kb y cuatro bandas de hibridación secundarias ~13,9, ~6,6, ~5,7 y ~4,6 kb) con ADN digerido con Spe I; una banda de hibridación principal de ~5,0 kb y dos bandas de hibridación secundarias (~13,9 y ~6,5 kb) con ADN digerido con Xba I; y una banda de hibridación individual de ~1,4 kb observada usando ADN de 2B2 digerido con BamH I/Hind III.

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

Se descongeló un vial de HZ24-2B2 y se expandió desde matraces de agitación a través de matraces de centrifugación de 36 l en medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con metotrexato 20 µM y GlutaMAX-1™ (Invitrogen). Brevemente, el vial de células se descongeló en un baño de agua a 37 °C, se añadió medio y las células se centrifugaron. Las células se resuspendieron en un matraz de agitación de 125 ml con 20 ml de medio nuevo y se colocaron en un incubador de CO₂ 7 %, a 37 °C. Las células se expandieron hasta 40 ml en el matraz de agitación de 125 ml. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/ml, el cultivo se expandió a un matraz de centrifugación de 125 ml en un volumen de cultivo de 100 ml. El matraz se incubó a 37 °C, CO₂ 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/ml, el cultivo se expandió a un matraz de centrifugación de 250 ml en un volumen de cultivo de 200 ml, y el matraz se incubó a 37 °C, CO₂ 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/ml, el cultivo se expandió a un matraz de centrifugación de 1 l en un volumen de cultivo de 800 ml y se incubó a 37 °C, CO₂ 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/ml el cultivo se expandió a un matraz de centrifugación de 6 l en un volumen de cultivo de 5000 ml y se incubó a 37 °C, CO₂ 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/ml el cultivo se expandió en un matraz de centrifugación de 36 l en volumen de cultivo de 32 l y se incubó a 37 °C, CO₂ 7 %.

Se esterilizó un reactor de 400 l y se añadieron 230 ml de medio CD-CHO. Antes de su uso, se comprobó si el reactor tenía contaminación. Se transfirieron aproximadamente 30 l de células de los matraces de centrifugación de

36 l al biorreactor de 400 l (Braun) a una densidad de inoculación de $4,0 \times 10^5$ células viables por ml y un volumen total de 260 l. Los parámetros fueron: punto de ajuste de temperatura, 37 °C; velocidad del impulsor 40-55 RPM; Presión del Vaso: 20,68 kPa; Chorro de Aire 0,5-1,5 l/min; Superposición de aire: 3 l/min. Se tomaron muestras del reactor diariamente para recuentos celulares, verificación de pH, análisis de medios, producción y conservación de proteínas. Además, durante el procesamiento se añadieron suministros de nutrientes. A las 120 horas (día 5), se añadieron 10,4 l de medio de suministro n.º 1 (CD-CHO 4 x + glucosa 33 g/l + Glutamax-1™ 160 ml/l + Yeastolato 83 ml/l de + rHulsulina 33 mg/l). A las 168 horas (día 7), se añadieron 10,8 l de suministro n.º 2 (CD-CHO 2 x + glucosa 33 g/l + Glutamax-1™ 80 ml/l + Yeastolato 167 ml/l + butirato sódico 0,92 g/l), y la temperatura del cultivo se cambió a 36,5 °C. A las 216 horas (día 9), se añadieron 10,8 l de suministro n.º 3 y la temperatura del cultivo se cambió a 36 °C. A las 264 horas (día 11), se añadieron 10,8 l de suministro n.º 4 (CD-CHO 1x + glucosa 33 g/l + Glutamax-1™ 33 ml/l + Yeastolato 250 ml/l + butirato sódico 0,92 g/l), y la temperatura de cultivo se cambió a 35,5 °C. Se observó que la adición del medio de suministro potenciaba drásticamente la producción de rHuPH20 soluble en los estadios finales de producción. El reactor se recogió a los 14 o 15 días o cuando la viabilidad de las células descendió por debajo del 40 %. El proceso dio como resultado una productividad final de 17.000 unidades por ml con una densidad celular máxima de 12 millones de células/ml. En el momento de la recogida, se tomaron muestras del cultivo para micoplasma, biocarga, endotoxina y virus *in vitro* e *in vivo*, mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y actividad enzimática.

El cultivo se bombeó por una bomba peristáltica a través de cuatro módulos de sistema de filtración Millistak (Millipore) en paralelo, conteniendo cada uno una capa de tierra diatomea graduada a 4-8 µm y una capa de tierra diatomea graduada a 1,4-1,1 µm, seguido de una membrana de celulosa, después a través de un sistema de filtración Millistak individual (Millipore) que contiene una capa de tierra diatomea graduada a 0,4-0,11 µm y una capa de tierra diatomea graduada a <0,1 µm, seguido de una membrana de celulosa, y después a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa flexible de un único uso estéril con una capacidad de 350 l. El fluido de cultivo celular recogido se complementó con EDTA 10 mM y Tris 10 mM hasta un pH de 7,5. El cultivo se concentró 10x con un aparato de filtración de flujo tangencial (TFF) usando cuatro filtros de poliéter sulfona (PES) de punto de corte de peso molecular (PCPM) de 30 kDa de TFF Sartolice (Sartorius), seguido de un intercambio de tampón 10X con Tris mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 a un filtro final de 0,22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 50 l.

El producto recogido diafiltrado y concentrado se inactivó para virus. Antes de la inactivación viral, se preparó una solución de Triton® X-100 10 %, tri(n-butil) fosfato (TNBP) 3 %. El producto recogido diafiltrado y concentrado se expuso a Triton® X-100 1 %, TNBP 0,3 % durante 1 hora en un vaso de reacción de vidrio de 36 l inmediatamente antes de la purificación en la columna Q.

35 D. Purificación de rHuPH20 soluble en Gen2

Se preparó una columna de intercambio iónico de Q Sepharose (Pharmacia) (9 l de resina, H = 29 cm, D = 20 cm). Se recogieron muestras de lavado para una determinación del pH, la conductividad y la endotoxina (ensayo LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5. Después de la inactivación viral, el producto recogido diafiltrado y concentrado se cargó en la columna Q a un caudal de 100 cm/h. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 y Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. La proteína se eluyó con Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0 en un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril. La muestra de eluato se ensayó con respecto a carga biológica, concentración de proteínas y actividad hialuronidasa. Se tomaron lecturas de absorbancia A₂₈₀ al comienzo y al final del intercambio.

A continuación se realizó cromatografía de interacción hidrófoba de Fenil-Sepharose (Pharmacia). Se preparó una columna de Fenil-Sepharose (PS) (19-21 l de resina, H = 29 cm, D = 30 cm). El lavado se recogió y se tomaron muestras de él para determinar el pH, la conductividad y la endotoxina (ensayo LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato potásico 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. El eluato de proteínas de la columna de Q sepharose se complementó con sulfato de amonio 2 M, fosfato potásico 1 M y soluciones de reserva de CaCl₂ 1 M para producir concentraciones finales de 5 mM, 0,5 mM y 0,1 mM, respectivamente. La proteína se cargó en la columna de PS a un caudal de 100 cm/h y se recogió el flujo continuo de la columna. La columna se lavó con fosfato potásico 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl₂ 0,1 M pH 7,0 a 100 cm/h y el lavado se añadió al flujo continuo recogido. Combinado con el lavado de columna, el flujo continuo se pasó a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril. Se tomaron muestras de flujo continuo para determinar la carga biológica, concentración de proteínas y actividad enzimática.

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

Se preparó la columna de hidroxapatita (HAP) (Biorad). El lavado se recogió y se ensayó con respecto a pH, conductividad y endotoxina (ensayo LAL). La columna se equilibró con fosfato potásico 5 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. La proteína purificada con boronato de aminofenilo se complementó a concentraciones finales de fosfato potásico 5 mM y CaCl₂ 0,1 mM y se cargó en la columna de HAP a un caudal de 100 cm/h. La columna se lavó con fosfato potásico 5 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM. La columna se lavó a continuación con fosfato potásico 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM. La proteína se eluyó con fosfato potásico 70 mM, pH 7,0 y se pasó a través de un filtro estéril de 0,22 µm a una bolsa estéril. La muestra eluida se ensayó con respecto a carga biológica, concentración de proteínas y actividad enzimática.

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

La proteína en el filtrado se concentró después a 10 mg/ml usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) Sartoclon slice de punto de corte de peso molecular (PCPM) de 10 kDa (Sartorius). El filtro se preparó en primer lugar lavando con histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0 y se tomaron muestras del permeado para determinar el pH y la conductividad. Después de la concentración, se tomaron muestras de la proteína concentrada y se ensayó con respecto a concentración de proteínas y actividad enzimática. Se realizó un intercambio de tampón 6x en la proteína concentrada al tampón final: histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0. Después del intercambio de tampón, la proteína concentrada se pasó a través de un filtro de 0,22 µm a una bolsa de almacenamiento estéril de 20 l. Se tomaron muestras de la proteína y se ensayó con respecto a concentración de proteínas, actividad enzimática, grupos sulfhidrilo libres, perfiles de oligosacáridos y osmolalidad. Se usó el número de lote WRS2 como un patrón en los ensayos descritos posteriormente, los resultados mostraron que la descripción del ensayo para la apariencia era transparente e incolora; el pH era de 7,4; el nivel de endotoxinas era <0,01 UE/ml; la osmolalidad era de 308 mOsm/kg; la densidad era de 1,005 g/ml; el contenido de rHuPH20 era de 1,3 ppm; y la actividad hialuronidasa era de 145 U USP/ml.

La proteína a granel esterilizada por filtración se distribuyó después de forma aséptica a 20 ml en viales de Teflón estériles de 30 ml (Nalgene). Los viales se congelaron después inmediatamente y se almacenaron a -20 ± 5 °C.

35 Ejemplo 2

GENERACIÓN DE BIBLIOTECA DE MUTANTES DE PH20

40 A. Clonación y mutagénesis

En este ejemplo, se creó una biblioteca de hialuronidasa PH20 humana clonando ADN que codificaba PH20 humana en un plásmido seguido de transfección y expresión de proteínas.

La biblioteca se creó por mutagénesis de un molde de PH20 que es una versión con codones optimizados de PH20 con una secuencia líder Ig Kappa. Específicamente, para generar la biblioteca de variantes, el vector de expresión HZ24-PH20(OHO)-IRES-SEAP (expuesto en SEQ ID NO: 4) se usó como un molde, que contiene la secuencia de nucleótidos que codifican PH20 expuesta en SEQ ID NO: 1, que codifica una PH20 precursora expuesta en SEQ ID NO: 2 o una PH20 madura expuesta en SEQ ID NO: 3 que carece de los restos 1-22 correspondientes a la secuencia señal de IgK. La cadena principal del vector derivó del vector HZ24 original que contenía el marcador de selección de DHFR (véase Ejemplo 1 y SEQ ID NO: 5) con la adición de una secuencia líder de IgK y optimización de codones. El vector de expresión también se modificó para contener el gen para fosfatasa alcalina secretada (SEAP). Por lo tanto, además de la secuencia que codifica PH20, el vector de expresión HZ24-PH20(OHO)-IRES-SEAP también contiene un sitio de entrada de ribosomas interno (EMCV IRES) que está ligado a la secuencia codificante del gen para la fosfatasa alcalina secretada (SEAP), y un promotor de CMV individual que conduce la expresión de PH20 y SEAP en la construcción. También contiene un gen para resistencia a ampicilina. En referencia a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4, la secuencia de nucleótidos que codifica PH20 corresponde a los nucleótidos 1058-2464 (incluyendo la secuencia líder de IgK), la secuencia de nucleótidos que codifica SEAP corresponde a los nucleótidos 2970-4529, y el gen de resistencia a ampicilina corresponde a los nucleótidos 5778-6635.

La primera biblioteca se creó para generar proteínas variantes codificadas donde cada uno de los restos 23-469 de SEQ ID NO: 2 (correspondientes a los restos 1-447 de SEQ ID NO: 3 o los restos 36-482 de SEQ ID NO: 6) se cambió a uno de aproximadamente 15 restos de aminoácidos, de modo que cada miembro contenía un único cambio de aminoácido. La biblioteca resultante contenía 6753 miembros variantes, conteniendo cada uno una única mutación de aminoácido en comparación con los restos 23-469 de SEQ ID NO: 2 (correspondiente a los restos 1-447 de SEQ ID NO: 3 o los restos 36-482 de SEQ ID NO: 6). Se prepararon reservas de glicerol de la biblioteca

5 resultante y se almacenaron a -80 °C. Los reemplazos de aminoácidos (mut) en cada miembro se enumeran en la Tabla 8 posterior, y corresponden a reemplazos de aminoácidos en referencia a la secuencia de aminoácidos de PH20 expuesta en SEQ ID NO: 3 (y SEQ ID NO: 7 o 32-66, que son la secuencia madura de PH20 u otros fragmentos truncados en el extremo C terminal de la misma). Los codones mutados correspondientes (cod) de cada variante de PH20 en la biblioteca también se enumeran en la Tabla 8, y corresponden a cambios de restos de nucleótidos en el nucleótido codificante correspondiente para PH20 expuesto como 1058-2464 de SEQ ID NO: 4. Cada miembro se expresó y se exploró con respecto a actividad hialuronidasa como se describe posteriormente.

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
L001A	GCG	Y066S	AGT	R132N	AAT	G198T	ACT	V265G	GGT	I331K	AAG
L001C	TGT	Y066T	ACG	R132P	CCT	G198V	GTT	V265H	CAT	I331L	CTG
L001D	GAT	Y066V	GTG	R132Q	CAG	G198W	TGG	V265I	ATT	I331Q	CAG
L001E	GAG	I067C	TGT	R132S	AGT	G198Y	TAT	V265K	AAG	I331R	CGT
L001F	TTT	I067D	GAT	R132T	ACT	Y199A	GCG	V265L	CTG	I331S	AGT
L001G	GGT	I067E	GAG	R132V	GTG	Y199C	TGT	V265M	ATG	I331T	ACT
L001H	CAT	I067F	TTT	R132Y	TAT	Y199E	GAG	V265N	AAT	I331W	TGG
L001K	AAG	I067G	GGG	S133A	GCT	Y199G	GGG	V265P	CCT	I331Y	TAT
L001N	AAT	I067H	CAT	S133D	GAT	Y199H	CAT	V265Q	CAG	I332A	GCT
L001P	CCG	I067L	TTG	S133E	GAG	Y199I	ATT	V265R	AGG	I332C	TGT
L001Q	CAG	I067N	AAT	S133F	TTT	Y199K	AAG	V265S	TCT	I332D	GAT
L001R	CGG	I067P	CCG	S133G	GGG	Y199L	CTT	V265W	TGG	I332E	GAG
L001S	TCT	I067Q	CAG	S133H	CAT	Y199N	AAT	V265Y	TAT	I332F	TTT
L001T	ACG	I067R	CGG	S133I	ATT	Y199P	CCT	F266A	GCG	I332G	GGT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
L001V	GTG	I067T	ACG	S133L	CTG	Y199Q	CAG	F266C	TGT	I332H	CAT
L001W	TGG	I067V	GTT	S133M	ATG	Y199R	AGG	F266D	GAT	I332K	AAG
N002A	GCT	I067W	TGG	S133N	AAT	Y199S	TCG	F266G	GGG	I332L	CTG
N002C	TGT	I067Y	TAT	S133P	CCT	Y199T	ACG	F266H	CAT	I332N	AAT
N002F	TTT	D068A	GCT	S133R	CGG	Y199W	TGG	F266L	CTT	I332P	CCT
N002G	GGG	D068C	TGT	S133T	ACT	N200A	GCT	F266M	CCG	I332R	AGG
N002H	CAT	D068E	GAG	S133V	GTT	N200D	GAT	F266P	ATG	I332S	AGT
N002I	ATT	D068G	GGG	S133W	TGG	N200F	CAG	F266Q	CAG	I332T	ACT
N002K	AAG	D068H	CAC	I134A	GCT	N200G	GGT	F266R	CGG	I332Y	TAT
N002L	TTG	D068I	ATT	I134C	TGT	N200H	CAT	F266S	TCG	N333A	GCT
N002P	CCG	D068K	AAG	I134D	GAT	N200K	AAG	F266T	ACG	N333E	GAG
N002Q	CAG	D068L	TTG	I134F	TTT	N200L	CTG	F266V	GTG	N333G	GGT
N002S	AGT	D068P	CCT	I134G	GGG	N200M	ATG	F266W	TGG	N333H	CAT
N002T	ACG	D068Q	CAG	I134H	CAT	N200P	CCT	F266Y	TAT	N333I	ATT
N002V	GTT	D068R	CGG	I134K	AAG	N200Q	CAG	A267D	GAT	N333K	AAG
N002W	TGG	D068S	TCG	I134L	TTG	N200R	AGG	A267E	GAG	N333L	CTG
N002Y	TAT	D068T	ACT	I134P	CCT	N200S	TCT	A267G	GGT	N333M	ATG
F003A	GCT	D068V	GTG	I134Q	CAG	N200T	ACT	A267H	CAT	N333P	CCT
F003E	GAG	D068Y	TAT	I134R	CGT	N200V	GTG	A267I	ATT	N333R	CGG
F003G	GGG	S069A	GCT	I134S	TCG	N200W	TGG	A267K	AAG	N333S	AGT
F003H	CAT	S069C	TGT	I134T	ACT	N200Y	TAT	A267L	CTT	N333T	ACT
F003I	ATT	S069E	GAG	I1334V	GTG	G201A	GCG	A267M	ATG	N333V	GTT
F003K	AAG	S069F	TTT	I134W	TGG	G201E	GAG	A267N	AAT	N333W	TGG
F003L	TTG	S069G	GGG	E135A	GCT	G201F	TTT	A267P	CCG	N333Y	TAT
F003M	ATG	S069I	ATT	E135C	TGT	G201H	CAT	A267R	AGG	V334A	GCT
F003N	AAT	S069L	CTT	E135D	GAT	G201K	AAG	A267S	TCT	V334C	TGT
F003P	CCT	S069M	ATG	E135F	TTT	G201L	CTT	A267T	GTG	V334D	GAT
F003R	CGT	S069N	AAT	E135G	GGG	G201M	ATG	A267V	ACT	V334E	GAG
F003S	TCG	S069P	CCT	E135H	CAT	G201N	AAT	A267W	TGG	V334G	GGG
F003T	ACT	S069R	CGT	E135K	AAG	G201P	CCT	Y268A	GCT	V334H	CAT
F003V	GTG	S069T	ACG	E135L	TTG	G201Q	CAG	Y268C	TGT	V334L	TTG
F003Y	TAT	S069V	GTT	E135N	AAT	G201R	CGT	Y268F	TTT	V334M	ATG
R004A	GCG	S069W	TGG	E135P	CCT	G201S	TCG	Y268G	GGG	V334N	AAT
R004D	GAT	S069Y	TAT	E135Q	CAG	G201T	ACG	Y268H	CAT	V334P	CCT
R004E	GAG	I070A	GCT	E135R	CGG	G201V	GTG	Y268K	AAG	V334Q	CAG
R004F	TTT	I070C	TGT	E135S	TCT	G201W	TGG	Y268L	CTT	V334R	AGG
R004G	GGG	I070F	TTT	E135W	TGG	S202A	GCG	Y268N	AAT	V334S	TCT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
R004I	ATT	I070G	GGG	E135Y	TAT	S202E	GAG	Y268P	CCT	V334T	ACT
R004L	TTG	I070H	CAT	L136A	GCT	S202F	TTT	Y268Q	CAG	V334Y	TAT
R004M	ATG	I070K	AAG	L136C	TGT	S202G	GGT	Y268R	CGT	T335A	GCT
R004N	AAT	I070L	TTG	L136D	GAT	S202H	CAT	Y268S	TCG	T335C	TGT
R004P	CCT	I070N	AAT	L136F	TTT	S202K	AAG	Y268T	ACT	T335F	TTT
R004S	TCT	I070P	CCG	L136G	GGT	S202M	ATG	Y268V	GTG	T335G	GGT
R004T	ACG	I070Q	CAG	L136H	CAT	S202N	AAT	Y268W	TGG	T335H	CAT
R004V	GTG	I070R	CGT	L136I	ATT	S202P	CCT	T269A	GCT	T335I	ATT
R004W	TGG	I070S	TCT	L136M	ATG	S202Q	CAG	T269C	TGT	T335K	AAG
R004Y	TAT	I070T	ACT	L136N	AAT	S202R	CGT	T269D	GAT	T335L	TTG
A005D	GAT	I070V	GTT	L136P	CCT	S202T	ACG	T269E	GAG	T335N	AAT
A005G	GGG	I070Y	TAT	L136Q	CAG	S202V	GTT	T269G	GGT	T335P	CCT
A005H	CAT	T071A	GCT	L136R	CGT	S202W	TGG	T269K	AAG	T335Q	CAG
A005I	ATT	T071C	TGT	L136S	TCG	S202Y	TAT	T269L	CTG	T335S	TCT
A005L	CTT	T071D	GAT	L136T	ACT	C203A	GCG	T269M	ATG	T335V	GTG
A005M	ATG	T071E	GAG	L136W	TGG	C203D	GAT	T269N	AAT	T335W	TGG
A005N	AAT	T071G	GGG	V137A	GCT	C203E	GAG	T269P	CCG	T335Y	TAT
A005P	CCG	T071H	CAT	V137C	TGT	C203G	GGG	T269Q	CAG	L336A	GCT
A005Q	CAG	T071L	TTG	V137E	GAG	C203H	CAT	T269R	AGG	L336E	GAG
A005R	AGG	T071M	ATG	V137F	TTT	C203L	CTT	T269S	TCG	L336F	TTT
A005S	TCG	T071N	AAT	V137G	GGG	C203M	ATG	T269V	GTG	L336G	GGG
A005T	ACG	T071P	CCT	V137H	CAT	C203N	AAT	T269Y	TAT	L336H	CAT
A005V	GTG	T071Q	CAG	V137I	ATT	C203P	CCG	R270A	GCT	L336K	AAG
A005W	TGG	T071R	CGG	V137L	TTG	C203Q	CAG	R270C	TGT	L336M	ATG
A005Y	TAT	T071S	TCG	V137N	AAT	C203R	AGG	R270D	GAT	L336N	AAT
P006A	GCG	T071V	GTG	V137P	CCT	C203S	AGT	R270E	GAG	L336P	CCT
P006D	GAT	T071Y	TAT	V137Q	CAG	C203T	ACT	R270F	TTT	L336R	AGG
P006E	GAG	G072A	GCT	V137R	CGT	C203V	GTG	R270G	GGG	L336S	TCT
P006F	TTT	G072C	TGT	V137S	TCT	C203W	TGG	R270H	CAT	L336T	ACT
P006G	GGG	G072D	GAT	V137T	ACT	F204A	GCG	R270I	ATT	L336V	GTG
P006H	CAT	G072E	GAG	V137W	TGG	F204C	TGT	R270M	ATG	L336W	TGG
P006K	AAG	G072F	TTT	V137Y	TAT	F204E	GAG	R270N	AAT	L336Y	TAT
P006L	CTT	G072H	CAT	Q138A	GCT	F204G	GGG	R270P	CCT	A337C	TGT
P006N	AAT	G072I	ATT	Q138C	TGT	F204H	CAT	R270Q	CAG	A337F	TTT
P006Q	CAG	G072K	AAG	Q138E	GAG	F204I	ATT	R270S	TCG	A337G	GGG
P006R	AGG	G072L	TTG	Q138F	TTT	F204K	AAG	R270T	ACT	A337H	CAT
P006S	AGT	G072M	ATG	Q138G	GGG	F204L	CTT	R270V	GTG	A337I	ATT

Tabla 8: Variantes de PH20											
mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
P006T	ACG	G072P	CCT	Q138H	CAT	F204M	ATG	R270Y	TAT	A337K	AAG
P006V	GTG	G072Q	CAG	Q138I	ATT	F204P	CCT	I271A	GCT	A337L	TTG
P006W	TGG	G072R	CGG	Q138L	TTG	F204Q	CAG	I271D	GAT	A337M	ATG
P006Y	TAT	G072S	TCT	Q138M	ATG	F204R	AGG	I271E	GAG	A337N	AAT
P007A	GCT	G072T	ACT	Q138N	AAT	F204S	AGT	I271F	TTT	A337P	CCT
P007C	TGT	G072V	GTG	Q138R	CGT	F204T	ACT	I271G	GGG	A337R	CGG
P007D	GAT	G072W	TGG	Q138S	AGT	F204V	GTG	I271H	CAT	A337S	TCT
P007F	TTT	G072Y	TAT	Q138V	GTT	F204W	TGG	I271K	AAG	A337T	ACT
P007G	GGT	V073A	GCG	Q138W	TGG	N205A	GCG	I271L	CTT	A337V	GTT
P007H	CAT	V073C	TGT	Q138Y	TAT	N205D	GAT	I271M	ATG	A337W	TGG
P007I	ATT	V073D	GAT	Q139A	GCT	N205E	GAG	I271P	CCT	A338C	TGT
P007K	AAG	V073F	TTT	Q139C	TGT	N205F	TTT	I271R	AGG	A338D	GAT
P007L	TTG	V073G	GGG	Q139D	GAT	N205G	GGG	I271S	AGT	A338E	GAG
P007M	ATG	V073H	CAT	Q139E	GAG	N205K	AAG	I271T	ACT	A338F	TTT
P007Q	CAG	V073K	AAG	Q139F	TTT	N205L	CTG	I271V	GTT	A338G	GGG
P007R	CGG	V073L	CTT	Q139G	GGG	N205M	ATG	I271W	TGG	A338H	CAT
P007S	AGT	V073M	ATG	Q139H	CAT	N205P	CCT	V272A	GCT	A338I	ATT
P007T	ACT	V073P	CCG	Q139K	AAG	N205R	AGG	V272C	TGT	A338K	AAG
P007V	GTG	V073Q	CAG	Q139L	CTG	N205S	TCG	V272D	GAT	A338L	CTT
P007W	TGG	V073R	TGG	Q139M	ATG	N205T	ACG	V272E	GAG	A338P	CCT
P007Y	TAT	V073S	TCG	Q139P	CCT	N205V	GTG	V272G	GGG	A338Q	CAG
V008A	GCT	V073T	ACG	Q139R	CGT	N205W	TGG	V272H	CAT	A338R	CGT
V008D	GAT	V073W	CGG	Q139S	TCT	N205Y	TAT	V272K	AAG	A338S	TCG
V008E	GAG	T074A	GCT	Q139T	ACT	V206C	TGT	V272L	TTG	A338T	ACT
V008G	GGT	T074C	TGT	Q139V	GTG	V206D	GAT	V272M	ATG	A338V	GTG
V008H	CAT	T074E	GAG	Q140A	GCT	V206F	TTT	V272N	AAT	K339D	GAT
V008I	ATT	T074F	TTT	Q140C	TGT	V206G	GGG	V272P	CCT	K339E	GAG
V008L	TTG	T074G	GGT	Q140D	GAT	V206H	CAT	V272R	AGG	K339F	TTT
V008M	ATG	T074H	CAT	Q140F	TTT	V206I	ATT	V272S	TCG	K339G	GGG
V008N	AAT	T074K	AAG	Q140G	GGG	V206K	AAG	V272T	ACT	K339H	CAT
V008P	CCT	T074L	TTG	Q140H	CAT	V206L	CTT	V272W	TGG	K339L	CTG
V008Q	CAG	T074M	ATG	Q140I	ATT	V206M	ATG	F273A	GCT	K339M	ATG
V008R	CGG	T074N	AAT	Q140K	AAG	V206P	CCG	F273C	TGT	K339N	AAT
V008S	TCT	T074P	CCG	Q140L	TTG	V206Q	CAG	F273D	GAT	K339P	CCT
V008T	ACT	T074R	CGG	Q140M	ATG	V206R	CGG	F273G	GGG	K339R	CGG
V008W	TGG	T074S	TCG	Q140R	CGG	V206S	TCT	F273H	CAT	K339S	AGT
I009A	GCT	T074V	GTG	Q140S	AGT	V206T	ACG	F273I	ATT	K339T	ACT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
I009C	TGT	T074W	TGG	Q140V	GTG	V206Y	TAT	F273L	CTG	K339V	GTT
I009D	GAT	V075A	GCG	Q140W	TGG	E207A	GCT	F273P	CCT	K339W	TGG
I009E	GAG	V075C	TGT	Q140Y	TAT	E207F	TTT	F273Q	CAG	K339Y	TAT
I009G	GGG	V075D	GAT	N141A	GCT	E207G	GGG	F273R	CGG	M340A	GCT
I009H	CAT	V075F	TTT	N141D	GAT	E207H	CAT	F273S	TCG	M340C	TGT
I009K	AAG	V075G	GGG	N141E	GAG	E207I	ATT	F273T	ACG	M340D	GAT
I009L	CTT	V075H	CAT	N141F	TTT	E207K	AAG	F273V	GTT	M340E	GAG
I009N	AAT	V075L	CTT	N141G	GGT	E207L	TTG	F273W	TGG	M340F	TTT
I009P	CCT	V075M	ATG	N141H	CAT	E207M	ATG	F273Y	TAT	M340G	GGG
I009Q	CAG	V075N	AAT	N141L	TTG	E207P	CCG	T274A	GCG	M340H	CAT
I009R	CGG	V075P	CCG	N141M	ATG	E207Q	CAG	T274C	TGT	M340K	AAG
I009S	AGT	V075Q	CAG	N141P	CCT	E207R	AGG	T274E	GAG	M340L	CTG
I009T	ACG	V075R	CGT	N141Q	CAG	E207S	TCT	T274F	ATG	M340P	CCT
I009V	GTT	V075S	TCT	N141R	CGT	E207T	ACG	T274G	GGG	M340R	CGG
P010D	GAT	V075T	ACT	N141S	TCT	E207V	GTT	T274H	CAT	M340S	TCG
P010E	GAG	V075W	TGG	N141T	ACT	E207W	TGG	T274L	CTG	M340T	ACT
P010F	TTT	V075Y	TAT	N141V	GTT	I208A	GCT	T274N	AAT	M340V	GTG
P010G	GGT	N076A	GCT	N141W	TGG	I208C	TGT	T274P	CCT	M340W	TGG
P010H	CAT	N076C	TGT	N141Y	TAT	I208D	GAT	T274Q	CAG	C341A	GCT
P010I	ATT	N076D	GAT	V142C	TGT	I208E	GAG	T274R	CGT	C341E	GAG
P010L	CTT	N076F	TTT	V142D	GAT	I208G	GGG	T274S	AGT	C341G	GGG
P010M	ATG	N076G	GGG	V142E	GAG	I208K	AAG	T274V	GTT	C341H	CAT
P010N	AAT	N076I	ATT	V142G	GGG	I208L	TTG	T274W	TGG	C341K	AAG
P010Q	CAG	N076K	AAG	V142H	CAT	I208M	ATG	T274Y	TAT	C341L	TTG
POIOR	cGG	N076L	CTG	V142I	ATT	I208P	CCG	D275A	GCT	C341M	ATG
P010S	TCG	N076P	CCT	V142K	AAG	I208Q	CAG	D275C	TGT	C341N	AAT
P010T	ACT	N076Q	CAG	V142L	TTG	I208R	CGT	D275E	GAG	C341Q	CAG
P010W	TGG	N076R	CGT	V142M	ATG	I208S	AGT	D275F	TTT	C341R	AGG
P010Y	TAT	N076S	AGT	V142N	AAT	I208T	ACG	D275G	GGG	C341S	TCT
N011A	GCG	N076T	ACT	V142P	CCT	I208V	GTG	D275I	ATT	C341T	ACT
N011C	TGT	N076V	GTT	V142Q	CAG	I208W	TGG	D275K	AAG	C341V	GTT
N011D	GAT	N076W	TGG	V142R	CGG	K209A	GCG	D275L	CTT	C341W	TGG
N011E	GAG	G077D	GAT	V142S	AGT	K209C	TGT	D275M	ATG	C341Y	TAT
N011F	TTT	G077E	GAG	V142T	ACT	K209D	GAT	D275Q	CAG	S342A	GCT
N011G	GGG	G077F	TTT	Q143C	TGT	K209E	GAG	D275R	CGT	S342D	GAT
N011H	CAT	G077H	CAT	Q143E	GAG	K209F	TTT	D275S	TCG	S342E	GAG
N011I	ATT	G077K	AAG	Q143F	TTT	K209G	GGT	D275T	ACT	S342F	TTT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
N011K	AAG	G077L	TTG	Q143G	GGG	K209L	CTG	D275V	GTG	S342G	GGG
N011L	CTG	G077M	ATG	Q143H	CAT	K209N	AAT	D275W	TGG	S342H	CAT
N011P	CCG	G077N	AAT	Q143I	ATT	K209P	CCG	Q276C	TGT	S342I	ATT
N011S	TCG	G077P	CCG	Q143K	AAG	K209R	CGG	Q276D	GAT	S342K	AAG
N011T	ACG	G077Q	CAG	Q143L	TTG	K209S	AGT	Q276E	GAG	S342L	TTG
N011W	TGG	G077R	CGT	Q143M	ATG	K209T	ACT	Q276F	TTT	S342M	ATG
N011Y	TAT	G077S	TCG	Q143N	AAT	K209V	GTT	Q276G	GGG	S342P	CCT
V012A	GCT	G077T	ACG	Q143P	CCT	K209W	TGG	Q276H	CAT	S342Q	CAG
V012D	GAT	G077V	GTG	Q143R	CGG	K209Y	TAT	Q276I	ATT	S342R	CGG
V012E	GAG	G077Y	TAT	Q143S	TCG	R210A	GCG	Q276L	CTT	S342T	ACT
V012G	GGG	G078A	GCG	Q143T	ACT	R210C	TGT	Q276M	ATG	S342Y	TAT
V012H	CAT	G078C	TGT	Q143V	GTG	R210D	GAT	Q276P	CCT	Q343C	TGT
V012I	ATT	G078D	GAT	Q143Y	TAT	R210E	GAG	Q276R	CGT	Q343D	GAT
V012K	AAG	G078H	CAT	L144A	GCT	R210G	GGT	Q276S	AGT	Q343E	GAG
V012L	CTT	G078I	ATT	L144E	GAG	R210K	AAG	Q276V	GTT	Q343F	TTT
V012M	ATG	G078K	AAG	L144F	TTT	R210L	CTG	Q276W	TGG	Q343G	GGG
V012N	AAT	G078L	TTG	L144G	GGG	R210M	ATG	Q276Y	TAT	Q343I	ATT
V012P	CCG	G078M	ATG	L144I	ATT	R210N	AAT	V277A	GCT	Q343L	CTT
V012R	AGG	G078P	CCG	L144K	AAG	R210P	CCT	V277C	TGT	Q343M	ATG
V012S	TCG	G078Q	CAG	L144N	AAT	R210S	TCG	V277D	GAT	Q343P	CCT
V012T	ACT	G078R	AGG	L144P	CCT	R210T	ACT	V277E	GAG	Q343R	AGG
V012W	TGG	G078S	TCG	L144Q	CAG	R210V	GTG	V277G	GGG	Q343S	AGT
P013A	GCT	G078T	ACT	L144R	CGT	R210W	TGG	V277H	CAT	Q343T	ACT
P013E	GAG	G078V	GTG	L144S	TCT	R210Y	TAT	V277K	AAG	Q343V	GTG
P013F	TTT	G078Y	TAT	L144T	ACT	N211A	GCG	V277L	TTG	Q343W	TGG
P013G	GGG	I079A	GCT	L144V	GTT	N211C	TGT	V277M	ATG	Q343Y	TAT
P013H	CAT	I079D	GAT	L144W	TGG	N211F	TTT	V277N	AAT	V344E	GAG
P013I	ATT	I079F	TTT	L144Y	TAT	N211G	GGG	V277Q	CAG	V344F	TTT
P013L	CTT	I079G	GGG	S145A	GCT	N211H	CAT	V277R	AGG	V344G	GGG
P013M	ATG	I079H	CAT	S145C	TGT	N211I	ATT	V277S	TCT	V344H	CAT
P013Q	CAG	I079K	AAG	S145D	GAT	N211K	AAG	V277T	ACT	V344I	ATT
P013R	CGT	I079L	TTG	S145E	GAG	N211L	CTG	V277Y	TAT	V344L	CTG
P013S	TCG	I079N	AAT	S145F	TTT	N211M	ATG	L278A	GCT	V344M	ATG
P013T	ACT	I079P	CCG	S 45G	GGG	N211P	CCT	L278E	GAG	V344N	AAT
P013V	GTG	I079R	CGT	S145H	CAT	N211R	CGG	L278F	TTT	V344P	CCT
P013W	TGG	I079S	AGT	S145L	TTG	N211S	AGT	L278G	GGG	V344Q	CAG
P013Y	TAT	I079T	ACT	S145M	ATG	N211T	ACT	L278H	CAT	V344R	CGT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
F014A	GCG	I079V	GTT	S145N	AAT	N211V	GTT	L278I	ATT	V344S	TCG
F014D	GAT	I079W	TGG	S145P	CCT	N211W	TGG	L278K	AAG	V344T	ACT
F014E	GAG	I079Y	TAT	S145R	CGT	D212A	GCT	L278M	TTT	V344W	TGG
F014G	GGT	P080A	GCG	S145T	ACT	D212E	GAG	L278N	AAT	V344Y	TAT
F014H	CAT	P080D	GAT	S145V	GTT	D212G	GGG	L278P	CCG	L345A	GCT
F014I	ATT	P080E	GAG	S145W	TGG	D212H	CAT	L278R	CGT	L345C	TGT
F014K	AAG	P080F	TTT	L146A	GCT	D212I	ATT	L278S	TCT	L345D	GAT
F014M	ATG	P080G	GGG	L146C	TGT	D212K	AAG	L278T	ACT	L345E	GAG
F014N	AAT	P080I	ATT	L146E	GAG	D212L	CTG	L278V	GTT	L345G	GGG
F014P	CCT	P080K	AAG	L146G	GGG	D212M	ATG	L278Y	TAT	L345H	CAT
F014Q	CAG	P080L	CTT	L146H	CAT	D212N	AAT	K279A	GCG	L345K	AAG
F014R	CGG	P080M	ATG	L146I	ATT	D212P	CCT	K279C	TGT	L345N	AAT
F014T	ACT	P080N	AAT	L146K	AAG	D212Q	CAG	K279D	GAT	L345P	CCT
F014V	GTG	P080R	AGG	L146N	AAT	D212S	TCG	K279F	TTT	L345Q	CAG
F014W	TGG	P080S	TCT	L146P	CCT	D212T	ACT	K279G	GGG	L345R	CGT
L015A	GCG	P080T	ACG	L146Q	CAG	D212V	GTG	K279H	CAT	L345T	ACT
L015E	GAG	P080V	GTG	L146R	CGG	D212W	TGG	K279L	CTG	L345V	GTT
L015F	TTT	P080Y	TAT	L146S	TCG	D213A	GCT	K279P	CCT	L345W	TGG
L015G	GGG	Q081A	GCT	L146T	ACT	D213E	GAG	K279Q	CAG	L345Y	TAT
L015K	AAG	Q081C	TGT	L146V	GTT	D213G	GGG	K279R	AGG	C346A	GCT
L015M	ATG	Q081E	GAG	L146Y	TAT	D213H	CAT	K279S	TCT	C346D	GAT
L015N	AAT	Q081F	TTT	T147A	GCT	D213K	AAG	K279T	ACG	C346F	TTT
L015P	CCG	Q081G	GGG	T147C	TGT	D213L	CTG	K279V	GTG	C346G	GGG
L015Q	CAG	Q081H	CAT	T147D	GAT	D213M	ATG	K279W	TGG	C346I	ATT
L015R	CGG	Q081L	CTG	T147F	TTT	D213N	AAT	K279Y	TAT	C346K	AAG
L015S	TCG	Q081M	ATG	T147G	GGT	D213P	CCT	F280D	GAT	C346L	CTT
L015T	ACT	Q081N	AAT	T147I	ATT	D213Q	CAG	F280E	GAG	C346M	ATG
L015V	GTT	Q081P	CCG	T147L	CTT	D213R	CGT	F280G	GGG	C346P	CCT
L015W	TGG	Q081R	AGG	T147M	ATG	D213S	TCG	F280H	CAT	C346Q	CAG
L015Y	TAT	Q081S	TCT	T147P	CCT	D213V	GTG	F280I	ATT	C346R	CGG
W016A	GCG	Q081V	GTT	T147Q	CAG	D213W	TGG	F280L	TTG	C346S	TCT
W016C	TGT	Q081W	TGG	T147R	CGT	D213Y	TAT	F280M	ATG	C346T	ACT
W016D	GAT	Q081Y	TAT	T147S	AGT	L214A	GCG	F280N	AAT	C346V	GTG
W016E	GAG	K082A	GCT	T147V	GTT	L214C	TGT	F280P	CCT	C346W	TGG
W016F	TTT	K082E	GAG	T147W	TGG	L214D	GAT	F280Q	CAG	Q347A	GCT
W016G	GGT	K082G	GGT	T147Y	TAT	L214E	GAG	F280R	CGT	Q347C	TGT
W016H	CAT	K082H	CAT	E148C	TGT	L214G	GGG	F280S	TCG	Q347E	GAG

Tabla 8: Variantes de PH20											
mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
W016K	AAG	K082I	ATT	E148F	TTT	L214H	CAT	F280T	ACT	Q347F	TTT
W016L	CTT	K082L	CTT	E148G	GGG	L214K	AAG	F280V	GTG	Q347G	GGT
W016M	ATG	K082M	ATG	E148H	CAT	L214N	AAT	F280W	TGG	Q347I	ATT
W016P	CCT	K082N	AAT	E148I	ATT	L214P	CCG	L281A	GCG	Q347L	TTG
W016R	CGT	K082P	CCT	E148K	AAG	L214Q	CAG	L281D	GAT	Q347M	ATG
W016S	TCG	K082Q	CAG	E148L	CTG	L214R	CGG	L281F	TTT	Q347P	CCT
W016T	ACT	K082R	CGT	E148P	CCT	L214S	TCG	L281G	GGT	Q347R	AGG
W016Y	TAT	K082S	AGT	E148Q	CAG	L214T	ACG	L281H	CAT	Q347S	TCT
A017D	GAT	K082T	ACT	E148R	CGG	L214V	GTG	L281I	ATT	Q347T	ACT
A017E	GAG	K082V	GTG	E148S	TCT	L214Y	TAT	L281K	AAG	Q347V	GTG
A017G	GGG	K082W	TGG	E148T	ACT	S215A	GCT	L281N	AAT	Q347W	TGG
A017H	CAT	K082Y	TAT	E148V	GTG	S215C	TGT	L281P	CCG	Q347Y	TAT
A017I	ATT	I083E	GAG	E148W	TGG	S215D	GAT	L281Q	CAG	E348C	TGT
A017L	CTT	I083F	TTT	E148Y	TAT	S215E	GAG	L281R	CGG	E348D	GAT
A017N	AAT	I083G	GGT	A149C	TGT	S215G	GGG	L281S	AGT	E348G	GGT
A017P	CCG	I083H	CAT	A149E	GAG	S215H	CAT	L281V	GTT	E348H	CAT
A017Q	CAG	I083K	AAG	A149F	TTT	S215K	AAG	L281W	TGG	E348I	ATT
A017R	AGG	I083L	CTG	A149G	GGT	S215L	TTG	L281Y	TAT	E348L	TTG
A017S	TCG	I083N	AAT	A149K	AAG	S215M	ATG	S282A	GCG	E348M	ATG
A017T	ACG	I083P	CCT	A149L	TTG	S215P	CCG	S282C	TGT	E348P	CCT
A017V	GTG	I083Q	CAA	A149M	ATG	S215Q	CAG	S282D	GAT	E348Q	CAG
A017W	TGG	I083R	CGT	A149P	CCT	S215R	CGG	S282E	GAG	E348R	CGG
A017Y	TAT	I083S	TCG	A149Q	CAG	S215T	ACT	S282F	TTT	E348S	TCT
W018C	TGT	I083T	ACT	A149R	CGG	S215V	GTG	S282G	GGT	E348T	ACT
W018D	GAT	I083V	GTT	A149S	TCT	S215W	TGG	S282L	CTT	E348V	GTT
W018F	TTT	I083Y	TAT	A149T	ACT	W216D	GAT	S282M	ATG	E348W	TGG
W018G	GGG	S084D	GAT	A149V	GTT	W216E	GAG	S282P	CCT	E348Y	TAT
W018H	CAT	S084E	GAG	A149W	TGG	W216G	GGT	S282Q	CAG	Q349A	GCT
W018I	ATT	S084F	TTT	A149Y	TAT	W216H	CAT	S282R	CGT	Q349D	GAT
W018L	CTG	S084G	GGT	T150A	GCT	W216I	ATT	S282T	ACT	Q349E	GAG
W018M	ATG	S084H	CAT	T150C	TGT	W216K	AAG	S282V	GTT	Q349F	TTT
W018P	CCG	S084I	ATT	T150D	GAT	W216L	CTG	S282W	TGG	Q349G	GGT
W018Q	CAG	S084L	CTT	T150E	GAG	W216M	ATG	S282Y	TAT	Q349H	CAT
W018R	CGG	S084M	ATG	T150F	TTT	W216N	AAT	Q283A	GCG	Q349K	AAG
W018S	AGT	S084N	AAT	T150G	GGG	W216P	CCT	Q283C	TGT	Q349L	CTG
W018T	ACG	S084P	CCT	T150I	ATT	W216Q	CAG	Q283D	GAT	Q349M	ATG
W018V	GTG	S084Q	CAG	T150L	TTG	W216R	CGG	Q283E	GAG	Q349N	AAT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
W018Y	TAT	S084R	CGG	T150N	AAT	W216T	ACG	Q283F	TTT	Q349P	CCT
N019A	GCG	S084T	ACT	T150P	CCT	W216V	GTG	Q283G	GGG	Q349R	CGT
N019C	TGT	S084W	TGG	T150R	AGG	W216Y	TAT	Q283H	CAT	Q349S	TCG
N019F	TTT	S084Y	TAT	T150S	TCT	L217A	GCG	Q283L	CTT	Q349T	ACT
N019G	GGG	L085A	GCT	T150V	GTG	L217C	TGT	Q283N	AAT	Q349V	GTG
N019H	CAT	L085C	TGT	T150W	TGG	L217E	GAG	Q283P	CCG	Q349W	TGG
N019I	ATT	L085D	GAT	T150Y	TAT	L217G	GGT	Q283R	CGT	Q349Y	TAT
N019L	CTG	L085E	GAG	E151A	GCT	L217H	CAT	Q283S	TCT	G350A	GCT
N019M	ATG	L085F	TTT	E151C	TGT	L217I	ATT	Q283T	ACT	G350D	GAT
N019P	CCG	L085G	GGG	E151G	GGT	L217M	ATG	Q283W	TGG	G350E	GAG
N019Q	CAG	L085H	CAT	E151H	CAT	L217P	CCG	Q283Y	TAT	G350F	TTT
N019R	CGT	L085K	AAG	E151K	AAG	L217Q	CAG	D284A	GCT	G350H	CAT
N019S	TCG	L085N	AAT	E151L	TTG	L217R	AGG	D284C	TGT	G350K	AAG
N019V	GTT	L085P	CCT	E151M	ATG	L217S	TCT	D284E	GAG	G350L	CTG
N019W	TGG	L085Q	CAG	E151N	AAT	L217T	ACG	D284G	GGT	G350M	ATG
N019Y	TAT	L085R	CGT	E151Q	CAG	L217V	GTG	D284H	CAT	G350N	AAT
A020D	GAT	L085S	TCG	E151R	AGG	L217W	TGG	D284I	ATT	G350P	CCT
A020E	GAG	L085T	ACT	E151S	TCG	L217Y	TAT	D284L	TTG	G350R	CGT
A020F	TTT	L085V	GTT	E151T	ACT	W218A	GCT	D284M	ATG	G350S	TCT
A020G	GGG	Q086A	GCT	E151V	GTT	W218D	GAT	D284N	AAT	G350T	ACT
A020H	CAT	Q086C	TGT	E151W	TGG	W218F	TTT	D284P	CCG	G350V	GTG
A020K	AAG	Q086D	GAT	E151Y	TAT	W218G	GGT	D284Q	CAG	G350Y	TAT
A020L	CTG	Q086 _E	GAG	K152A	GCT	W218H	CAT	D284S	TCT	V351A	GCT
A020N	AAT	Q086F	TTT	K152C	TGT	W218I	ATT	D284T	ACG	V351C	TGT
A020P	CCG	Q086G	GGT	K152F	TTT	W218K	AAG	D284V	GTT	V351D	GAT
A020Q	CAG	Q086H	CAT	K152G	GGT	W218L	CTT	D284Y	TAT	V351E	GAG
A020R	CGT	Q086I	ATT	K152I	ATT	W218M	ATG	E285A	GCG	V351F	TTT
A020S	TCT	Q086K	AAG	K152L	TTG	W218P	CCT	E285F	TTT	V351G	GGT
A020T	ACT	Q086L	CTG	K152M	ATG	W218Q	CAG	E285G	GGG	V351H	CAT
A020V	GTT	Q086M	ATG	K152N	AAT	W218R	CGG	E285H	CAT	V351I	ATT
A020Y	TAT	Q086N	AAT	K152P	CCT	W218S	TCG	E285K	AAG	V351L	TTG
P021A	GCG	Q086P	CCT	K152R	AGG	W218T	ACT	E285M	ATG	V351N	AAT
P021C	TGT	Q086R	CGG	K152S	TCT	W218V	GTG	E285N	AAT	V351Q	CAG
P021D	GAT	Q086S	TCT	K152T	ACT	N219A	GCG	E285P	CCT	V351R	AGG
P021E	GAG	Q086T	ACT	K152V	GTG	N219C	TGT	E285Q	CAG	V351S	TCT
P021G	GGG	Q086V	GTG	K152W	TGG	N219D	GAT	E285R	CGT	V351W	TGG
P021H	CAT	Q086W	TGG	K152Y	TAT	N219E	GAG	E285S	AGT	V351Y	TAT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
P021I	ATT	D087A	GCT	A153C	TGT	N219G	GGG	E285T	ACG	C352A	GCT
P021K	AAG	D087C	TGT	A153E	GAG	N219H	CAT	E285V	GTG	C352D	GAT
P021L	CTT	D087E	GAG	A153F	TTT	N219I	ATT	E285W	TGG	C352E	GAG
P021M	ATG	D087G	GGG	A153G	GGT	N219K	AAG	E285Y	TAT	C352F	TTT
P021R	CGT	D087H	CAT	A153H	CAT	N219L	CTT	L286A	GCG	C352G	GGG
P021S	TCT	D087I	ATT	A153I	ATT	N219M	ATG	L286C	TGT	C352K	AAG
P021T	ACG	D087L	CTG	A153K	AAG	N219P	CCT	L286D	GAT	C352M	ATG
P021V	GTT	D087M	ATG	A153L	CTG	N219R	CGT	L286E	GAG	C352P	CCT
P021W	TGG	D087P	CCT	A153M	ATG	N219S	TCG	L286F	TTT	C352Q	CAG
S022A	GCT	D087Q	CAG	A153P	CCT	N219T	ACT	L286G	GGT	C352R	CGT
S022C	TGT	D087R	AGG	A153Q	CAG	N219W	TGG	L286H	CAT	C352S	AGT
S022D	GAT	D087S	TCG	A153R	CGT	E220A	GCG	L286K	AAG	C352T	ACT
S022E	GAG	D087T	ACT	A153S	AGT	E220D	GAT	L286M	ATG	C352V	GTG
S022G	GGG	D087V	GTT	A153T	ACT	E220G	GGG	L286P	CCT	C352W	TGG
S022H	CAT	D087Y	TAT	A153V	GTG	E220H	CAT	L286R	AGG	C352Y	TAT
S022K	AAG	H088A	GCT	A153W	TGG	E220I	ATT	L286S	AGT	I353A	GCT
S022L	CTG	H088C	TGT	K154A	GCT	E220K	AAG	L286T	ACG	I353C	TGT
S022M	ATG	H088E	GAG	K154C	TGT	E220L	TTG	L286W	TGG	I353E	GAG
S022N	AAT	H088F	TTT	K154D	GAT	E220M	ATG	L286Y	TAT	I353F	TTT
S022P	CCG	H088G	GGG	K154E	GAG	E220N	AAT	V287A	GCT	I353G	GGG
S022R	CGG	H088I	ATT	K154G	GGT	E220P	CCG	V287C	TGT	I353H	CAT
S022T	ACT	H088K	AAG	K154H	CAT	E220R	CGG	V287D	GAT	I353K	AAG
S022V	GTG	H088L	TTG	K154I	ATT	E220S	TCT	V287E	GAG	I353L	CTT
S022Y	TAT	H088M	ATG	K154L	CTG	E220T	ACG	V287F	TTT	I353M	ATG
E023A	GCT	H088P	CCT	K154P	CCT	E220V	GTG	V287G	GGG	I353Q	CAG
E023D	GAT	H088R	CGT	K154R	CGG	E220W	TGG	V287I	ATT	I353R	CGT
E023F	TTT	H088S	AGT	K154S	AGT	S221A	GCG	V287K	AAG	I353S	TCG
E023G	GGG	H088T	ACT	K154T	ACT	S221C	TGT	V287L	CTT	I353T	ACT
E023H	CAT	H088V	GTT	K154V	GTG	S221D	GAT	V287N	AAT	I353V	GTG
E023L	CTT	H088Y	TAT	K154W	TGG	S221E	GAG	V287P	CCT	I353W	TGG
E023M	ATG	L089A	GCT	K154Y	TAT	S221G	GGG	V287Q	CAG	R354C	TGT
E023N	AAT	L089C	TGT	Q155A	GCT	S221H	CAT	V287R	CGG	R354D	GAT
E023P	CCT	L089D	GAT	Q155C	TGT	S221I	ATT	V287S	TCT	R354E	GAG
E023Q	CAG	L089E	GAG	Q155D	GAT	S221K	AAG	V287T	ACT	R354G	GGT
E023R	CGG	L089G	GGG	Q155F	TTT	S221L	TTG	Y288D	GAC	R354H	CAT
E023S	TCT	L089K	AAG	Q155G	GGG	S221M	ATG	Y288E	GAG	R354I	ATT
E023T	ACG	L089M	ATG	Q155H	CAT	S221P	CCG	Y288F	TTT	R354K	AAG

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
E023V	GTG	L089N	AAT	Q155K	AAG	S221Q	CAG	Y288G	GGG	R354L	CTT
E023W	TGG	L089P	CCT	Q155L	CTT	S221R	CGG	Y288H	CAT	R354M	ATG
F024A	GCG	L089Q	CAG	Q155M	ATG	S221T	ACT	Y288I	ATT	R354P	CCT
F024C	TGT	L089R	AGG	Q155P	CCT	S221V	GTG	Y288K	AAG	R354Q	CAG
F024E	GAG	L089S	TCG	Q155R	CGG	T222A	GCG	Y288L	CTG	R354S	TCT
F024G	GGG	L089T	ACT	Q155S	AGT	T222D	GAT	Y288P	CCT	R354V	GTG
F024H	CAT	L089W	TGG	Q155T	ACT	T222E	GAG	Y288Q	CAG	R354W	TGG
F024I	ATT	L089Y	TAT	Q155V	GTT	T222F	TTT	Y288R	CGT	R354Y	TAT
F024K	AAG	D090A	GCT	Q155W	TGG	T222G	GGG	Y288S	TCT	K355D	GAT
F024L	TTG	D090C	TGT	Q155Y	TAT	T222I	ATT	Y288T	ACT	K355F	TTT
F024M	ATG	D090E	GAG	E156A	GCT	T222K	AAA	Y288V	GTG	K355G	GGG
F024N	AAT	D090G	GGG	E156C	TGT	T222L	TTG	Y288W	TGG	K355H	CAT
F024P	CCT	D090H	CAT	E156D	GAT	T222N	AAT	T289A	GCT	K355L	CTG
F024R	CGT	D090I	ATT	E156G	GGT	T222P	CCG	T289C	TGT	K355M	ATG
F024T	ACG	D090K	AAG	E156I	ATT	T222R	CGG	T289E	GAG	K355N	AAT
F024V	GTT	D090L	CTT	E156K	AAG	T222S	AGT	T289G	GGT	K355P	CCT
F024Y	TAT	D090N	AAT	E156L	CTG	T222V	GTT	T289H	CAT	K355Q	CAG
C025D	GAT	D090P	CCT	E156M	ATG	T222W	TGG	T289K	AAG	K355R	CGT
C025E	GAG	D090Q	CAG	E156P	CCT	T222Y	TAT	T289L	CTT	K355S	TCT
C025F	TTT	D090R	AGG	E156Q	CAG	A223C	TGT	T289M	ATG	K355T	ACT
C025G	GGG	D090S	AGT	E156R	CGG	A223D	GAT	T289N	AAT	K355V	GTG
C025H	CAT	D090T	ACT	E156S	TCT	A223E	GAG	T289P	CCT	K355W	TGG
C025I	ATT	D090W	TGG	E156T	ACT	A223G	GGG	T289Q	CAG	K355Y	TAT
C025K	AAG	K091A	GCT	E156V	GTT	A223H	CAT	T289R	AGG	N356A	GCT
C025L	TTG	K091D	GAT	E156W	TGG	A223K	AAG	T289S	TCG	N356C	TGT
C025N	AAT	K091E	GAG	F157A	GCT	A223L	CTG	T289V	GTG	N356D	GAT
C025P	CCT	K091F	TTT	F157C	TGT	A223P	CCT	T289Y	TAT	N356F	TTT
C025R	CGT	K091G	GGG	F157D	GAT	A223Q	CAG	F290A	GCT	N356G	GGG
C025S	TCT	K091H	CAT	F157E	GAG	A223R	AGG	F290C	TGT	N356H	CAT
C025T	ACT	K091I	ATT	F157G	GGT	A223S	TCT	F290D	GAT	N356K	AAG
C025V	GTG	K091L	TTG	F157H	CAT	A223T	ACG	F290G	GGG	N356L	CTG
C025Y	TAT	K091N	AAT	F157I	ATT	A223V	GTG	F290H	CAT	N356P	CCT
L026A	GCT	K091Q	CAG	F157K	AAG	A223W	TGG	F290I	ATT	N356Q	CAG
L026E	GAG	K091R	CGT	F157L	TTG	A223Y	TAT	F290K	AAG	N356R	CGG
L026G	GGT	K091S	TCT	F157M	ATG	L224A	GCT	F290L	TTG	N356S	AGT
L026H	CAT	K091T	ACT	F157P	CCT	L224D	GAT	F290M	ATG	N356T	ACT
L026I	ATT	K091Y	TAT	F157Q	CAG	L224E	GAG	F290Q	CAG	N356V	GTG

Tabla 8: Variantes de PH20											
mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
L026K	AAG	A092C	TGT	F157R	CGG	L224F	TTT	F290R	AGG	N356W	TGG
L026M	ATG	A092E	GAG	F157S	TCG	L224G	GGG	F290S	TCG	W357A	GCT
L026P	CCG	A092F	TTT	F157T	ACT	L224I	ATT	F290T	ACT	W357C	TGT
L026Q	CAG	A092G	GGT	F157V	GTG	L224M	ATG	F290V	GTT	W357D	GAT
L026R	CGG	A092H	CAT	F157W	TGG	L224P	CCG	F290Y	TAT	W357E	GAG
L026S	TCT	A092K	AAG	E158A	GCT	L224Q	CAG	G291A	GCT	W357F	TTT
L026T	ACT	A092L	CTG	E158C	TGT	L224R	AGG	G291C	TGT	W357G	GGG
L026V	GTT	A092M	ATG	E158D	GAT	L224S	AGT	G291D	GAT	W357K	AAG
L026W	TGG	A092P	CCT	E158F	TTT	L224T	ACT	G291E	GAG	W357L	TTG
L026Y	TAT	A092Q	CAG	E158G	GGG	L224V	GTT	G291F	TTT	W357M	ATG
G027A	GCT	A092R	CGT	E158H	CAT	L224W	TGG	G291H	CAT	W357P	CCT
G027C	TGT	A092T	ACT	E158K	AAG	L224Y	TAT	G291L	CTG	W357Q	CAG
G027D	GAT	A092V	GTT	E158L	CTG	Y225A	GCG	G291M	ATG	W357R	CGT
G027E	GAG	A092W	TGG	E158N	AAT	Y225D	GAT	G291N	AAT	W357S	AGT
G027F	TTT	A092Y	TAT	E158P	CCT	Y225E	GAG	G291P	CCT	W357T	ACT
G027H	CAT	K093D	GAT	E158Q	CAG	Y225G	GGT	G291Q	CAG	W357V	GTG
G027I	ATT	K093E	GAG	E158R	CGG	Y225H	CAT	G291R	CGG	N358C	TGT
G027K	AAG	K093F	TTT	E158S	TCG	Y225K	AAG	G291S	TCT	N358D	GAT
G027L	CTG	K093G	GGT	E158V	GTG	Y225L	CTG	G291T	ACT	N358E	GAG
G027P	CCT	K093H	CAT	E158Y	TAT	Y225P	CCG	G291V	GTG	N358G	GGG
G027Q	CAG	K093I	ATT	K159A	GCT	Y225Q	CAG	G291W	TGG	N358H	CAT
G027R	CGG	K093L	CTG	K159D	GAT	Y225R	AGG	G291Y	TAT	N358I	ATT
G027S	TCG	K093M	ATG	K159E	GAG	Y225S	TCT	E292A	GCT	N358K	AAG
G027T	ACT	K093N	AAT	K159F	TTT	Y225T	ACG	E292C	TGT	N358L	CTG
G027W	TGG	K093P	CCT	K159G	GGT	Y225V	GTG	E292F	TTT	N358P	CCT
K028A	GCG	K093Q	CAG	K159H	CAT	Y225W	TGG	E292G	GGT	N358Q	CAG
K028D	GAT	K093R	CGG	K159L	CTT	P226A	GCG	E292H	CAT	N358R	CGT
K028E	GAG	K093S	AGT	K159M	ATG	P226C	TGT	E292I	ATT	N358S	TCT
K028F	TTT	K093T	ACT	K159N	AAT	P226D	GAT	E292K	AAG	N358T	ACT
K028G	GGG	K093V	GTT	K159Q	CAG	P226E	GAG	E292L	TTG	N358V	GTG
K028I	ATT	K094A	GCT	K159R	CGG	P226F	TTT	E292N	AAT	N358W	TGG
K028L	TTG	K094C	TGT	K159S	TCT	P226G	GGT	E292P	CCT	S359A	GCT
K028M	ATG	K094D	GAT	K159V	GTG	P226L	CTT	E292Q	CAG	S359C	TGT
K028N	AAT	K094E	GAG	K159W	TGG	P226N	AAT	E292R	CGG	S359D	GAT
K028P	CCT	K094F	TTT	K159Y	TAT	P226Q	CAG	E292T	ACT	S359E	GAG
K028R	CGG	K094G	GGG	A160C	TGT	P226R	AGG	E292V	GTT	S359F	TTT
K028S	AGT	K094H	CAT	A160F	TTT	P226S	TCT	E292W	TGG	S359G	GGG

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
K028T	ACT	K094L	TTG	A160G	GGG	P226T	ACG	T293A	GCT	S359H	CAT
K028V	GTT	K094M	ATG	A160H	CAT	P226V	GTT	T293C	TGT	S359K	AAG
K028W	TGG	K094N	AAT	A160I	ATT	P226W	TGG	T293D	GAT	S359L	TTG
F029A	GCT	K094P	CCT	A160K	AAG	P226Y	TAT	T293E	GAG	S359M	ATG
F029C	TGT	K094Q	CAG	A160L	CTG	S227A	GCT	T293F	TTT	S359P	CCT
F029E	GAG	K094R	AGG	A160M	ATG	S227F	TTT	T293G	GGT	S359R	CGG
F029G	GGG	K094S	TCT	A160N	AAT	S227G	GGG	T293K	AAG	S359T	ACT
F029H	CAT	K094T	ACT	A160Q	CAG	S227H	CAT	T293L	CTT	S359V	GTT
F029I	ATT	D095A	GCT	A160R	AGG	S227I	ATT	T293M	ATG	S359W	TGG
F029K	AAG	D095C	TGT	A160S	AGT	S227K	AAG	T293N	AAT	S360A	GCT
F029L	CTT	D095E	GAG	A160V	GTG	S227L	TTG	T293P	CCT	S360C	TGT
F029M	ATG	D095F	TTT	A160W	TGG	S227M	ATG	T293Q	CAG	S360E	GAG
F029P	CCG	D095G	GGG	A160Y	TAT	S227P	CCT	T293S	TCT	S360F	TTT
F029R	CGG	D095H	CAT	G161A	GCT	S227Q	CAG	T293V	GTG	S360G	GGG
F029S	TCG	D095K	AAG	G161C	TGT	S227R	CGG	T293Y	TAT	S360I	ATT
F029T	ACG	D095L	TTG	G161D	GAT	S227T	ACG	V294A	GCT	S360K	AAG
F029V	GTG	D095M	ATG	G161E	GAG	S227V	GTG	V294C	TGT	S360L	CTG
F029W	TGG	D095P	CCT	G161H	CAT	S227W	TGG	V294E	GAG	S360M	ATG
D030A	GCG	D095Q	CAG	G161I	ATT	S227Y	TAT	V294G	GGG	S360N	AAT
D030E	GAG	D095S	TCT	G161K	AAG	I228A	GCG	V294H	CAT	S360P	CCT
D030F	TTT	D095V	GTG	G161L	CTT	I228E	GAG	V294K	AAG	S360Q	CAG
D030G	GGG	D095W	TGG	G161M	ATG	I228F	TTT	V294L	TTG	S360R	AGG
D030H	CAT	D095Y	TAT	G161Q	CAG	I228G	GGG	V294M	ATG	S360T	ACT
D030K	AAG	I096A	GCT	G161R	CGT	I228H	CAT	V294N	AAT	S360V	GTT
D030L	TTG	I096C	TGT	G161S	AGT	I228K	AAG	V294P	CCT	D361A	GCT
D030M	ATG	I096D	GAT	G161T	ACT	I228L	TTG	V294Q	CAG	D361C	TGT
D030P	CCT	I096E	GAG	G161V	GTG	I228M	ATG	V294R	AGG	D361E	GAG
D030Q	CAG	I096F	TTT	G161W	TGG	I228N	AAT	V294S	AGT	D361G	GGG
D030R	CGG	I096G	GGG	K162A	GCT	I228P	CCG	V294T	ACT	D361H	CAT
D030S	TCG	I096H	CAT	K162D	GAT	I228Q	CAG	V294W	TGG	D361L	TTG
D030T	ACT	I096L	TTG	K162E	GAG	I228R	CGT	A295C	TGT	D361M	ATG
D030V	GTT	I096N	AAT	K162F	TTT	I228S	TCT	A295D	GAT	D361N	AAT
D030W	TGG	I096P	CCT	K162G	GGG	I228T	ACT	A295E	GAG	D361P	CCT
E031A	GCG	I096R	CGT	K162H	CAT	I228W	TGG	A295F	TTT	D361Q	CAG
E031C	TGT	I096S	AGT	K162L	TTG	Y229E	GAG	A295G	GGG	D361R	AGG
E031G	GGG	I096T	ACT	K162M	ATG	Y229F	TTT	A295H	CAT	D361S	TCG
E031H	CAT	I096V	GTG	K162P	CCT	Y229G	GGT	A295I	ATT	D361V	GTT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
E031I	ATT	I096W	TGG	K162Q	CAG	Y229H	CAT	A295L	CTG	D361W	TGG
E031K	AAG	T097A	GCT	K162R	CGG	Y229I	ATT	A295N	AAT	D361Y	TAT
E031L	CTG	T097C	TGT	K162S	TCG	Y229K	AAG	A295P	CCT	Y362A	GCT
E031N	AAC	T097D	GAT	K162V	GTG	Y229L	TTG	A295Q	CAG	Y362C	TGT
E031P	CCG	T097E	GAG	K162W	TGG	Y229N	AAT	A295S	AGT	Y362E	GAG
E031R	CGG	T097F	TTT	K162Y	TAT	Y229P	CCT	A295T	ACT	Y362G	GGG
E031S	TCT	T097G	GGG	D163A	GCT	Y229Q	CAG	A295V	GTT	Y362H	CAT
E031T	ACG	T097I	ATT	D163C	TGT	Y229R	CGT	A295Y	TAT	Y362K	AAG
E031V	GTG	T097L	CTT	D163E	GAG	Y229S	TCG	L296A	GCT	Y362L	CTT
E031W	TGG	T097N	AAT	D163F	TTT	Y229T	ACT	L296C	TGT	Y362M	ATG
E031Y	TAT	T097P	CCT	D163G	GGG	Y229V	GTG	L296F	TTT	Y362N	AAT
P032A	GCG	T097Q	CAG	D163H	CAC	Y229W	TGG	L296G	GGT	Y362P	CCT
P032C	TGT	T097R	CGG	D163K	AAG	L230A	GCG	L296I	ATT	Y362R	CGG
P032F	TTT	T097S	TCG	D163L	CTT	L230E	GAG	L296K	AAG	Y362S	AGT
P032G	GGG	T097W	TGG	D163P	CCT	L230G	GGG	L296M	ATG	Y362T	ACT
P032H	CAT	T097Y	TAT	D163Q	CAG	L230H	CAT	L296P	CCT	Y362V	GTG
P032K	AAG	F098A	GCT	D163R	AGG	L230I	ATT	L296Q	CAG	Y362W	TGG
P032L	CTG	F098C	TGT	D163S	TCG	L230K	AAG	L296R	CGT	L363A	GCT
P032M	ATG	F098D	GAT	D163T	ACT	L230M	ATG	L296S	TCG	L363C	TGT
P032N	AAT	F098E	GAG	D163V	GTG	L230N	AAT	L296T	ACT	L363D	GAT
P032Q	CAG	F098G	GGG	D163W	TGG	L230P	CCT	L296V	GTT	L363E	GAG
P032R	CGG	F098H	CAT	F164A	GCT	L230R	CGT	L296W	TGG	L363F	TTT
P032S	TCG	F098I	ATT	F164C	TGT	L230S	AGT	L296Y	TAT	L363G	GGG
P032T	ACT	F098L	TTG	F164D	GAT	L230T	ACT	G297A	GCT	L363H	CAT
P032V	GTG	F098M	ATG	F164E	GAG	L230V	GTT	G297C	TGT	L363I	ATT
P032W	TGG	F098P	CCT	F164G	GGG	L230W	TGG	G297E	GAG	L363P	CCT
P032Y	TAT	F098Q	CAG	F164H	CAT	L230Y	TAT	G297H	CAT	L363Q	CAG
L033C	TGT	F098R	CGT	F164L	TTG	N231A	GCT	G297I	ATT	L363R	CGG
L033D	GAT	F098S	TCG	F164M	ATG	N231C	TGT	G297L	CTT	L363S	TCG
L033G	GGG	F098V	GTT	F164N	AAT	N231D	GAT	G297N	AAT	L363T	ACT
L033H	CAT	F098W	TGG	F164P	CCT	N231F	TTT	G297P	CCT	L363V	GTG
L033I	ATT	Y099A	GCT	F164Q	CAG	N231G	GGG	G297Q	CAG	L363W	TGG
L033M	ATG	Y099C	TGT	F164R	CGG	N231H	CAT	G297R	CGG	H364A	GCT
L033N	AAT	Y099E	GAG	F164S	AGT	N231I	ATT	G297S	AGT	H364C	TGT
L033P	CCG	Y099F	TTT	F164V	GTT	N231K	AAG	G297T	ACT	H364D	GAT
L033Q	CAG	Y099G	GGT	F164W	TGG	N231L	CTT	G297V	GTG	H364E	GAG
L033R	AGG	Y099I	ATT	L165A	GCT	N231P	CCT	G297W	TGG	H364F	TTT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
L033S	TCG	Y099L	TTG	L165C	TGT	N231Q	CAG	G297Y	TAT	H364G	GGG
L033T	ACT	Y099N	AAT	L165D	GAT	N231R	CGT	A298C	TGT	H364K	AAG
L033V	GTT	Y099P	CCT	L165F	TTT	N231S	TCT	A298E	GAG	H364L	CTG
L033W	TGG	Y099Q	CAG	L165G	GGG	N231T	ACG	A298G	GGG	H364M	ATG
L033Y	TAT	Y099R	AGG	L165H	CAT	N231V	GTG	A298I	ATT	H364P	CCT
D034A	GCT	Y099S	TCG	L165N	AAT	T232A	GCG	A298L	TTG	H364R	CGG
D034E	GAG	Y099T	ACT	L165P	CCT	T232C	TGT	A298M	ATG	H364S	TCT
D034G	GGT	Y099V	GTT	L165Q	CAG	T232F	TTT	A298N	AAT	H364T	ACT
D034H	CAT	Y099W	TGG	L165R	CGG	T232G	GGG	A298P	CCT	H364V	GTG
D034I	ATT	M100C	TGT	L165S	TCG	T232H	CAT	A298Q	CAG	H364Y	TAT
D034K	AAG	M100E	GAG	L165T	ACT	T232K	AAG	A298R	CGT	L365A	GCT
D034L	CTT	M100F	TTT	L165V	GTG	T232L	CTT	A298S	TCG	L365C	TGT
D034N	AAT	M100G	GGT	L165W	TGG	T232M	ATG	A298T	ACT	L365D	GAT
D034P	CCT	M100K	AAG	L165Y	TAT	T232N	AAT	A298V	GTG	L365E	GAG
D034Q	CAG	M100L	CTG	V166A	GCT	T232P	CCG	A298W	TGG	L365G	GGG
D034R	CGT	M100N	AAT	V166C	TGT	T232Q	CAG	A298Y	TAT	L365I	ATT
D034S	AGT	M100P	CCT	V166D	GAT	T232R	AGG	S299A	GCT	L365M	ATG
D034T	ACG	M100Q	CAG	V166E	GAG	T232S	AGT	S299C	TGT	L365N	AAT
D034V	GTT	M100R	CGG	V166F	TTT	T232V	GTG	S299D	GAT	L365P	CCT
D034W	TGG	M100S	TCT	V166G	GGT	T232Y	TAT	S299E	GAG	L365Q	CAG
M035A	GCG	M100T	ACT	V166H	CAT	Q233A	GCG	S299F	TTT	L365R	CGG
M035D	GAT	M100V	GTT	V166L	CTT	Q233C	TGT	S299G	GGG	L365S	AGT
M035F	TTT	M100W	TGG	V166N	AAT	Q233D	GAT	S299H	CAT	L365T	ACT
M035G	GGG	M100Y	TAT	V166P	CCT	Q233F	TTT	S299I	ATT	L365V	GTG
M035H	CAT	P101A	GCT	V166Q	CAG	Q233G	GGG	S299L	CTT	L365W	TGG
M035I	ATT	P101C	TGT	V166R	CGG	Q233I	ATT	S299M	ATG	L365Y	TAT
M035L	TTG	P101F	TTT	V166T	ACT	Q233K	AAG	S299P	CCT	N366A	GCT
M035N	AAT	P101G	GGG	V166W	TGG	Q233L	CTG	S299Q	CAG	N366C	TGT
M035P	CCG	P101H	CAT	V166Y	TAT	Q233P	CCG	S299R	AGG	N366E	GAG
M035Q	CAG	P101I	ATT	E167A	GCT	Q233R	AGG	S299T	ACT	N366F	TTT
M035R	CGT	P101K	AAG	E167D	GAT	Q233S	TCG	S299Y	TAT	N366G	GGG
M035S	TCT	P101L	CTT	E167F	TTT	Q233T	ACG	G300A	GCT	N366K	AAG
M035T	ACT	P101M	ATG	E167G	GGT	Q233V	GTG	G300C	TGT	N366L	TTG
M035V	GTT	P101N	AAT	E167H	CAT	Q233W	TGG	G300D	GAT	N366M	ATG
M035Y	TAT	P101Q	CAG	E167K	AAG	Q233Y	TAT	G300E	GAG	N366P	CCT
S036A	GCG	P101R	AGG	E167L	TTG	Q234A	GCT	G300F	TTT	N366Q	CAG
S036C	TGT	P101S	TCT	E167M	ATG	Q234C	TGT	G300L	CTT	N366R	AGG

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
S036D	GAT	P101T	ACT	E167N	AAT	Q234D	GAT	G300M	ATG	N366S	TCT
S036F	TTT	P101Y	TAT	E167P	CCT	Q234E	GAG	G300N	AAT	N366T	ACT
S036G	GGT	V102A	GCT	E167R	AGG	Q234G	GGT	G300P	CCT	N366V	GTT
S036H	CAT	V102C	TGT	E167S	TCG	Q234H	CAT	G300Q	CAG	N366W	TGG
S036K	AAG	V102E	GAG	E167T	ACT	Q234L	CTT	G300R	AGG	P367A	GCT
S036L	TTG	V102G	GGT	E167V	GTT	Q234M	ATG	G300S	TCG	P367C	TGT
S036N	AAT	V102H	CAT	E167Y	TAT	Q234N	AAT	G300T	ACT	P367E	GAG
S036P	CCG	V102K	AAG	T168A	GCT	Q234P	CCG	G300V	GTT	P367F	TTT
S036R	CGG	V102L	TTG	T168C	TGT	Q234R	CGG	G300W	TGG	P367G	GGT
S036T	ACG	V102M	ATG	T168D	GAT	Q234S	AGT	I301A	GCT	P367H	CAT
S036V	GTT	V102N	AAT	T168E	GAG	Q234T	ACT	I301E	GAG	P367I	ATT
S036W	TGG	V102P	CCT	T168F	TTT	Q234V	GTG	I301G	GGG	P367K	AAG
S036Y	TAT	V102Q	CAG	T168G	GGG	Q234W	TGG	I301H	CAT	P367L	CTG
L037A	GCG	V102R	AGG	T168H	CAT	S235A	GCG	I301K	AAG	P367M	ATG
L037C	TGT	V102S	TCT	T168K	AAG	S235E	GAG	I301L	CTG	P367Q	CAG
L037E	GAG	V102T	ACT	T168L	CTG	S235F	TTT	I301M	ATG	P367R	CGT
L037F	TTT	V102W	TGG	T168P	CCT	S235G	GGG	I301N	AAT	P367S	TCG
L037G	GGG	D103A	GCT	T168R	CGG	S235H	CAT	I301P	CCT	P367V	GTT
L037I	ATT	D103E	GAG	T168S	TCT	S235K	AAG	I301Q	CAG	P367W	TGG
L037K	AAG	D103F	TTT	T168V	GTG	S235L	CTT	I301R	CGG	D368A	GCT
L037M	ATG	D103G	GGG	T168W	TGG	S235M	ATG	I301S	AGT	D368C	TGT
L037N	AAT	D103H	CAT	T168Y	TAT	S235P	CCT	I301V	GTT	D368E	GAG
L037P	CCT	D103I	ATT	I169A	GCT	S235Q	CAG	I301W	TGG	D368G	GGT
L037R	AGG	D103L	CTT	I169D	GAT	S235R	CGG	I301Y	TAT	D368H	CAT
L037S	TCT	D103N	AAT	I169F	TTT	S235T	ACG	V302C	TGT	D368K	AAG
L037T	ACG	D103Q	CAG	I169G	GGG	S235V	GTG	V302D	GAT	D368L	CTT
L037V	GTG	D103R	AGG	I169H	CAT	S235W	TGG	V302E	GAG	D368M	ATG
L037W	TGG	D103S	TCG	I169K	AAG	S235Y	TAT	V302F	TTT	D368P	CCT
F038A	GCG	D103T	ACT	I169L	TTG	P236A	GCT	V302G	GGT	D368R	CGT
F038C	TGT	D103V	GTT	I169N	AAT	P236C	TGT	V302H	CAT	D368S	AGT
F038E	GAG	D103W	TGG	I169P	CCT	P236E	GAG	V302I	ATT	D368T	ACT
F038G	GGG	D103Y	TAT	I169Q	CAG	P236G	GGG	V302L	TTG	D368V	GTT
F038K	AAG	N104A	GCT	I169R	CGG	P236H	CAT	V302M	ATG	D368W	TGG
F038L	CTT	N104C	TGT	I169S	TCG	P236I	ATT	V302P	CCT	D368Y	TAT
F038M	ATG	N104F	TTT	I169T	ACT	P236K	AAG	V302R	AGG	N369A	GCT
F038N	AAT	N104G	GGG	I169V	GTT	P236L	CTG	V302S	TCG	N369C	TGT
F038P	CCT	N104H	CAT	I169Y	TAT	P236N	AAT	V302T	ACT	N369E	GAG

Tabla 8: Variantes de PH20											
mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
F038Q	CAG	N104I	ATT	K170A	GCT	P236Q	CAG	V302W	TGG	N369F	TTT
F038R	AGG	N104K	AAG	K170C	TGT	P236R	CGT	V302Y	TAT	N369H	CAT
F038S	TCT	N104L	CTG	K170D	GAT	P236S	AGT	I303A	GCT	N369I	ATT
F038T	ACT	N104M	ATG	K170E	GAG	P236T	ACT	I303C	TGT	N369K	AAG
F038W	TGG	N104P	CCT	K170G	GGG	P236W	TGG	I303D	GAT	N369L	CTT
F038Y	TAT	N104R	AGG	K170I	ATT	P236Y	TAT	I303E	GAG	N369P	CCT
S039A	GCG	N104S	TCT	K170L	TTG	V237A	GCG	I303F	TTT	N369Q	CAG
S039C	TGT	N104T	ACT	K170M	ATG	V237C	TGT	I303G	GGT	N369R	CGG
S039D	GAT	N104V	GTT	K170N	AAT	V237E	GAG	I303K	AAG	N369S	TCG
S039F	TTT	N104W	TGG	K170P	CCT	V237F	TTT	I303L	TTG	N369T	ACT
S039G	GGT	L105A	GCT	K170Q	CAG	V237G	GGT	I303M	ATG	N369V	GTG
S039L	TTG	L105C	TGT	K170R	CGT	V237H	CAT	I303P	CCT	N369W	TGG
S039M	ATG	L105D	GAT	K170V	GTT	V237L	TTG	I303R	CGT	F370A	GCT
S039N	AAT	L105E	GAG	K170W	TGG	V237N	AAT	I303S	AGT	F370D	GAT
S039P	CCG	L105G	GGT	K170Y	TAT	V237P	CCT	I303V	GTG	F370E	GAG
S039Q	CAG	L105H	CAT	L171A	GCT	V237Q	CAG	I303W	TGG	F370G	GGG
S039R	CGT	L105I	ATT	L171C	TGT	V237R	CGG	I303Y	TAT	F370H	CAT
S039T	ACT	L105M	ATG	L171D	GAT	V237S	TCG	W304A	GCT	F370I	ATT
S039V	GTT	L105N	AAT	L171G	GGG	V237T	ACG	W304C	TGT	F370K	AAG
S039W	TGG	L105P	CCT	L171H	CAT	V237W	TGG	W304D	GAT	F370L	CTG
S039Y	TAT	L105Q	CAG	L171I	ATT	V237Y	TAT	W304G	GGT	F370N	AAT
F040A	GCG	L105R	CGG	L171M	ATG	A238D	GAT	W304I	ATT	F370P	CCT
F040D	GAT	L105S	TCT	L171N	AAT	A238E	GAG	W304L	CTG	F370Q	CAG
F040E	GAG	L105T	ACT	L171P	CCT	A238F	TTT	W304M	ATG	F370R	AGG
F040G	GGT	L105V	GTT	L171Q	CAG	A238G	GGT	W304N	AAT	F370S	TCT
F040I	ATT	L105W	TGG	L171R	CGT	A238H	CAT	W304P	CCT	F370V	GTG
F040K	AAG	G106A	GCT	L171S	AGT	A238K	AAG	W304Q	CAG	F370Y	TAT
F040L	CTG	G106C	TGT	L171V	GTG	A238L	CTT	W304R	CGG	A371C	TGT
F040N	AAT	G106D	GAT	L171W	TGG	A238P	CCG	W304S	AGT	A371E	GAG
F040Q	CAG	G106E	GAG	L171Y	TAT	A238Q	CAG	W304T	ACT	A371F	TTT
F040R	CGG	G106F	TTT	G172A	GCT	A238R	AGG	W304V	GTG	A371G	GGG
F040S	TCT	G106H	CAT	G172C	TGT	A238S	AGT	W304Y	TAT	A371H	CAT
F040T	ACT	G106I	ATT	G172D	GAT	A238T	ACG	G305C	TGT	A371I	ATT
F040V	GTT	G106L	CTG	G172E	GAG	A238V	GTG	G305D	GAT	A371K	AAG
F040W	TGG	G106M	ATG	G172I	ATT	A238W	TGG	G305E	GAG	A371L	CTT
F040Y	TAT	G106N	AAT	G172L	CTT	A238Y	TAT	G305F	TTT	A371M	ATG
I041A	GCG	G106P	CCT	G172M	ATG	A239C	TGT	G305H	CAT	A371P	CCT

Tabla 8: Variantes de PH20											
mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
I041C	TGT	G106S	AGT	G172P	CCT	A239F	TTT	G305K	AAG	A371R	CGT
I041D	GAT	G106V	GTG	G172Q	CAG	A239G	GGT	G305L	CTT	A371S	TCG
I041E	GAG	G106W	TGG	G172R	CGT	A239H	CAT	G305N	AAT	A371T	ACT
I041F	TTT	G106Y	TAT	G172S	TCT	A239I	ATT	G305P	CCT	A371V	GTG
I041G	GGG	M107A	GCT	G172T	ACT	A239K	AAG	G305Q	CAG	A371W	TGG
I041H	CAT	M107C	TGT	G172V	GTT	T240K	AAG	G305R	CGT	I372A	GCT
I041N	AAT	M107D	GAT	G172W	TGG	A239L	TTG	G305S	TCG	I372D	GAT
I041D	CCG	M107F	TTT	G172Y	TAT	A239N	AAT	G305T	ACT	I372E	GAG
I041Q	CAG	M107G	GGG	K173D	GAT	A239P	CCT	G305V	GTG	I372F	TTT
I041R	AGG	M107H	CAT	K173E	GAG	A239R	AGG	G305Y	TAT	I372G	GGT
I041S	TCT	M107I	ATT	K173G	GGG	A239S	TCT	T306A	GCT	I372H	CAT
I041D	ACG	M107K	AAG	K173H	CAT	A239T	ACT	T306C	TGT	I372K	AAG
I041V	GTT	M107L	CTT	K173I	ATT	A239V	GTT	T306D	GAT	I372L	CTG
I041W	TGG	M107P	CCT	K173L	CTT	A239W	TGG	T306E	GAG	I372N	AAT
G042A	GCT	M107Q	CAG	K173M	ATG	A239Y	TAT	T306F	TTT	I372P	CCT
G042C	TGT	M107R	CGT	K173N	AAT	T240A	GCG	T306G	GGT	I372R	CGG
G042D	GAT	M107S	TCT	K173P	CCT	T240E	GAG	T306H	CAT	I372S	TCT
G042E	GAG	M107V	GTT	K173Q	CAG	T240F	TTT	T306I	ATT	I372T	ACT
G042H	CAT	M107W	TGG	K173R	CGG	T240G	GGG	T306L	CTG	I372V	GTG
G042I	ATT	A108D	GAT	K173S	TCG	T240L	CTT	T306P	CCT	I372W	TGG
G042K	AAG	A108E	GAG	K173V	GTG	T240M	ATG	T306R	AGG	Q373A	GCT
G042L	CTG	A108F	TTT	K173W	TGG	T240N	AAT	T306S	AGT	Q373C	TGT
G042M	ATG	A108G	GGT	K173Y	TAT	T240P	CCT	T306V	GTG	Q373E	GAG
G042P	CCT	A108H	CAT	L174A	GCT	T240Q	CAG	T306W	TGG	Q373F	TTT
G042Q	CAG	A108K	AAG	L174C	TGT	T240R	CGT	T306Y	TAT	Q373G	GGT
G042R	CGG	A108L	TTG	L174G	GGG	T240S	AGT	L307C	TGT	Q373H	CAT
G042S	TCT	A108M	ATG	L174H	CAT	T240V	GTG	L307E	GAG	Q373K	AAG
G042T	ACT	A108N	AAT	L174K	AAG	T240W	TGG	L307F	TTT	Q373L	CTG
G042V	GTT	A108P	CCT	L174M	ATG	T240Y	TAT	L307G	GGG	Q373M	ATG
S043A	GCG	A108Q	CAG	L174N	AAT	L241A	GCG	L307I	ATT	Q373N	AAT
S043D	GAT	A108R	CGG	L174P	CCT	L241C	TGT	L307K	AAG	Q373P	CCT
S043E	GAG	A108S	TCT	L174Q	CAG	L241D	GAT	L307N	AAT	Q373R	CGT
S043F	TTT	A108T	ACT	L174R	CGT	L241E	GAG	L307P	CCT	Q373S	TCT
S043G	GGT	A108V	GTG	L174S	TCG	L241F	TTT	L307Q	CAG	Q373T	ACT
S043H	CAT	A108Y	TAT	L174T	ACT	L241G	GGG	L307R	AGG	Q373V	GTT
S043I	ATT	V109A	GCT	L174V	GTT	L241I	ATT	L307S	AGT	Q373W	TGG
S043K	AAG	V109C	TGT	L174W	TGG	L241K	AAG	L307T	ACT	L374A	GCT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
S043L	CTT	V109D	GAT	L174Y	TAT	L241P	CCT	L307V	GTG	L374D	GAT
S043N	AAT	V109E	GAG	L175C	TGT	L241Q	CAG	L307W	TGG	L374E	GAG
S043P	CCT	V109F	TTT	L175D	GAT	L241R	CGG	L307Y	TAT	L374G	GGT
S043Q	CAG	V109G	GGG	L175E	GAG	L241S	TCT	S308C	TGT	L374H	CAT
S043R	CGG	V109H	CAT	L175F	TTT	L241T	ACG	S308D	GAT	L374I	ATT
S043T	ACT	V109L	TTG	L175G	GGG	L241V	GTT	S308F	TTT	L374M	ATG
S043V	GTG	V109M	ATG	L175H	CAT	L241W	TGG	S308G	GGT	L374N	AAT
P044A	GCT	V109P	CCT	L175K	AAG	Y242A	GCG	S308H	CAT	L374P	CCT
P044C	TGT	V109Q	CAG	L175N	AAT	Y242C	TGT	S308K	AAG	L374R	AGG
P044E	GAG	V109R	AGG	L175P	CCT	Y242D	GAT	S308L	CTG	L374S	AGT
P044F	TTT	V109T	ACT	L175R	CGT	Y242F	TTT	S308M	ATG	L374T	ACT
P044G	GGG	V109W	TGG	L175S	TCT	Y242G	GGT	S308N	AAT	L374V	GTG
P044H	CAT	V109Y	TAT	L175T	ACT	Y242I	ATT	S308P	CCT	L374W	TGG
P044I	ATT	I110A	GCT	L175V	GTG	Y242K	AAG	S308R	CGG	L374Y	TAT
P044L	CTT	I110C	TGT	L175W	TGG	Y242L	CTT	S308T	ACT	E375A	GCT
P044N	AAT	I110D	GAT	L175Y	TAT	Y242M	ATG	S308V	GTT	E375C	TGT
P044Q	CAG	I110F	TTT	R176A	GCT	Y242P	CCG	S308W	TGG	E375F	TTT
P044R	CGT	I110G	GGG	R176C	TGT	Y242R	CGG	S308Y	TAT	E375G	GGT
P044S	TCT	I110H	CAT	R176E	GAG	Y242S	TCT	I309D	GAT	E375I	ATT
P044T	ACT	I110K	AAG	R176F	TTT	Y242T	ACG	I309E	GAG	E375K	AAG
P044W	TGG	I110L	CTG	R176G	GGG	Y242V	GTT	I309G	GGT	E375L	CTT
P044Y	ACG	I110M	ATG	R176H	CAT	Y242W	TGG	I309H	CAT	E375M	ATG
R045A	GCG	I110N	AAT	R176I	ATT	V243A	GCG	I309K	AAG	E375N	AAT
R045D	GAT	I110P	CCT	R176K	AAG	V243C	TGT	I309L	CTG	E375P	CCT
R045F	TTT	I110R	CGT	R176L	CTT	V243D	GAT	I309M	ATG	E375R	CGT
R045G	GGG	I110S	AGT	R176P	CCT	V243F	TTT	I309N	AAT	E375S	TCT
R045H	CAT	I110V	GTT	R176Q	CAG	V243G	GGG	I309Q	CAG	E375T	ACT
R045I	ATT	I110W	TGG	R176S	AGT	V243H	CAT	I309R	CGT	E375V	GTT
R045K	AAG	D111C	TGT	R176T	ACT	V243L	CTT	I309S	AGT	E375Y	TAT
R045M	ATG	D111E	GAG	R176V	GTG	V243M	ATG	I309T	ACT	K376A	GCT
R045P	CCT	D111G	GGT	R176W	TGG	V243P	CCT	I309V	GTG	K376D	GAT
R045Q	CAG	D111H	CAT	P177A	GCT	V243Q	CAG	I309W	TGG	K376E	GAG
R045S	TCG	D111I	ATT	P177C	TGT	V243R	AGG	I309Y	TAT	K376G	GGG
R045T	ACG	D111K	AAG	P177D	GAT	V243S	AGT	M310A	GCT	K376I	ATT
R045V	GTG	D111L	TTG	P177F	TTT	V243T	ACG	M310C	TGT	K376L	TTG
R045W	TGG	D111M	ATG	P177G	GGG	V243W	TGG	M310E	GAG	K376M	ATG
R045Y	TAT	D111P	ACT	P177H	CAT	V243Y	TAT	M310F	TTT	K376P	CCT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
I046A	GCG	D111Q	CAG	P177L	CTT	R244A	GCG	M310G	GGG	K376Q	CAG
I046C	TGT	D111R	CGG	P177M	ATG	R244D	GAT	M310K	AAG	K376R	CGT
I046E	GAG	D111S	AGT	P177Q	CAG	R244G	GGG	M310L	CTG	K376S	AGT
I046F	TTT	D111T	ACT	P177R	CGG	R244H	CAT	M310N	AAT	K376T	ACT
I046H	CAT	D111V	GTT	P177S	TCT	R244I	ATT	M310P	CCT	K376V	GTG
I046L	CTT	D111W	TGG	P177T	ACT	R244K	AAG	M310Q	CAG	K376W	TGG
I046M	ATG	D111Y	TAT	P177V	GTT	R244M	ATG	M310R	CGG	K376Y	TAT
I046N	AAT	W112C	TGT	P177W	TGG	R244N	AAT	M310S	AGT	G377C	TGT
I046P	CCT	W112D	GAT	P177Y	TAT	R244P	CCT	M310V	GTG	G377D	GAT
I046R	CGT	W112E	GAG	N178A	GCT	R244Q	CAG	M310W	TGG	G377E	GAG
I046S	TCT	W112F	TTT	N178D	GAT	R244S	TCT	M310Y	TAT	G377F	TTT
I046T	ACT	W112G	GGG	N178E	GAG	R244T	ACG	R311A	GCT	G377H	CAT
I046V	GTT	W112H	CAT	N178G	GGG	R244V	GTG	R311C	TGT	G377I	ATT
I046W	TGG	W112I	ATT	N178I	ATT	R244W	TGG	R311E	GAG	G377K	AAG
I046Y	TAT	W112L	CTT	N178K	AAG	R244Y	TAT	R311F	TTT	G377L	CTT
N047A	GCT	W112N	AAT	N178L	TTG	N245A	GCG	R311G	GGT	G377M	ATG
N047D	GAT	W112P	CCT	N178M	ATG	N245C	TGT	R311H	CAT	G377P	CCT
N047F	TTT	W112Q	CAG	N178P	CCT	N245F	TTT	R311I	ATT	G377R	AGG
N047G	GGG	W112R	CGT	N178R	CGG	N245G	GGG	R311K	AAG	G377S	TCG
N047H	CAT	W112S	TCT	N178S	AGT	N245H	CAT	R311L	TTG	G377T	ACT
N047I	ATT	W112V	GTT	N178T	ACT	N245I	ATT	R311P	CCT	G377V	GTG
N047K	AAG	W112Y	TAT	N178V	GTG	N245K	AAG	R311Q	CAG	G377Y	TAT
N047L	CTT	E113A	GCT	N178W	TGG	N245L	CTG	R311S	TCT	G378D	GAT
N047M	ATG	E113C	TGT	N178Y	TAT	N245P	CCG	R311T	ACT	G378E	GAG
N047P	CCT	E113D	GAT	H179A	GCT	N245Q	CAG	R311V	GTG	G378F	TTT
N047Q	CAG	E113F	TTT	H179C	TGT	N245R	CGG	R311W	TGG	G378I	ATT
N047R	CGG	E113G	GGG	H179E	GAG	N245S	TCG	S312A	GCT	G378K	AAG
N047S	TCT	E113H	CAT	H179G	GGG	N245T	ACG	S312C	TGT	G378L	CTG
N047T	ACG	E113L	CTT	H179I	ATT	N245V	GTG	S312E	GAG	G378M	ATG
N047V	GTG	E113P	CCT	H179K	AAG	N245W	TGG	S312F	TTT	G378N	AAT
N047W	TGG	E113Q	CAG	H179L	CTG	R246A	GCG	S312G	GGG	G378Q	CAG
N047Y	TAT	E113R	CGT	H179M	ATG	R246C	TGT	S312H	CAT	G378R	AGG
A048C	TGT	E113S	TCT	H179N	AAT	R246D	GAT	S312K	AAG	G378S	TCT
A048E	GAG	E113T	ACT	H179P	CCT	R246E	GAG	S312L	CTG	G378T	ACT
A048F	TTT	E113V	GTT	H179R	AGG	R246G	GGG	S312M	ATG	G378V	GTG
A048G	GGT	E113W	TGG	H179S	AGT	R246H	CAT	S312N	AAT	G378W	TGG
A048H	CAT	E113Y	CAT	H179T	ACT	R246I	ATT	S312P	CCT	G378Y	TAT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
A048I	ATT	E114A	GCT	H179V	GTG	R246K	AAG	S312Q	CAG	K379A	GCT
A048K	AAG	E114C	TGT	H179W	TGG	R246L	TTG	S312R	CGG	K379C	TGT
A048L	CTG	E114D	GAT	L180A	GCT	R246M	ATG	S312T	ACT	K379E	GAG
A048M	ATG	E114G	GGG	L180C	TGT	R246P	CCT	S312V	GTT	K379F	TTT
A048N	AAT	E114H	CAT	L180E	GAG	R246S	AGT	S312W	TGG	K379G	GGG
A048P	CCT	E114I	ATT	L180F	TTT	R246T	ACG	M313A	GCT	K379H	CAT
A048Q	CAG	E114L	CTG	L180G	GGT	R246V	GTT	M313C	TGT	K379I	ATT
A048R	CGG	E114M	ATG	L180H	CAT	R246W	TGG	M313D	GAT	K379L	CTT
A048S	TCT	E114P	CCT	L180I	ATT	V247A	GCG	M313E	GAG	K379M	ATG
A048V	GTT	E114R	CGG	L180K	AAG	V247C	TGT	M313F	TTT	K379N	AAT
A048W	TGG	E114S	TCT	L180M	ATG	V247F	TTT	M313G	GGG	K379R	CGT
A048Y	TAT	E114T	ACT	L180N	AAT	V247H	CAT	M313H	CAT	K379S	TCT
T049A	GCG	E114V	GTG	L180P	CCT	V247I	ATT	M313K	AAG	K379T	ACT
T049C	TGT	E114W	TGG	L180R	AGG	V247L	CTG	M313L	CTT	K379V	GTT
T049D	GAT	E114Y	TAT	L180S	TCG	V247M	ATG	M313P	CCT	K379W	TGG
T049F	TTT	W115A	GCT	L180T	ACT	V247N	AAT	M313R	CGT	F380A	GCT
T049G	GGG	W115C	TGT	L180W	TGG	V247P	CCT	M313S	TCG	F380C	TGT
T049H	CAT	W115D	GAT	W181A	GCT	V247Q	CAG	M313T	ACT	F380D	GAT
T049I	ATT	W115F	TTT	W181C	TGT	V247R	CGT	M313V	GTT	F380E	GAG
T049K	AAG	W115G	GGT	W181D	GAT	V247S	TCT	M313Y	TAT	F380G	GGG
T049L	TTG	W115H	CAT	W181E	GAG	V247T	ACT	K314A	GCT	F380I	ATT
T049N	AAT	W115I	ATT	W181F	TTT	V247W	TGG	K314C	TGT	F380L	CTT
T049P	CCG	W115K	AAG	W181H	CAT	V247Y	TAT	K314D	GAT	F380P	CCT
T049R	AGG	W115L	CTT	W181I	ATT	R248A	GCT	K314H	CAT	F380Q	CAG
T049S	TCG	W115M	ATG	W181K	AAG	R248C	TGT	K314I	ATT	F380R	CGG
T049V	GTT	W115P	CCT	W181L	CTG	R248D	GAT	K314L	TTG	F380S	AGT
T049W	TGG	W115R	CGG	W181M	ATG	R248E	GAG	K314N	AAT	F380T	ACT
G050A	GCG	W115S	AGT	W181N	AAT	R248G	GGG	K314P	CCT	F380V	GTG
G050C	TGT	W115V	GTG	W181Q	CAG	R248H	CAT	K314Q	CAG	F380W	TGG
G050D	GAT	W115Y	TAT	W181R	CGT	R248I	ATT	K314R	CGG	F380Y	TAT
G050E	GAG	R116A	GCT	W181S	TCT	R248L	CTT	K314S	TCG	T381A	AGC
G050F	TTT	R116C	TGT	W181V	GTG	R248M	ATG	K314T	ACT	T381E	GAG
G050H	CAT	R116D	GAT	G182A	GCT	R248P	CCG	K314V	GTT	T381F	TTT
G050L	CTT	R116E	GAG	G182C	TGT	R248S	TCG	K314W	TGG	T381G	GGT
G050M	ATG	R116G	GGG	G182D	GAT	R248T	ACG	K314Y	TAT	T381H	CAT
G050P	CCT	R116H	CAT	G182E	GAG	R248V	GTG	S315A	GCT	T381K	AAG
G050Q	CAG	R116I	ATT	G182H	CAT	R248W	TGG	S315C	TGT	T381L	TTG

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
G050R	CGG	R116L	CTG	G182L	CTT	R248Y	TAT	S315E	GAG	T381N	AAT
G050S	AGT	R116N	AAT	G182M	ATG	E249A	GCT	S315G	GGT	T381P	CCT
G050V	GTT	R116P	CCT	G182N	AAT	E249G	GGG	S315H	CAT	T381Q	CAG
G050W	TGG	R116Q	CAG	G182P	CCT	E249H	CAT	S315I	ATT	T381R	CGT
G050Y	TAT	R116S	TCT	G182Q	CAG	E249I	ATT	S315K	AAG	T381S	AGT
Q051A	GCG	R116T	ACT	G182R	CGT	E249K	AAG	S315L	CTG	T381V	GTG
Q051C	TGT	R116V	GTG	G182S	AGT	E249L	CTG	S315M	ATG	T381W	TGG
Q051D	GAT	R116W	TGG	G182T	ACT	E249M	ATG	S315P	CCT	T381Y	TAT
Q051F	TTT	P117D	GAT	G182V	GTT	E249P	CCT	S315R	CGG	V382E	GAG
Q051H	CAT	P117E	GAG	G182Y	TAT	E249Q	CAG	S315T	ACT	V382G	GGG
Q051I	ATT	P117F	TTT	Y183A	GCT	E249R	CGG	S315V	GTT	V382H	CAT
Q051K	AAG	P117G	GGT	Y183C	TGT	E249S	TCT	S315W	TGG	V382I	ATT
Q051M	ATG	P117H	CAT	Y183D	GAT	E249T	ACT	S315Y	TAT	V382K	AAG
Q051N	AAT	P117I	ATT	Y183E	GAG	E249V	GTG	C316A	GCT	V382L	TTG
Q051P	CCT	P117K	AAG	Y183G	GGG	E249W	TGG	C316D	GAT	V382M	ATG
Q051R	CGG	P117N	AAT	Y183I	ATT	E249Y	TAT	C316E	GAG	V382N	AAT
Q051S	TCT	P117Q	CAG	Y183K	AAG	A250C	TGT	C316G	GGG	V382P	CCT
Q051T	ACG	P117R	AGG	Y183L	TTG	A250F	TTT	C316I	ATT	V382Q	CAG
Q051W	TGG	P117S	TCG	Y183N	AAT	A250G	GGT	C316K	AAG	V382R	CGG
Q051Y	TAT	P117T	ACT	Y183P	CCT	A250H	CAT	C316L	CTG	V382S	TCG
G052A	GCT	P117V	GTT	Y183Q	CAG	A250K	AAG	C316M	ATG	V382T	ACT
G052C	TGT	P117W	TGG	Y183R	CGT	A250L	CTG	C316P	CCT	V382W	TGG
G052E	GAG	P117Y	TAT	Y183S	TCT	A250M	ATG	C316R	AGG	V382Y	TAT
G052F	TTT	T118C	TGT	Y183V	GTT	A250N	AAT	C316S	TCT	R383A	GCT
G052H	CAT	T118D	GAT	Y183W	TGG	A250P	CCT	C316T	ACT	R383E	GAG
G052K	AAG	T118E	GAG	Y184A	GCT	A250Q	CAG	C316V	GTT	R383F	TTT
G052L	CTT	T118G	GGG	Y184C	TGT	A250R	AGG	C316W	TGG	R383G	GGG
G052N	AAT	T118H	CAT	Y184D	GAT	A250S	TCT	C316Y	TAT	R383H	CAT
G052P	CCT	T118K	AAG	Y184E	GAG	A250T	ACG	L317A	GCT	R383I	ATT
G052Q	CAG	T118L	CTG	Y184F	TTT	A250V	GTG	L317C	TGT	R383K	AAG
G052R	CGG	T118M	ATG	Y184G	GGT	A250W	TGG	L317D	GAT	R383L	CTG
G052S	AGT	T118N	AAT	Y184H	CAT	I251C	TGT	L317G	GGG	R383M	ATG
G052T	ACT	T118P	CCT	Y184K	AAG	I251D	GAT	L317H	CAT	R383N	AAT
G052W	TGG	T118Q	CAG	Y184L	CTT	I251F	TTT	L317I	ATT	R383P	CCT
G052Y	TAT	T118R	CGT	Y184M	ATG	I251G	GGG	L317K	AAG	R383S	TCG
V053A	GCG	T118V	GTT	Y184P	CCT	I251H	CAT	L317M	ATG	R383T	ACT
V053C	TGT	T118W	TGG	Y184R	AGG	I251K	AAG	L317N	AAT	R383V	GTG

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
V053D	GAT	T118Y	TAT	Y184S	TCG	I251L	CTT	L317P	CCT	R383W	TGG
V053E	GAG	W119A	GCT	Y184V	GTG	I251M	ATG	L317Q	CAG	G384A	GCT
V053G	GGG	W119D	GAT	Y184W	TGG	I251P	CCG	L317R	AGG	G384C	TGT
V053H	CAT	W119E	GAG	L185A	GCT	I251Q	CAG	L317S	TCG	G384D	GAT
V053L	CTG	W119F	TTT	L185D	GAT	I251S	AGT	L317T	ACT	G384E	GAG
V053N	AAT	W119G	GGT	L185E	GAG	I251T	ACT	L317W	TGG	G384F	TTT
V053P	CCG	W119I	ATT	L185F	TTT	I251V	GTG	L318C	TGT	G384H	CAT
V053Q	CAG	W119K	AAG	L185G	GGG	I251W	TGG	L318D	GAT	G384I	ATT
V053R	CGG	W119L	CTG	L185I	ATT	I251Y	TAT	L318F	TTT	G384K	AAG
V053S	AGT	W119N	AAT	L185K	AAG	R252A	GCT	L318G	GGG	G384L	CTT
V053T	ACT	W119P	CCT	L185N	AAT	R252D	GAT	L318H	CAT	G384M	ATG
V053W	TGG	W119Q	CAG	L185P	CCT	R252E	GAG	L318I	ATT	G384P	CCT
V053Y	TAT	W119R	CGG	L185R	CGG	R252F	TTT	L318K	AAG	G384Q	CAG
T054A	GCG	W119S	TCT	L185S	TCG	R252G	GGT	L318M	ATG	G384R	AGG
T054D	GAT	W119V	GTT	L185T	ACT	R252H	CAT	L318N	AAT	G384S	TCG
T054E	GAG	W119Y	TAT	L185V	GTG	R252I	ATT	L318P	CCT	G384T	ACT
T054F	TTT	A120C	TGT	L185W	TGG	R252K	AAG	L318Q	CAG	K385A	GCT
T054G	GGG	A120D	GAT	L185Y	TAT	R252L	CTG	L318R	CGG	K385C	TGT
T054H	CAT	A120F	TTT	F186A	GCT	R252N	AAT	L318S	AGT	K385G	GGG
T054I	ATT	A120G	GGG	F186D	GAT	R252P	CCT	L318T	ACT	K385H	CAT
T054M	ATG	A120H	CAT	F186G	GGT	R252S	TCG	L318W	TGG	K385L	CTT
T054N	AAT	A120I	ATT	F186H	CAT	R252T	ACT	L319C	TGT	K385M	ATG
T054P	CCG	A120L	CTT	F186I	ATT	R252V	GTG	L319E	GAG	K385N	AAT
T054Q	CAG	A120N	AAT	F186K	AAG	R252Y	TAT	L319F	TTT	K385P	CCG
T054R	CGT	A120P	CCT	F186L	CTT	V253A	GCG	L319G	GGG	K385Q	CAG
T054S	AGT	A120R	CGT	F186N	AAT	V253D	GAT	L319H	CAT	K385R	CGT
T054V	GTT	A120S	TCT	F186P	CCT	V253E	GAG	L319I	ATT	K385S	TCT
T054Y	TAT	A120T	ACT	F186Q	CAG	V253G	GGG	L319K	AAG	K385T	ACG
I055A	GCT	A120V	GTG	F186R	AGG	V253H	CAT	L319M	ATG	K385V	GTT
I055C	TGT	A120W	TGG	F186S	TCT	V253I	ATT	L319P	CCT	K385W	TGG
I055D	GAT	A120Y	TAT	F186V	GTT	V253L	CTG	L319Q	CAG	K385Y	TAT
I055F	TTT	R121A	GCT	F186W	TGG	V253M	ATG	L319R	AGG	P386A	GCG
I055G	GGG	R121C	TGT	F186Y	TAT	V253N	AAT	L319S	TCG	P386C	TGT
I055H	CAT	R121D	GAT	P187A	GCT	V253P	CCT	L319V	GTT	P386F	TTT
I055L	CTG	R121E	GAG	P187F	TTT	V253Q	CAG	L319W	TGG	P386G	GGG
I055N	AAT	R121F	TTT	P187G	GGG	V253R	CGG	L319Y	TAT	P386H	CAT
I055P	CCT	R121G	GGT	P187H	CAT	V253S	TCG	D320C	TGT	P386I	ATT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
I055Q	CAG	R121H	CAT	P187I	ATT	V253T	ACG	D320E	GAG	P386L	CTT
I055R	CGT	R121K	AAG	P187L	CTT	V253W	TGG	D320F	TTT	P386M	ATG
I055S	TCG	R121L	CTG	P187M	ATG	S254C	TGT	D320G	GGG	P386N	AAT
I055T	ACT	R121M	ATG	P187N	AAT	S254D	GAT	D320H	CAT	P386Q	CAG
I055V	GTT	R121P	CCT	P187Q	CAG	S254E	GAG	D320I	ATT	P386R	CGT
I055Y	TAT	R121S	TCG	P187R	AGG	S254G	GGG	D320K	AAG	P386S	AGT
F056A	GCG	R121T	ACT	P187S	TCG	S254I	ATT	D320L	TTG	P386T	ACG
F056C	TGT	R121V	GTT	P187T	ACT	S254K	AAG	D320M	ATG	P386V	GTT
F056E	GAG	R121W	TGG	P187V	GTT	S254L	TTG	D320N	AAT	P386Y	TAT
F056G	GGG	R121Y	TAT	P187W	TGG	S254N	AAT	D320P	CCT	T387C	TGT
F056H	CAT	N122A	GCT	P187Y	TAT	S254P	CCT	D320R	AGG	T387E	GAG
F056I	ATT	N122C	TGT	D188A	GCT	S254Q	CAG	D320S	AGT	T387F	TTT
F056K	AAG	N122E	GAG	D188C	TGT	S254R	CGG	D320V	GTG	T387G	GGG
F056L	TTG	N122F	TTT	D188F	TTT	S254T	ACT	D320W	TGG	T387H	CAT
F056N	AAT	N122I	ATT	D188G	GGG	S254V	GTG	D320Y	TAT	T387I	ATT
F056P	CCG	N122K	AAG	D188H	CAT	S254W	TGG	N321A	GCT	T387K	AAG
F056R	CGT	N122L	CTG	D188L	CTT	S254Y	TAT	N321D	GAT	T387L	CTG
F056S	TCT	N122M	ATG	D188M	ATG	K255A	GCG	N321E	GAG	T387M	ATG
F056T	ACT	N122P	CCT	D188N	AAT	K255C	TGT	N321G	GGT	T387N	AAT
F056V	GTT	N122Q	CAG	D188P	CCT	K255D	GAT	N321H	CAT	T387Q	CAG
F056W	TGG	N122R	CGG	D188Q	CAG	K255G	GGT	N321I	ATT	T387S	TCG
Y057A	GCT	N122S	TCT	D188R	AGG	K255H	CAT	N321K	AAG	T387V	GTT
Y057D	GAT	N122T	ACT	D188S	AGT	K255L	TTG	N321L	CTG	T387W	TGG
Y057E	GAG	N122V	GTT	D188T	ACT	K255N	AAT	N321M	ATG	T387Y	TAT
Y057F	TTT	N122W	TGG	D188V	GTG	K255P	CCG	N321P	CCT	L388A	GCG
Y057G	GGG	W123A	GCT	D188W	TGG	K255Q	CAG	N321R	CGG	L388C	TGT
Y057I	ATT	W123C	TGT	C189A	GCT	K255R	CGG	N321S	TCT	L388F	TTT
Y057L	TTG	W123D	GAT	C189E	GAG	K255S	TCG	N321T	ACT	L388G	GGG
Y057M	ATG	W123E	GAG	C189G	GGT	K255T	ACT	N321V	GTG	L388H	CAT
Y057P	CCG	W123G	GGG	C189H	CAT	K255V	GTT	N321Y	TAT	L388I	ATT
Y057Q	CAG	W123H	CAT	C189K	AAG	K255W	TGG	Y322C	TGT	L388M	ATG
Y057R	CGG	W123L	CTT	C189L	TTG	K255Y	TAT	Y322D	GAT	L388P	CCT
Y057S	AGT	W123M	ATG	C189M	ATG	I256A	GCT	Y322E	GAG	L388Q	CAG
Y057T	ACG	W123P	CCT	C189N	ACT	I256C	TGT	Y322F	TTT	L388R	CGT
Y057V	GTG	W123Q	CAG	C189P	CCT	I256D	GAT	Y322G	GGT	L388S	TCG
Y057W	TGG	W123R	AGG	C189R	AGG	I256E	GAG	Y322H	CAT	L388T	ACG
V058A	GCT	W123S	AGT	C189S	TCG	I256G	GGG	Y322I	ATT	L388V	GTT

Tabla 8: Variantes de PH20											
mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
V058C	TGT	W123T	ACT	C189T	ACT	I256H	CAT	Y322L	CTG	L388W	TGG
V058D	GAT	W123V	GTT	C189V	GTG	I256L	CTT	Y322N	AAT	L388Y	TAT
V058G	GGT	W123Y	TAT	C189W	TGG	I256M	ATG	Y322P	CCT	E389A	GCT
V058H	CAT	K124A	GCT	C189Y	TAT	I256N	AAT	Y322R	CGT	E389F	TTT
V058I	ATT	K124C	TGT	Y190C	TGT	I256P	CCG	Y322S	TCT	E389G	GGT
V058K	AAG	K124D	GAT	Y190E	GAG	I256Q	CAG	Y322T	ACT	E389H	CAT
V058L	CTT	K124E	GAG	Y190F	TTT	I256R	AGG	Y322V	GTG	E389I	ATT
V058N	AAT	K124F	TTT	Y190G	GGG	I256T	ACG	Y322W	TGG	E389K	AAG
V058P	CCT	K124G	GGG	Y190H	CAT	I256V	GTT	M323A	GCT	E389L	CTG
V058Q	CAG	K124H	CAT	Y190K	AAG	I256W	TGG	M323C	TGT	E389M	ATG
V058R	CGG	K124I	ATT	Y190L	CTT	P257A	GCG	M323E	GAG	E389P	CCT
V058S	TCG	K124L	CTT	Y190N	AAT	P257C	TGT	M323F	TTT	E389Q	CAG
V058W	TGG	K124N	AAT	Y190P	CCT	P257D	GAT	M323G	GGG	E389R	CGG
V058Y	TAT	K124P	CCT	Y190Q	CAG	P257G	GGG	M323H	CAT	E389S	TCG
D059A	GCT	K124R	CGG	Y190R	CGT	P257I	ATT	M323I	ATT	E389T	ACT
D059E	GAG	K124S	TCT	Y190S	TCT	P257K	AAG	M323K	AAG	E389V	GTT
D059G	GGG	K124T	ACT	Y190T	ACT	P257L	CTT	M323L	TTG	E389Y	TAT
D059H	CAT	K124V	GTG	Y190V	GTG	P257M	ATG	M323N	AAT	D390A	GCG
D059I	ATT	K124W	TGG	Y190W	TGG	P257N	AAT	M323P	CCT	D390C	TGT
D059L	CTT	P125A	GCT	N191A	GCT	P257Q	CAG	M323R	CGG	D390E	GAG
D059M	ATG	P125C	TGT	N191E	GAG	P257R	CGT	M323S	AGT	D390F	TTT
D059N	AAT	P125D	GAT	N191F	TTT	P257S	TCG	M323T	ACT	D390G	GGG
D059P	CCT	P125G	GGG	N191G	GGG	P257T	ACG	M323V	GTT	D390H	CAT
D059Q	CAG	P125H	CAT	N191K	AAG	P257V	GTG	E324A	GCT	D390L	CTT
D059R	CGT	P125I	ATT	N191L	TTG	P257W	TGG	E324C	TGT	D390N	AAT
D059T	ACG	P125L	CTT	N191M	ATG	D258A	GCG	E324D	GAT	D390P	CCG
D059V	GTG	P125N	AAT	N191P	CCT	D258E	GAG	E324F	TTT	D390R	CGG
D059W	TGG	P125Q	CAG	N191Q	CAG	D258G	GGG	E324G	GGG	D390S	AGT
D059Y	TAT	P125R	CGT	N191R	CGG	D258H	CAT	E324H	CAT	D390T	ACT
R060A	GCG	P125S	TCG	N191S	TCG	D258I	ATT	E324L	TTG	D390V	GTG
R060D	GAT	P125T	ACT	N191T	ACT	D258L	CTT	E324M	ATG	D390W	TGG
R060F	TTT	P125V	GTG	N191V	GTT	D258N	AAT	E324N	AAT	D390Y	TAT
R060G	GGT	P125W	TGG	N191W	TGG	D258P	CCG	E324P	CCT	L391A	GCT
R060H	CAT	P125Y	TAT	N191Y	TAT	D258Q	CAG	E324R	CGG	L391C	TGT
R060I	ATT	K126A	GCT	H192C	TGT	D258R	CGT	E324S	AGT	L391D	GAT
R060K	AAG	K126D	GAT	H192F	TTT	D258S	AGT	E324V	GTG	L391G	GGG
R060L	CTT	K126E	GAG	H192G	GGT	D258T	ACG	E324W	TGG	L391H	CAT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
R060N	AAT	K126F	TTT	H192K	AAG	D258V	GTG	E324Y	TAT	L391K	AAG
R060P	CCG	K126G	GGT	H192L	CTT	D258W	TGG	T325A	GCT	L391N	AAT
R060Q	CAG	K126H	CAT	H192M	ATG	D258Y	TAT	T325C	TGT	L391P	CCT
R060S	TCG	K126I	ATT	H192N	AAT	A259E	GAG	T325D	GAT	L391Q	CAG
R060T	ACG	K126L	CTG	H192P	CCT	A259G	GGG	T325E	GAG	L391R	CGG
R060V	GTT	K126M	ATG	H192Q	CAG	A259I	ATT	T325G	GGT	L391S	TCT
R060Y	TAT	K126N	AAT	H192R	CGT	A259K	AAG	T325H	CAT	L391T	ACT
L061A	GCT	K126P	CCT	H192S	TCG	A259L	TTG	T325I	ATT	L391V	GTG
L061E	GAG	K126Q	CAG	H192T	ACT	A259M	ATG	T325K	AAG	L391W	TGG
L061F	TTT	K126R	AGG	H192V	GTT	A259N	AAT	T325M	ATG	L391Y	TAT
L061G	GGG	K126S	TCT	H192W	TGG	A259P	CCT	T325N	AAT	E392A	GCT
L061H	CAT	K126T	ACT	H192Y	TAT	A259Q	CAG	T325Q	CAG	E392C	TGT
L061I	ATT	K126V	GTG	H193A	GCT	A259R	CGT	T325R	CGG	E392F	TTT
L061M	ATG	K126W	TGG	H193C	TGT	A259S	AGT	T325S	TCG	E392G	GGG
L061N	AAT	K126Y	TAT	H193D	GAT	A259T	ACT	T325V	GTG	E392K	AAG
L061P	CCT	D127A	GCT	H193F	TTT	A259V	GTG	T325W	TGG	E392L	CTG
L061Q	CAG	D127E	GAG	H193G	GGG	A259W	TGG	I326A	GCT	E392M	ATG
L061R	AGG	D127F	TTT	H193K	AAG	A259Y	TAT	I326C	TGT	E392P	CCT
L061T	ACT	D127G	GGT	H193L	TTG	K260A	GCG	I326D	GAT	E392Q	CAG
L061V	GTT	D127H	CAT	H193M	ATG	K260C	TGT	I326E	GAG	E392R	AGG
L061W	TGG	D127K	AAG	H193P	CCG	K260D	GAT	I326G	GGG	E392S	AGT
L061Y	TAT	D127L	CTG	H193Q	CAG	K260E	GAG	I326H	CAT	E392T	ACT
G062A	GCG	D127M	ATG	H193R	AGG	K260G	GGG	I326K	AAG	E392V	GTT
G062C	TGT	D127N	AAT	H193S	TCT	K260H	CAT	I326L	CTT	E392W	TGG
G062D	GAT	D127Q	CAG	H193T	ACG	K260L	TTG	I326N	AAT	E392Y	TAT
G062F	TTT	D127R	CGT	H193V	GTG	K260M	ATG	I326P	CCT	Q393A	GCG
G062I	ATT	D127S	AGT	H193Y	TAT	K260P	CCG	I326R	CGG	Q393C	TGT
G062K	AAG	D127T	ACT	Y194A	GCT	K260Q	CAG	I326S	TCT	Q393D	GAT
G062L	CTT	D127V	GTT	Y194C	TGT	K260R	CGG	I326V	GTG	Q393F	TTT
G062M	ATG	D127W	TGG	Y194E	GAG	K260S	TCT	I326W	TGG	Q393G	GGT
G062P	CCT	V128A	GCT	Y194F	TTT	K260V	GTT	I326Y	TAT	Q393H	CAT
G062Q	CAG	V128C	TGT	Y194G	GGG	K260W	TGG	L327A	GCT	Q393I	ATT
G062R	CGT	V128E	GAG	Y194I	ATT	K260Y	TAT	L327D	GAT	Q393K	AAG
G062S	AGT	V128F	TTT	Y194L	TTG	S261A	GCG	L327E	GAG	Q393L	TTG
G062T	ACT	V128G	GGG	Y194N	AAT	S261E	GAG	L327F	TTT	Q393M	ATG
G062V	GTG	V128H	CAT	Y194P	CCT	S261F	TTT	L327G	GGG	Q393N	AAT
G062Y	TAT	V128I	ATT	Y194Q	CAG	S261G	GGG	L327H	CAT	Q393P	CCG

Tabla 8: Variantes de PH20											
mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
Y063A	GCG	V128K	AAG	Y194R	AGG	S261I	ATT	L327M	ATG	Q393R	CGT
Y063C	TGT	V128L	CTG	Y194S	TCG	S261K	AAG	L327N	AAT	Q393S	TCG
Y063G	GGT	V128P	CCT	Y194T	ACG	S261L	CTT	L327Q	CAG	Q393T	ACG
Y063H	CAT	V128Q	CAG	Y194V	GTG	S261M	ATG	L327R	CGG	F394A	GCG
Y063I	ATT	V128R	AGG	Y194W	TGG	S261N	AAT	L327S	AGT	F394D	GAT
Y063K	AAG	V128S	TCG	K195A	GCG	S261P	CCT	L327T	ACT	F394E	GAG
Y063L	CTG	V128W	TGG	K195E	GAG	S261Q	CAG	L327V	GTG	F394G	GGG
Y063M	ATG	V128Y	TAT	K195F	TTT	S261R	CGT	L327W	TGG	F394I	ATT
Y063N	AAT	Y129A	GCT	K195G	GGT	S261T	ACT	L327Y	TAT	F394K	AAG
Y063P	CCT	Y129C	TGT	K195H	CAT	S261V	GTT	N328A	GCT	F394L	CTG
Y063R	AGG	Y129D	GAT	K195I	ATT	S261W	TGG	N328C	TGT	F394N	AAT
Y063S	TCT	Y129E	GAG	K195L	TTG	P262A	GCG	N328D	GAT	F394P	CCG
Y063T	ACG	Y129G	GGG	K195N	AAT	P262D	GAT	N328G	GGT	F394Q	CAG
Y063V	GTG	Y129H	CAT	K195Q	CAG	P262E	GAG	N328H	CAT	F394R	CGT
Y063W	TGG	Y129L	TTG	K195R	CGT	P262F	TTT	N328I	ATT	F394S	TCG
Y064A	GCT	Y129M	ATG	K195S	TCT	P262G	GGG	N328K	AAG	F394T	ACT
Y064C	TGT	Y129P	CCT	K195T	ACT	P262H	CAT	N328L	CTT	F394V	GTT
Y064D	GAT	Y129Q	CAG	K195V	GTG	P262I	ATT	N328Q	CAG	F394W	TGG
Y064E	GAG	Y129R	CGG	K195W	TGG	P262K	AAG	N328R	AGG	S395A	GCG
Y064F	TTT	Y129S	AGT	K195Y	TAT	P262Q	CAG	N328S	AGT	S395C	TGT
Y064G	GGT	Y129T	ACT	K196A	GCT	P262R	CGT	N328T	ACT	S395D	GAT
Y064H	CAT	Y129V	GTT	K196C	TGT	P262S	TCT	N328V	GTG	S395E	GAG
Y064I	ATT	Y129W	TGG	K196D	GAT	P262T	ACT	N328W	TGG	S395G	GGG
Y064K	AAG	K130C	TGT	K196E	GAG	P262V	GTG	N328Y	TAT	S395H	CAT
Y064L	CTT	K130D	GAT	K196G	GGG	P262W	TGG	P329C	TGT	S395K	AAG
Y064P	CCT	K130E	GAG	K196I	ATT	P262Y	TAT	P329F	TTT	S395L	CTT
Y064Q	CAG	K130G	GGG	K196L	TTG	L263A	GCT	P329G	GGT	S395M	ATG
Y064R	CGG	K130H	CAT	K196N	AAT	L263E	GAG	P329H	CAT	S395P	CCT
Y064S	AGT	K130I	ATT	K196P	CCG	L263F	TTT	P329I	ATT	S395R	CGG
Y064T	ACT	K130L	TTG	K196R	CGT	L263G	GGG	P329K	AAG	S395T	ACG
Y064V	GTT	K130N	AAT	K196S	TCG	L263H	CAT	P329L	CTG	S395V	GTT
Y064W	TGG	K130Q	CAG	K196T	ACT	L263K	AAG	P329N	AAT	S395W	TGG
P065A	GCT	K130R	AGG	K196V	GTG	L263M	ATG	P329Q	CAG	S395Y	TAT
P065C	TGT	K130S	TCT	K196W	TGG	L263N	AAT	P329R	CGT	E396A	GCG
P065D	GAT	K130T	ACT	K196Y	TAT	L263P	CCG	P329S	AGT	E396C	TGT
P065F	TTT	K130V	GTG	P197A	GCT	L263Q	CAG	P329T	ACT	E396D	GAT
P065G	GGG	K130W	TGG	P197C	TGT	L263R	CGG	P329V	GTT	E396F	TTT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
P065H	CAT	K130Y	TAT	P197D	GAT	L263S	AGT	P329W	TGG	E396G	GGG
P065I	ATT	N131C	TGT	P197E	GAG	L263T	ACT	P329Y	TAT	E396H	CAT
P065K	AAG	N131E	GAG	P197F	TTT	L263V	GTT	Y330A	GCT	E396I	ATT
P065N	AAT	N131F	TTT	P197G	GGT	L263W	TGG	Y330C	TGT	E396L	CTT
P065R	CGG	N131G	GGG	P197H	CAT	P264A	GCG	Y330D	GAT	E396P	CCG
P065S	TCG	N131H	CAT	P197K	AAG	P264D	GAT	Y330E	GAG	E396Q	CAG
P065T	ACG	N131I	ATT	P197L	TTG	P264E	GAG	Y330F	TTT	E396R	AGG
P065V	GTT	N131L	CTT	P197M	ATG	P264F	TTT	Y330G	GGT	E396S	TCT
P065W	TGG	N131M	ATG	P197Q	CAG	P264G	GGT	Y330I	ATT	E396T	ACT
P065Y	TAT	N131P	CCT	P197R	CGT	P264H	CAT	Y330L	CTG	E396V	GTG
Y066A	GCG	N131Q	CAG	P197S	AGT	P264L	CTT	Y330M	ATG	E396Y	TAT
Y066C	TGT	N131R	CGG	P197T	ACT	P264M	ATG	Y330N	AAT	K397A	GCT
Y066D	GAT	N131S	AGT	P197W	TGG	P264N	AAT	Y330P	CCT	K397C	TGT
Y066E	GAG	N131T	ACT	G198A	GCT	P264R	CGG	Y330R	AGG	K397E	GAG
Y066G	GGT	N131V	GTG	G198C	TGT	P264S	AGT	Y330S	AGT	K397F	TTT
Y066H	CAT	N131Y	TAT	G198D	GAT	P264T	ACT	Y330V	GTT	K397G	GGT
Y066I	ATT	R132A	GCT	G198E	GAG	P264V	GTT	I331V	GTG	K397I	ATT
Y066K	AAG	R132C	TGT	G198H	CAT	P264W	TGG	Y330W	TGG	K397L	TTG
Y066L	CTG	R132E	GAG	G198L	CTG	P264Y	TAT	I331A	GCT	K397M	ATG
Y066N	AAT	R132F	TTT	G198N	AAT	V265A	GCG	I331C	TGT	K397N	AAT
Y066P	CCT	R132H	CAT	G198P	CCG	V265C	TGT	I331D	GAT	K397P	CCG
Y066R	CGG	R132I	ATT	G198Q	CAG	V265D	GAT	I331E	GAG	K397Q	CAG
K397T	ACT	R132K	AAG	G198R	AGG	V265E	GAG	I331F	TTT	K397R	AGG
K397V	GTT	R132L	TTG	G198S	TCT	V265F	TTT	I331H	CAT	K397S	TCG
F398A	GCT	L406P	CCT	K415G	GGT	C423T	ACT	A432L	TTG	E441D	GAT
F398C	TGT	L406Q	CAG	K415L	CTG	C423V	GTG	A432M	ATG	E441F	TTT
F398E	GAG	L406R	CGG	K415M	ATG	C423W	TGG	A432N	AAT	E441G	GGG
F398G	GGT	L406S	AGT	K415P	CCG	I424A	GCT	A432P	CCT	E441H	CAT
F398H	CAT	L406T	ACG	K415Q	CAG	I424C	TGT	A432R	AGG	E441K	AAG
F398I	ATT	L406V	GTT	K415R	CGG	I424E	GAG	A432S	TCT	E441L	CTT
F398L	CTT	L406Y	TAT	K415S	TCT	I424G	GGG	A432V	GTG	E441N	AAT
F398N	AAT	S407A	GCG	K415T	ACT	I424H	CAT	A432Y	TAT	E441Q	CAG
F398P	CCT	S407D	GAT	K415V	GTG	I424K	AAG	F433A	GCT	E441R	CGG
F398R	AGG	S407E	GAG	K415W	TGG	I424L	CTT	F433C	TGT	E441S	AGT
F398S	TCT	S407F	TTT	K415Y	TAT	I424N	AAT	F433D	GAT	E441T	ACT
F398T	ACT	S407G	GGT	D416C	TGT	I424Q	CAG	F433E	GAG	E441V	GTG
F398V	GTT	S407H	CAT	D416F	TTT	I424R	CGG	F433G	GGG	E441Y	TAT

Tabla 8: Variantes de PH20											
mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
F398W	TGG	S407L	CTG	D416G	GGT	I424S	TCG	F433H	CAT	E442C	TGT
F398Y	TAT	S407M	ATG	D416H	CAT	I424T	ACT	F433I	ATT	E442G	GGG
Y399A	GCG	S407N	AAT	D416I	ATT	I424V	GTT	F433K	AAG	E442H	CAT
Y399C	TGT	S407P	CCT	D416K	AAG	I424W	TGG	F433L	TTG	E442K	AAG
Y399D	GAT	S407Q	CAG	D416L	CTT	I424Y	TAT	F433P	CCT	E442L	CTT
Y399E	GAG	S407R	CGG	D416N	AAT	A425C	TGT	F433R	CGG	E442M	ATG
Y399G	GGG	S407T	ACG	D416Q	CAG	A425D	GAT	F433S	AGT	E442N	AAT
Y399K	AAG	S407V	GTG	D416R	CGG	A425E	GAG	F433T	ACT	E442P	CCT
Y399M	ATG	S407W	TGG	D416S	TCT	A425G	GGT	F433V	GTG	E442Q	CAG
Y399N	AAT	C408A	GCG	D416T	ACG	A425I	ATT	F433W	TGG	E442R	CGG
Y399P	CCT	C408E	GAG	D416V	GTG	A425K	AAG	L434F	TTT	E442S	AGT
Y399Q	CAG	C408F	TTT	D416W	TGG	A425L	TTG	L434G	GGT	E442T	ACT
Y399R	CGG	C408G	GGG	D416Y	TAT	A425M	ATG	L434H	CAT	E442V	GTG
Y399S	TCG	C408I	ATT	T417A	GCT	A425N	AAT	L434I	ATT	E442W	TGG
Y399T	ACG	C408K	AAG	T417D	GAT	A425P	CCT	L434K	AAG	E442Y	TAT
Y399V	GTT	C408L	CTT	T417E	GAG	A425R	AGG	L434M	ATG	P443A	GCT
Y399W	TGG	C408N	AAT	T417F	TTT	A425S	AGT	L434N	AAT	P443D	GAT
C400A	GCG	C408P	CCT	T417G	GGG	A425V	GTG	L434P	CCT	P443E	GAG
C400D	GAT	C408R	CGT	T417H	CAT	A425W	TGG	L434Q	CAG	P443F	TTT
C400E	GAG	C408S	TCG	T417I	ATT	A425Y	TAT	L434R	CGG	P443G	GGG
C400F	TTT	C408T	ACT	T417K	AAG	D426A	GCT	L434S	AGT	P443H	CAT
C400G	GGG	C408V	GTT	T417L	TTG	D426C	TGT	L434T	ACT	P443I	ATT
C400I	ATT	C408W	TGG	T417M	ATG	D426E	GAG	L434V	GTT	P443L	CTT
C400L	CTG	C408Y	TAT	T417P	CCT	D426F	TTT	L434W	TGG	P443M	ATG
C400M	ATG	K409A	GCG	T417Q	CAG	D426G	GGG	L434Y	TAT	P443N	AAT
C400P	CCG	K409C	TGT	T417R	CGT	D426I	ATT	K435A	GCT	P443Q	CAG
C400Q	CAG	K409D	GAT	T417S	TCG	D426K	AAG	K435C	TGT	P443R	AGG
C400R	CGG	K409E	GAG	T417W	TGG	D426L	CTG	K435E	GAG	P443S	TCT
C400S	AGT	K409G	GGT	D418A	GCT	D426M	ATG	K435F	TTT	P443T	ACT
C400T	ACG	K409H	CAT	D418C	TGT	D426N	AAT	K435G	GGT	P443W	TGG
C400V	GTG	K409I	ATT	D418E	GAG	D426P	CCT	K435H	CAT	Q444C	TGT
C400Y	TAT	K409L	CTG	D418F	TTT	D426Q	CAG	K435I	ATT	QM4D	GAT
S401A	GCT	K409P	CCG	D418G	GGT	D426R	CGT	K435L	CTG	Q444E	GAG
S401C	TGT	K409Q	CAG	D418I	ATT	D426S	TCG	K435P	CCT	Q444F	TTT
S401D	GAT	K409R	AGG	D418L	TTG	D426Y	TAT	K435R	AGG	Q444G	GGG
S401E	GAG	K409S	TCG	D418M	ATG	G427A	GCT	K435S	TCT	Q444H	CAT
S401F	TTT	K409T	ACG	D418N	AAT	G427C	TGT	K435T	ACT	Q444I	ATT

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
S401G	GGG	K409V	GTG	D418P	CCT	G427F	TTT	K435V	GTT	Q444K	AAG
S401H	CAT	K409W	TGG	D418Q	CAG	G427H	CAT	K435W	TGG	Q444L	CTG
S401K	AAG	A412Y	TAT	D418R	CGG	G427I	ATT	K435Y	TAT	Q444M	ATG
S401L	CTT	E410D	GAT	D418S	TCG	G427K	AAG	P436C	TGT	Q444N	AAT
S401N	AAT	E410G	GGG	D418V	GTG	G427L	CTG	P436D	GAT	Q444R	CGG
S401Q	CAG	E410I	ATT	D418Y	TAT	G427P	CCT	P436E	GAG	Q444V	GTT
S401R	CGT	E410K	AAG	A419D	GAT	G427Q	CAG	P436G	GGG	Q444W	TGG
S401T	ACT	E410L	CTT	A419E	GAG	G427R	CGT	P436H	CAT	Q444Y	TAT
S401W	TGG	E410M	ATG	A419F	TTT	G427S	AGT	P436I	ATT	I445A	GCT
S401Y	TAT	E410N	AAT	A419G	GGG	G427T	ACT	P436K	AAG	I445C	TGT
C402A	GCT	E410P	CCG	A419H	CAT	G427V	GTG	P436L	CTG	I445D	GAT
C402D	GAT	E410Q	CAG	A419I	ATT	G427W	TGG	P436M	ATG	I445G	GGG
C402E	GAG	E410R	CGT	A419K	AAG	G427Y	TAT	P436Q	CAG	I445H	CAT
C402F	TTT	E410S	TCG	A419L	CTT	V428A	GCT	P436R	CGG	I445K	AAG
C402G	GGG	E410T	ACG	A419N	AAT	V428C	TGT	P436S	TCT	I445L	CTT
C402L	TTG	E410V	GTG	A419P	CCT	V428D	GAT	P436T	ACT	I445M	ATG
C402M	ATG	E410W	TGG	A419R	CGG	V428E	GAG	P436W	TGG	I445N	AAT
C402P	CCT	E410Y	TAT	A419S	TCT	V428F	TTT	P436Y	TAT	I445P	CCT
C402Q	CAG	K411A	GCT	A419T	ACT	V428G	GGT	P437A	GCT	I445Q	CAG
C402R	CGG	K411D	GAT	A419W	TGG	V428H	CAT	P437D	GAT	I445R	AGG
C402S	TCT	K411E	GAG	A419Y	TAT	V428L	CTT	P437F	TTT	I445S	AGT
C402T	ACG	K411F	TTT	V420A	GCT	V428M	ATG	P437G	GGT	I445T	ACT
C402V	GTT	K411G	GGG	V420D	GAT	V428N	AAT	P437H	CAT	I445V	GTG
C402W	TGG	K411H	CAT	V420F	TTT	V428P	CCT	P437I	ATT	I445W	TGG
C402Y	TAT	K411I	ATT	V420G	GGT	V428R	CGG	P437K	AAG	I445Y	TAT
Y403A	GCT	K411L	CTG	V420H	CAT	V428S	TCG	P437L	CTG	F446A	GCT
Y403C	TGT	K411N	AAT	V420I	ATT	V428T	ACT	P437M	ATG	F446C	TGT
Y403E	GAG	K411P	CCT	V420K	AAG	V428Y	TAT	P437Q	CAG	F446D	GAT
Y403F	TTT	K411R	AGG	V420L	CTT	C429A	GCT	P437R	CGT	F446E	GAG
Y403G	GGT	K411S	TCG	V420N	AAT	C429D	GAT	P437S	TCT	F446G	GGG
Y403H	CAT	K411T	ACT	V420P	CCT	C429G	GGT	P437T	ACT	F446H	CAT
Y403K	AAG	K411V	GTT	V420R	AGG	C429I	ATT	P437W	TGG	F446I	ATT
Y403L	TTG	K411W	TGG	V420S	TCT	C429K	AAG	P437Y	TAT	F446K	AAG
Y403M	ATG	A412D	GAT	V420T	ACT	C429L	TTG	M438A	GCT	F446L	TTG
Y403N	AAT	A412E	GAG	V420W	TGG	C429M	ATG	M438C	TGT	F446M	ATG
Y403P	CCG	A412G	GGG	V420Y	TAT	C429N	AAT	M438D	GAT	F446Q	CAG
Y403Q	CAG	A412H	CAT	D421A	GCT	C429P	CCT	M438E	GAG	F446R	CGG

Tabla 8: Variantes de PH20

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
Y403R	CGG	A412I	ATT	D421E	GAG	C429R	CGG	M438G	GGG	F446T	ACT
Y403S	TCT	A412L	CTG	D421G	GGT	C429S	TCG	M438L	TTG	F446V	GTT
Y403T	ACG	A412N	AAT	D421H	CAT	C429T	ACT	M438N	AAT	F446W	TGG
S404A	GCT	A412P	CCT	D421I	ATT	C429V	GTT	M438P	CCT	Y447D	GAT
S404C	TGT	A412Q	CAG	D421K	AAG	C429W	TGG	M438Q	CAG	Y447E	GAG
S404D	GAT	A412R	CGG	D421L	TTG	C429Y	TAT	M438R	AGG	Y447F	TTT
S404F	TTT	A412S	AGT	D421M	ATG	I430A	GCT	M438S	TCG	Y447G	GGT
S404G	GGT	A412V	GTT	D421N	AAT	I430D	GAT	M438T	ACT	Y447I	ATT
S404H	CAT	A412W	TGG	D421Q	CAG	I430E	GAG	M438V	GTG	Y447K	AAG
S404L	CTT	D413A	GCG	D421R	CGG	I430G	GGG	M438W	TGG	Y447L	CTT
S404M	ATG	D413E	GAG	D421S	TCG	I430H	CAT	M438Y	TAT	Y447M	ATG
S404N	AAT	D413F	TTT	D421T	ACT	I430K	AAG	E439A	GCT	Y447N	AAT
S404P	CCT	D413G	GGT	D421W	TGG	I430L	TTG	E439C	TGT	Y447P	CCT
S404R	AGG	D413H	CAT	D421Y	TAT	I430M	ATG	E439F	TTT	Y447Q	CAG
S404T	ACG	D413I	ATT	V422A	GCT	I430N	AAT	E439G	GGG	Y447R	AGG
S404V	GTG	D413K	AAG	V422C	TGT	I430P	CCT	E439H	CAT	Y447T	ACT
S404W	TGG	D413L	CTG	V422D	GAT	I430R	AGG	E439K	AAG	Y447V	GTT
S404Y	TAT	D413N	AAT	V422E	GAG	I430S	TCT	E439L	CTT	Y447W	TGG
T405A	GCG	D413P	CCG	V422G	GGG	I430T	ACT	E439N	AAT		
T405C	TGT	D413Q	CAG	V422H	CAT	I430V	GTT	E439P	CCT		
T405F	TTT	D413R	CGT	V422I	ATT	I430W	TGG	E439Q	CAG		
T405G	GGG	D413S	TCG	V422L	CTG	D431A	GCT	E439R	CGG		
T405I	ATT	D413T	ACT	V422M	ATG	D431E	GAG	E439S	TCG		
T405K	AAG	D413W	TGG	V422N	AAT	D431G	GGT	E439T	ACT		
T405L	TTG	V414A	GCG	V422P	CCT	D431H	CAT	E439V	GTT		
T405M	ATG	V414D	GAT	V422Q	CAG	D431I	ATT	E439W	TGG		
T405P	CCG	V414E	GAG	V422R	CGT	D431K	AAG	T440A	GCT		
T405Q	CAG	V414F	TTT	V422S	TCG	D431L	CTT	T440D	GAT		
T405R	CGT	V414G	GGT	V422T	ACT	D431N	AAT	T440E	GAG		
T405S	TCT	V414H	CAT	V422W	TGG	D431P	CCT	T440F	TTT		
T405V	GTG	V414I	ATT	V422Y	TAT	D431Q	CAG	T440G	GGG		
T7405W	TGG	V414K	AAG	C423A	GCT	D431R	CGT	T440H	CAT		
T405Y	TAT	V414L	TTG	C423D	GAT	D431S	TCT	T440I	ATT		
L406A	GCT	V414M	ATG	C423E	GAG	D431V	GTT	T440L	CTT		
L406C	TGT	V414Q	CAG	C423F	TTT	D431W	TGG	T440M	ATG		
L406D	GAT	V414R	AGG	C423G	GGG	D431Y	TAT	T440P	CCT		
L406E	GAG	V414S	TCG	C423H	CAT	A432C	TGT	T440Q	CAG		

mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod	mut	cod
L406F	TTT	V414T	ACT	C423L	CTG	A432E	GAG	T440R	AGG		
L406G	GGT	V414Y	TAT	C423M	ATG	A432F	TTT	T440S	AGT		
L406I	ATT	K415A	GCG	C423P	CCT	A432G	GGG	T440V	GTG		
L406N	AAT	K415C	TGT	C423Q	CAG	A432H	CAT	Troy	TAT		
		K415D	GAT	C423R	AGG	A432I	ATT	E441A	GCT		
		K415E	GAG	C423S	TCG	A432K	AAG	E441C	TGT		

2. Expresión

- 5 Para la expresión de cada mutante, se transfectó ADN de plásmido HZ24-PH20-IRES-SEAP que contenía ADNc que codificaba una de la PH20 variante o que codificaba PH20 de tipo silvestre en células CHO-S en monocapa (Invitrogen, Cat. n.º 11619-012) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cat. n.º 11668-027) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Se sembraron células CHO-S la noche antes de la transfección y se cultivaron en DMEM con FBS 10 % para ser confluentes al 80 % al día siguiente. Después, el medio de las células CHO-S se reemplazó con Opti-MEM. Se preparó una mezcla de ADN plasmídico y Lipofectamine (0,2 µg de ADN y 0,5 µl de Lipofectamine). La mezcla de Lipofectamine/ADN se añadió a células CHO-S y se incubó durante una noche. Al día siguiente, las células se complementaron con medio sin suero CD-CHO (Invitrogen, Cat. n.º 10743-029). Se recogió sobrenadante de células transfectadas en diversos puntos temporales después de la transfección, y en general 96 horas después de la transfección. El sobrenadante, que contenía la proteína de PH20 variante o PH20 de tipo silvestre que tenía una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, se almacenó a -20 °C. Se exploraron las actividades de los sobrenadantes como se describe en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 3

20 EXPLORACIÓN DE BIBLIOTECA CON UN ENSAYO DE ACTIVIDAD HIALURONIDASA PARA IDENTIFICAR MUTANTES DE ACTIVIDAD

- En este ejemplo, se exploraron sobrenadantes de variantes de PH20 expresadas generadas en el Ejemplo 2 usando un ensayo de actividad hialuronidasa para evaluar la actividad de cada mutante. Además, también se midió la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP) para permitir la normalización de la actividad de PH20 de los mutantes expresados con respecto al tipo silvestre de PH20. Se identificaron mutantes activos e inactivos.

1. Generación del sustrato de HA biotinilado (bHA)

- 30 Se biotiniló un HA 1,2-MDa (Lifecore) para su uso como un sustrato en el ensayo de actividad hialuronidasa. En primer lugar, se disolvieron 1,2 gramos (g) de HA 1,2 MDa a 4 °C en 600 ml de ddH₂O durante una semana a una concentración de 2 mg/ml con agitación. A continuación, se disolvieron 645,71 mg de Hidrazida de Biotina en 100 ml de DMSO hasta una concentración de 25 mM (6,458 mg/ml, 247,8 mg en 38,37 ml de DMSO). La solución de biotina se calentó brevemente a 37 °C hasta que la solución fue transparente. Además, se disolvieron 368,61 mg de Sulfo-NHS en 20 ml de ddH₂O para preparar una solución 100X (Sulfo-NHS 18,4 mg/ml). Se preparó una solución de EDC de carbodiimida soluble en agua 30 mM (1000X) disolviendo 17,63 mg de EDC en 3 ml de ddH₂O a una concentración de 5,7513 mg/ml justo antes de iniciarse la reacción.

- 40 A cuatro (4) frascos cerrados estériles de 1000 ml, se añadieron los siguientes componentes a temperatura ambiente (TA) y en el siguiente orden con agitación: 1) 200 ml de solución de HA 2 mg/ml; 2) 80 ml de MES 0,5 M, pH 5,0 con mezcla suave; y 3) 91,6 ml de ddH₂O con mezcla suave. A continuación, se añadieron secuencialmente 24 ml de Biotina-Hidrazida 25 mM y 4 ml de solución de Sulfo-NHS 100X, inmediatamente seguido de la adición de 500 µl de EDC. Después de la adición de cada componente, la solución se mezcló invirtiendo tres veces y agitando. Después de la adición del último componente, la solución se mezcló agitando durante una noche a 4 °C. Después, se añadió clorhidrato de guanidina a una concentración final de 4 M añadiendo 38,2 g por cada 100 ml y se permitió que se disolvieran completamente antes de ajustar el volumen de solución a 600 ml con ddH₂O.

- 50 Para diálisis, se transfirieron 200 ml de cada lote de la solución de clorhidrato de guanidina de HA conjugada a membranas de diálisis. Durante el transcurso de tres días, la solución se dializó frente a ddH₂O con un cambio en ddH₂O al menos seis veces. El volumen resultante de aproximadamente 840 ml se ajustó hasta un volumen final de 1000 ml con ddH₂O. La concentración final del hialuronano biotinilado (bHA) fue de 0,4 mg/ml.

2. Ensayo de actividad hialuronidasa

El ensayo enzimático fue una modificación del método descrito en Frost *et al.* (1997) (A Microtiter-Based Assay for Hyaluronidase Activity Not Requiring Specialized Reagents. *Analytical Biochemistry* (1997) 251: 263-269) que proporciona una medida de la actividad hialuronidasa de PH20.

En primer lugar, se unió sustrato de HA biotinilado (bHA) a placas de microtitulación de plástico para generar placas de ensayo. Brevemente, se distribuyeron 100 μ l de b-HA a 1 mg/ml en tampón de carbonato 0,5 M (pH 9,6) a cada pocillo de una microplata de alta unión (Immunolon 4 HBX de unión extra alta; Thermo Scientific). La placa se cubrió con un sellante de placas y se almacenó entre 2-8 °C durante 24-48 horas.

Después, la placa de ensayo se lavó con tampón de lavado solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X que contenía Tween 20 0,5 % (v/v) (PBST). Se generó PBST a partir de PBS 1X (generado del Catálogo n.º P5368, Sigma (Tampón de Fosfato 10 mM, Cloruro Potásico 2,7 mM, Cloruro Sódico 137 mM, pH 7,4) colocando los contenidos de un paquete de PBS en un cilindro graduado de 1 l con 800 ml de agua desionizada, se disolvió removiendo o agitando y añadiendo suficiente cantidad de agua a 1 l) añadiendo 500 μ l de Tween 20 (Catálogo n.º 6505; EMD Bioscience) a 900 ml de PBS 1X y añadiendo suficiente cantidad de agua hasta 1 l. Se realizó lavado usando el lavador de placas BioTek ELx405 Select CW (BioTek) lavando cinco (5) veces con 300 μ l de tampón de lavado PBST por pocillo para cada lavado. Al final de cada lavado, la placa se golpeó suavemente en una servilleta de papel para retirar el exceso de líquido de cada pocillo. Antes de la incubación con muestras, se añadieron 200 μ l de Tampón de Bloqueo (Albúmina de Suero Bovino (BSA) 1,0 % p/v en PBS) a cada pocillo y la placa de ensayo se incubó a 37 °C durante aproximadamente 1 hora antes. El tampón de bloqueo se generó añadiendo 2,5 g de BSA (n.º Catálogo 001-000-162; Jackson Immuno Research) a 200 ml de PBS 1X, removiendo, añadiendo una cantidad suficiente de PBS 1X a 250 ml y filtrando a través de una unidad de filtro de PES 0,2 μ M.

Se diluyeron sobrenadantes de PH20 variantes o de tipo silvestre transfectados generados como se ha descrito en el Ejemplo 1 en 1:25 por duplicado en tampón de diluyente de ensayo (tampón HEPES pH 7,4; HEPES 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 1 mM, BSA 1 mg/ml, pH 7,4, Tween-20 0,05 %) en microplacas de alta unión 4XHB no recubiertas). Para la curva patrón, se prepararon diluciones en serie 1:3 de rHuPH20 (generada como se ha descrito en el Ejemplo 1 con una actividad específica de 145 U/ml) en tampón de diluyente de ensayo por duplicado comenzando desde 4 U/ml para patrones de la siguiente manera: 3 U/ml, 1 U/ml, 1/3 U/ml, 1/9 U/ml, 1/27 U/ml, 1/81 U/ml y 1/243 U/ml. Se transfirieron cien microlitros (100 μ l) de cada patrón y muestra a las placas de ensayo y se incubaron durante aproximadamente 1,5 horas a 37 °C.

Después de la incubación, la placa se lavó con PBST usando el lavador de placas BioTek ELx405 Select CW lavando cinco (5) veces con 300 μ l de tampón de lavado PBST por pocillo para cada lavado. Al final de cada lavado, la placa se golpeó suavemente en una servilleta de papel para retirar el exceso de líquido de cada pocillo. Después, se añadieron 100 μ l de Estreptavidina-HRP (SA-HRP) diluido 1:5000 a cada pocillo de la placa y se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Para la dilución, se diluyó una reserva de conjugado de Estreptavidina-HRP 1 mg/ml (Catálogo n.º 21126; Thermo Scientific) 1:5000 en tampón de dilución (BSA 1 mg/ml; Tween20 0,025 %, NaCl 137 mM, Tris 20 mM, pH 7,5). Después de la incubación, la placa se lavó con PBST usando el lavador de placas BioTek ELx405 Select CW lavando cinco (5) veces con 300 μ l de tampón de lavado PBST por pocillo para cada lavado. Al final de cada lavado, la placa se golpeó suavemente en una servilleta de papel para retirar el exceso de líquido de cada pocillo. Después, se añadieron 100 μ l de solución TMB (Catálogo n.º 52-00-03; KPL; temperatura ambiente y protegido de la luz) a cada pocillo durante aproximadamente cinco (5) minutos a temperatura ambiente o hasta que se produjo un desarrollo de color óptimo. Para detener la reacción, se añadieron 100 μ l de Ácido Sulfúrico 1,0 N o solución de Terminación TMB (Catálogo n.º 50-85-06) a cada pocillo y las placas se golpearon suavemente para mezclar. Se midió la densidad óptica a 450 nm en un periodo de 30 minutos desde la adición de la solución de terminación. Ya que más PH20 en un patrón o una muestra conduciría a menos bHA disponible para unirse con SA-HRP, el valor de densidad óptica (450 nm) era inversamente proporcional a concentración de actividad hialuronidasa en cada muestra de ensayo.

3. Actividad de SEAP

También se midió la actividad de fosfatasa alcalina secretada (SEAP) en el sobrenadante de cultivo celular usando un ensayo colorimétrico de fosfatasa alcalina placentaria usando pNPP como un sustrato de fosfatasa (kit de pNPP SEAP Anaspec SensoLyte; Catálogo n.º 72144, Anaspec) según las instrucciones del fabricante. La señal de absorbancia se midió a densidad óptica (DO) de 405 nm.

Los criterios para la exploración de alto rendimiento (HTP) fueron que el sobrenadante transfectado diera como resultado una señal de SEAP de $\geq 0,1$ y la señal para el control de tipo silvestre de rHuPH20 produjera una señal de ≥ 1 U/ml. Además, los criterios para cada exploración fueron que las curvas patrón tuvieran una relación de señal con respecto a ruido (S/N) para el patrón de 0 U/ml frente al patrón de 3 U/ml a DO₄₀₅ de ≥ 5 , tuvieran menos de tres (3) patrones con un coeficiente de variación (CV) ≥ 10 % y al menos cuatro (4) de los patrones estuvieran en el intervalo lineal.

Ejemplo 4**VARIANTES DE PH20 SELECCIONADAS CON ACTIVIDAD HIALURONIDASA ALTERADA**

5 Cada variante generada se exploró con actividad hialuronidasa como se ha descrito en el Ejemplo 3. La expresión de SEAP se usó para normalizar la actividad de PH20 de cada variante con respecto al tipo silvestre de PH20. Se identificaron mutantes que mostraban actividad hialuronidasa alterada en comparación con el tipo silvestre.

1. Mutantes activos

10 Se seleccionaron mutantes activos por los que al menos una muestra duplicada mostraba más de 40 % de la actividad de tipo silvestre cuando se normalizó con respecto a la actividad de SEAP. Los mutantes activos identificados se exponen en la Tabla 9. La Tabla expone el reemplazo de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de PH20 expuesta en SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos de mutantes ejemplares también se expone por referencia a una SEQ ID NO. La Tabla también expone la actividad hialuronidasa promedio de duplicados ensayados normalizados por valores de SEAP en comparación con el promedio de actividades de PH20 de tipo silvestre en cada placa, que también se normalizaron por sus propios valores SEAP. Por ejemplo, un valor de 0,40 indica que la variante muestra 40 % de la actividad hialuronidasa de PH20 de tipo silvestre, un valor de 1 indica que la variante muestra una actividad hialuronidasa similar de tipo silvestre y un valor de 3,00 indica que la variante muestra 300 % de la actividad hialuronidasa de PH20 de tipo silvestre o actividad aumentada 3 veces en comparación con el tipo silvestre.

25 Los resultados en la Tabla 9 muestran que más de 600 mutantes ensayados muestran actividad que está aumentada en comparación con el tipo silvestre. Por ejemplo, aproximadamente 536 mutantes muestran 120 % o más del 120 % de la actividad hialuronidasa de PH20 de tipo silvestre y aproximadamente 75 de los mutantes muestran 300 % o más de 300 % de la actividad hialuronidasa de PH20 de tipo silvestre. En particular, los resultados en la Tabla 9 muestran que la actividad hialuronidasa en comparación con el tipo silvestre de mutante S69A es aproximadamente 22 veces; de mutante S69R es aproximadamente 14 veces; de mutante I70A es aproximadamente 27 veces; de mutante I70K es aproximadamente 14 veces; de mutante I70R es aproximadamente 14 veces; y de mutante I271L es aproximadamente 10 veces.

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
L001A	74	0,95	Q140G		0,73	T293F	561	1,94
L001C		0,89	Q140H		0,84	T293G		1,00
L001E	75	0,55	Q140I		0,75	T293K	562	1,35
L001F		0,41	Q140K	343	0,93	T293L		1,00
L001G	76	0,62	Q140L		0,51	T293M	563	2,29
L001H	73	1,90	Q140M		0,80	T293P	564	1,64
L001K	77	1,39	Q140R		0,85	T293Q	565	1,83
L001N		0,87	Q140V		0,61	T293S		0,89
L001P		0,92	Q140W		0,59	T293V	566	2,15
L001Q	78	3,27	Q140Y		0,41	T293Y	567	1,49
L001R	79	0,72	N141A		1,12	V294M		0,41
L001S		0,74	N141D		1,09	A298G	568	0,43
L001T		0,99	N141E		0,67	A298I		0,41
L001V		1,00	N141F		0,81	G300R		0,42
L001W		0,88	N141G		1,15	I301A		0,88
N002A		0,61	N141H	344	2,03	I301V		0,88
N002C		0,4	N002I		0,37	V287N		0,35

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
G291C		0,27	G297A		0,57	V302W		0,46
N002G		0,44	N141L		0,61	V302I		0,45
N002L		0,46	N141M		0,48	I303V		0,47
N002P		0,54	N141Q		1,16	W304G		1,13
N002Q		0,84	N141R	345	1,40	W304I		1,17
N002S		0,78	N141S	346	0,72	G305D		1,00
N002T		1,05	N141T		0,45	G305E	569	1,62
N002V		0,65	N141V		0,50	T306D		0,76
F003E		0,42	N141W	347	0,83	T306E		0,52
F003H		0,68	N141Y	348	1,55	T306S		1,02
F003L		0,59	V142C		0,61	L307K		0,43
F003Y		0,50	V142D	349	0,71	L307N		0,76
R004A		0,73	V142E		0,87	L307Q		0,61
R004I		0,54	V142G	350	0,98	L307S		0,86
R004S		0,60	V142H		1,11	L307T		1,08
R004T		0,66	V142I		0,81	L307V		0,48
R004V		1,09	V142K	351	1,40	L307W		0,64
A005H		0,44	V142L		0,75	L307Y		0,60
P006A	80	0,78	V142M		0,76	S308D	571	0,92
P006H		0,58	V142N	352	0,98	S308G	572	1,73
P006K		0,80	V142P	353	0,88	S308H		1,15
P006L		0,76	V142Q	354	1,04	S308K	573	1,33
P006N		0,40	V142R	355	1,53	S308N	574	2,33
P006Q		0,89	V142S	356	0,93	S308P		0,65
P006R		0,56	V142T	357	1,19	S308R	575	1,34
P007M		0,57	Q143E		0,77	S308T		0,72
V008I		1,17	Q143G	358	0,62	I309D		0,72
V008L		0,53	Q143I		0,44	I309E	576	1,99
V008M	81	0,47	Q143K	359	1,30	I309G	577	1,44
V008P		0,33	I009Q		0,4	I303D		0,34
I009K		0,69	Q143L		0,56	I309H	578	1,30
I009L		1,08	Q143N		0,73	I309K		0,98
I009R		0,53	Q143V		0,57	I309L	579	1,72
I009S		0,98	L144T	361	1,02	I309M	580	1,47
I009V		0,84	L144W		0,79	I309N	581	3,11

ES 2 609 582 T3

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
P010D		0,62	S145A		0,58	I309Q	582	1,64
P010E		0,66	S145C		0,44	I309R	583	2,27
P010G	83	0,55	S145D		0,48	I309S	584	1,16
P010H	84	0,43	S145E		0,56	I309T	585	2,09
P010N		0,55	S145G		0,94	I309V	586	0,60
P010Q		0,89	S145H		0,56	I309W		0,88
P010R		0,73	S145L		0,44	M310A	587	1,50
P010S		0,55	S145M		0,56	M310G	588	2,73
P010W		0,59	S145N		0,58	M310Q	589	0,59
N011D		0,54	S145P		1,04	M310R		0,50
N011G		0,45	S145R		0,97	M310S	590	1,61
N011H		0,69	L146A		0,52	M310V		0,70
N011K		0,58	L146C		0,42	R311G		0,53
N011S	85	0,39	G305N		0,36	L307G	570	0,32
M310F		0,30	M310Y		0,38	R311G		0,54
V012A		0,56	L146E		0,50	R311H		0,48
V012E	86	1,86	L146G		0,62	R311K		0,72
V012I	87	0,68	L146H		0,78	R311Q		0,43
V012K	88	0,65	L146I		0,82	R311S		0,84
V012L		0,44	L146K		0,84	R311T		0,52
V012N		0,46	L146N		0,57	S312G		0,49
V012R		0,50	L146P	362	0,93	S312N		1,26
V012S		0,75	L146Q		0,84	S312T		0,75
V012T	89	1,50	L146R	363	1,47	M313A	591	1,34
P013H		0,46	L146S		0,71	M313E		0,63
P013S		0,68	L146T		0,74	M313G	592	0,56
P013T		0,90	L146V		0,84	M313H	593	1,23
P013Y		0,51	L146Y		0,80	M313K	594	2,85
F014D		0,64	S312K		0,38	S312L		0,38
F014I		0,42	T147A	364	1,20	M313L		1,05
F014M		0,47	T147C		0,47	M313P	595	1,11
F014V	90	0,46	T147D		0,71	M313R	596	2,30
L015A		0,65	T147F	365	1,24	M313S		0,88
L015M	92	0,45	T147G		1,05	M313T	597	0,67
L015V	91	2,20	T147I		0,85	M313V		0,99

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
A020S	93	0,50	T147L	366	1,30	M313Y	598	1,12
S022H		0,57	T147M		0,79	K314A		0,82
S022M		0,49	T147P		1,09	K314D		0,53
S022T	94	0,48	T147Q		1,29	K314H		1,10
S022Y		0,45	T147R	367	2,11	K314I		0,54
E023D		0,97	T147S	368	1,27	K314N		0,57
F024A		0,69	T147V	369	2,04	K314Q		0,62
F024E	95	3,99	T147W		0,97	K314R		0,95
F024G		0,75	T147Y		1,04	K314S	599	0,61
F024H	96	2,07	E148C		0,66	K314T		0,61
F024I		0,70	E148F		0,42	K314Y	600	0,45
F024K		0,96	E148G		1,05	S315A	601	0,85
F024L		0,62	E148H	370	1,24	S315E		0,41
F024M		0,85	E148I		0,73	S315G		0,72
F024N		0,60	E148K	371	1,63	S315H	602	2,04
F024R	97	1,22	E148L		0,85	S315K		0,62
F024T		1,18	E148Q	372	1,44	S315L		0,42
F024V		1,15	E148R		0,97	S315M		0,63
F024Y		0,90	E148S		1,15	S315R		1,04
L026A	98	1,30	E148T		0,82	S315T		0,97
L026E	99	3,22	E148V		0,99	S315Y	603	0,50
L026G		0,81	E148W		0,43	C316D		0,41
L026H		0,97	E148Y		0,95	L317A	604	1,27
L026I		0,51	A149C		1,15	L317D		0,61
L026K	100	1,88	A149G		0,52	L317H		1,05
L026M	101	1,43	A149K		0,51	L317I	605	1,76
L026P		0,55	A149L		0,88	L317K	606	5,11
L026Q	102	1,44	A149M		0,88	L317M		1,20
L026R	103	1,43	A149Q		1,15	L317N	607	0,73
L026S		0,78	A149R		1,02	L317Q	608	1,67
L026T		0,87	A149S		1,08	L317R	609	2,41
L026V		0,52	A149T	373	1,24	L317S	610	1,03
L026W		0,53	A149V	374	1,34	L317T	611	0,93
L026Y		0,52	T150A	375	1,21	L317W	612	0,84
G027A		0,79	T150C		0,70	L318D	614	0,46

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
G027D	104	1,22	T150D	376	1,24	L318F		0,51
G027E		1,18	T150E		1,05	L318G		0,49
G027F		0,61	T150F		0,71	L318H	615	0,45
G027H		1,11	T150G	377	2,19	L318I		0,70
G027I		0,41	T150I		0,52	L318K	616	1,36
G027K	105	2,71	T150L		0,70	L318M	613	1,68
G027L		0,76	T150N	378	0,91	L318N		0,52
G027P		0,46	T150P		0,88	L318Q		0,71
G027Q		1,12	T150R		0,90	L318R	617	1,34
G027R	106	1,88	T150S	379	0,92	L318S		0,71
G027S		0,94	T150W	380	1,25	L318T		0,63
G027T		0,61	T150Y	381	1,36	D320E		0,78
G027W		0,76	E151A	382	1,27	D320G		0,83
K028A		0,78	E151C		1,00	D320H	618	1,75
K028D		0,62	E151G		1,06	D320I		1,00
K028E		0,54	E151H	383	1,34	D320K	619	6,42
K028F		0,75	E151K	384	2,05	D320M		0,79
K028I		0,55	E151L	385	1,03	D320N		0,52
K028L		0,51	E151M	386	1,26	D320R	620	3,19
K028M		0,67	E151N		0,95	D320S		1,19
K028N		0,58	E151Q	387	2,01	D320W		0,40
K028P		0,40	D320L		0,37	D320V		0,35
K028R	107	0,71	E151R	388	1,61	D320Y		0,86
K028S		0,46	E151S	389	1,28	N321A		1,01
K028T		0,68	E151T	390	1,21	N321D		1,25
K028V		0,76	E151V	391	1,38	N321H		0,92
K028W		0,51	E151W	392	1,31	N321K		1,29
F029A		0,90	E151Y	393	1,31	N321R	621	1,23
F029E	108	4,03	K152A		0,51	N321S	622	1,26
F029G		1,05	K152C		0,52	N321T		0,64
F029H		0,82	K152F		0,61	N321Y		0,40
F029I	109	1,53	K152I		0,65	M323F		0,64
F029K	110	1,34	K152M		0,75	M323I		0,55
F029L	111	2,36	K152R	394	1,85	M323L		0,55
F029M	112	2,08	K152T	395	1,20	E324A		0,59

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
F029P	113	3,79	K152V		0,82	E324D		1,15
F029R	114	1,24	K152Y		0,67	E324H		0,79
F029S	115	2,21	A153I		0,93	E324M		0,50
F029T	116	0,85	A153L		0,51	E324N	623	1,01
F029V	117	1,65	K154R		0,86	E324R	624	2,28
F029W		0,48	K154T		0,83	E324S		0,62
D030A		1,12	K154V		0,46	T325A	625	1,87
D030F		0,84	Q155A		0,91	T325D	626	1,78
D030G	118	2,02	Q155C		0,60	T325E	627	4,03
D030H	119	1,69	Q155D	397	1,49	T325G	628	4,21
D030K	120	2,63	Q155F		0,70	T325H	629	3,45
D030L	121	1,32	Q155G	398	1,61	T325K	630	4,37
D030M	122	1,85	Q155H		1,03	T325M	631	2,11
D030P		1,19	Q155K	399	1,57	T325N	632	4,64
D030Q		0,84	Q155L		0,86	T325Q	633	5,08
D030R	123	1,82	Q155M		0,97	T325S	634	3,19
D030S	124	1,62	Q155R	400	1,27	T325V	635	1,24
D030T		0,57	Q155S		0,77	T325W		0,62
D030V		0,46	Q155T		0,76	I326K		0,95
D030W		0,62	Q155V		0,73	I326L	636	1,50
E031A	125	2,05	Q155W		0,91	I326V	637	6,29
E031C	126	2,95	E156A		0,79	I326Y		0,77
E031G	127	1,27	E156D	401	1,95	L327M		0,52
E031H	128	2,74	E156G		0,49	N328A		0,67
E031I	129	3,89	E156I		0,51	N328C	638	1,25
E031K	130	3,13	E156L		0,43	N328G	639	0,56
E031L	131	2,62	E156M		0,87	N328H		0,88
E031P	132	1,51	E156Q		0,84	N328I		1,85
E031R	133	2,27	E156R		0,43	N328K	640	2,12
E031S	134	1,70	E156S		0,62	N328L	641	2,01
E031T	135	3,96	E156T		0,69	N328Q		1,13
E031V	136	4,57	E156V		0,45	N328R		0,68
E031W	137	1,26	E156W		0,49	N328S	643	2,22
E031Y		1,13	F157W		0,61	N328T		0,59
P032A		0,92	E158A		0,56	N328V		1,16

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
P032C	138	0,40	E158F		0,51	N328Y	644	1,66
P032F	139	2,71	E158H		0,54	I331V		0,94
I326C		0,39	I326S		0,95	N328W		0,33
I331C		0,27	I331E		0,34	V334T		0,39
P032G	140	1,60	E158L		0,44	V334P		0,46
P032H	141	2,08	E158Q	402	1,25	T335S	645	0,47
P032K		1,04	E158S	403	0,95	A338Q		0,63
P032L		0,82	K159A		0,64	K339M		0,61
P032M		0,67	K159D		0,52	S342A		0,68
P032N		0,70	K159E		0,49	Q343T		0,49
P032Q		1,11	K159H		0,74	Q343V		0,51
P032R		1,17	K159L		0,62	Q347A	646	0,78
P032S		1,01	K159M		0,66	Q347E		0,78
P032T		0,77	K159N		0,73	Q347G	647	2,68
P032V		0,81	K159Q		0,92	Q347M		0,61
P032W		0,54	K159R		0,88	Q347R		0,55
P032Y		1,01	K159S		0,67	Q347S	648	2,38
L033G	143	0,57	K159V		0,41	E348D		0,67
L033M		0,69	A160C		0,61	E348G		0,55
L033P		0,87	A160F		0,79	E348S		0,44
L033Q		0,45	A160G		0,75	Q349A		0,47
L033R		0,61	A160H		0,47	Q349E		0,83
L033S		0,48	A160I		0,43	Q349K		0,93
L033T		0,45	A160K		0,91	Q349M	649	0,70
L033W	142	1,58	A160L		0,67	Q349N		0,44
D034A		0,38	M035Q		0,37	M035V		0,37
D034E		0,58	A160M		0,77	Q349R	650	0,73
D034H		0,41	A160N		0,56	Q349T		0,49
D034K		0,54	A160Q		0,65	V351A		1,14
D034Q		0,59	A160R		0,89	V351S	651	0,92
D034R		1,17	A160S	404	1,35	I353T		0,42
D034W	144	0,46	A160V		0,73	I353V	652	1,61
M035F		0,87	A160Y		1,07	N356A		0,41
M035H		0,60	G161A		0,99	N356D		0,79
M035L		0,52	G161C		0,44	N356H	653	0,82

ES 2 609 582 T3

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
M035T		0,83	G161D		0,86	N356S	654	0,46
M035Y		0,78	G161E		0,49	W357A		0,80
S036A		0,45	G161R		0,48	W357C		0,67
S036D		0,32	S036N	148	0,38	L037W		0,36
S036G		0,64	G161S		0,77	W357S		0,41
S036H	147	0,54	G161V		0,42	W357T		0,62
S036K		0,83	K162A		0,50	N358C		0,66
S036L		0,71	K162D		0,77	N358G		0,41
S036R		1,09	K162E	405	0,51	N358T		0,58
Q347L		0,39	V351C		0,35	V351I		0,36
V351Q		0,34	W357K		0,36	N358L		0,38
S036T		0,51	K162G		0,56	S359D		0,45
L037F	149	3,33	K162H		0,62	S359E	655	1,05
L037I		0,62	K162L		0,54	S359H	656	0,44
L037K		0,43	K162M		1,04	S359K		0,66
L037M	150	1,46	K162P		0,64	S359M		0,63
L037P		0,63	K162Q		0,58	S359T	657	2,11
L037R		0,51	K162R		0,52	S359V		0,65
L037V		0,57	K162S		0,47	S360T		0,50
F038Y	151	1,29	K162V		0,52	P367A	658	0,55
S039A	152	1,06	K162W		1,01	P367C		0,83
S039L	153	0,80	K162Y		0,72	P367G	659	0,47
S039N	154	2,32	D163A	406	1,52	P367K	660	0,57
S039Q		1,10	D163E	407	1,63	P367R		0,46
S039R		0,56	D163G		1,15	P367S	661	0,52
S039T	155	1,57	D163K	408	1,90	D368A	662	1,34
S039Y		0,56	D163L		1,18	D368E	663	1,28
F040L	156	0,92	D163Q	409	1,40	D368G		0,49
F040W		1,11	D163R	410	1,80	D368H		0,96
I041A		0,67	D163S	411	1,34	D368K	664	1,31
I041C		0,53	D163T		1,13	D368L	665	0,64
I041D		0,78	D163V		0,76	D368M	666	0,78
I041E		0,51	F164L		1,13	D368R	667	1,31
I041G		0,76	F164M	412	1,66	D368S		0,93
I041H		0,77	F164V	413	1,23	D368T	668	0,80

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
I041N		0,40	S043N		0,34	D361H		0,37
I041T	157	1,47	F164W		0,72	D368V		0,41
I041V		0,73	L165A		0,48	N369H	669	1,33
I041W		0,66	L165D	414	5,79	N369R	670	0,55
G042A		0,64	L165F	415	1,23	N369S		0,54
S043T		0,43	L165N	416	2,19	A371E		1,05
P044E		0,59	L165R		0,59	A371F	671	0,52
R045I		0,45	L165S	417	1,31	A371H	672	1,20
R045K		0,53	L165V	418	1,22	A371I		0,50
I046A		1,04	L165W		1,14	A371K	673	1,76
I046C		0,37	A371G		0,38	L374W		0,34
I046E		0,43	L165Y		0,66	A371L	674	0,57
I046F		0,73	V166A	419	2,85	A371M		0,57
I046H		0,82	V166C		1,16	A371R	675	1,51
I046L	158	1,08	V166E	420	1,28	A371S	676	1,45
I046M		1,00	V166F	421	1,67	A371V		0,94
I046N		0,66	V166G		1,11	Q373A		0,65
I046R	159	2,29	V166H	422	1,74	Q373E		0,81
I046S		0,64	V166L	423	4,38	Q373F		0,62
I046T		0,55	V166Q	424	3,61	Q373K		0,73
I046V		1,01	V166R	425	5,56	Q373L		0,84
I046Y		0,76	V166T	426	4,26	Q373M	677	1,43
N047A		0,48	V166W	427	1,26	Q373R		0,68
N047D	160	0,82	V166Y	428	2,08	Q373S		0,87
N047F	161	1,32	E167A		0,84	Q373V		1,05
N047G		0,82	E167D	429	0,69	L374A		0,60
N047H		1,16	E167G		0,60	L374H	678	1,42
N047K		0,67	E167H		0,89	L374I		0,80
N047M		0,77	E167K		0,91	L374M		1,11
N047Q		0,69	E167M		0,87	L374N		0,43
N047R		0,84	E167N		0,83	L374P	679	0,43
N047S		0,85	E167P		0,58	L374R		0,83
N047T	162	1,49	E167R		1,02	L374S		0,58
N047W	163	0,63	E167S		1,17	L374T		0,47
N047Y		0,45	E167T		0,59	L374V		0,56

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
A048F	164	2,51	E167Y		0,55	L374Y		0,66
A048G		0,83	T168H		0,46	E375A	680	0,42
A048H	165	1,99	I169L	430	2,08	E375G	681	0,90
A048I		0,64	I169R		0,54	E375K	682	1,49
A048K	166	1,28	I169V		0,74	E375L		0,46
A048M		0,76	K170N		0,72	E375M		0,54
A048N	167	4,25	K170R	431	2,58	E375N		0,81
A048Q		1,05	K170V		0,58	E375R	683	0,43
A048R		0,66	L171I		0,73	E375S		0,77
A048S		1,06	L171V		0,64	E375T		1,17
A048V		0,60	G172A	432	1,20	K376A		0,95
A048Y		0,81	G172C		1,03	K376D	684	0,78
T049I		0,42	K173N		0,44	K376E	685	0,88
T049K		0,85	K173R	433	0,82	K376M		0,46
T049R	168	1,41	L174A		1,20	K376Q	686	0,69
T049S		0,92	L174G	434	0,40	K376R	687	0,67
T049V		0,45	L174K	435	2,39	K376S		0,80
G050A		0,93	L174M		0,79	K376T	688	0,53
G050C		0,41	L174N	436	1,36	K376V	689	0,58
G050D	169	1,37	L174Q		0,99	K376Y	690	0,42
G050E		0,78	L174R	437	1,50	G377D	691	1,35
G050H		0,74	L174S		0,85	G377E	692	0,59
G050L		0,43	L174T	438	1,12	G377H	693	1,49
G050M	171	0,47	L174V		0,62	G377K	694	1,50
G050Q		0,86	L174W		0,78	G377P	695	2,30
G050R		0,86	L174Y		1,06	G377R	696	1,28
G050S	170	1,24	L175E		0,43	G377S	697	1,80
G050V		0,3	Q051A		0,34	Q051R		0,36
G050Y		0,58	L175H		0,57	G377T	698	3,83
Q051N		0,60	L175T	439	1,43	G378K		1,22
Q051S		0,46	L175V		0,94	G378N		0,64
G052N	172	0,89	L175Y		0,66	G378R		1,03
G052P		0,43	R176K		0,67	K379G		0,52
G052Q	173	3,71	N178G		0,85	K379H		0,57
G052R	174	0,53	N178K	440	0,85	K379R		0,74

ES 2 609 582 T3

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
G052S	175	1,32	N178M		0,88	K379S		0,46
E375I		0,36	K376L		0,37	K379T		0,4
F380V		0,39	F380T		0,39	M035Q	145	0,37
G052T	176	0,49	N178R	441	1,10	F380I		0,56
T054A		0,43	H179A		1,06	F380L		0,67
T054F		0,56	H179C		0,94	F380P		0,47
T054N		0,48	H179E		0,62	F380W	699	2,15
T054Q		0,91	H179G		0,86	F380Y	700	1,50
T054S		0,70	H179I		0,90	T381H		0,48
T054V		0,66	H179K	442	1,39	T381K		1,06
V058C	177	0,55	H179L		0,73	T381N		0,51
V058G		0,54	H179M		0,63	T381Q		0,84
V058H	183	1,09	H179N		0,96	T381R		0,87
V058I		0,57	H179P		0,44	T381S	701	0,87
V058K	178	4,08	H179R		0,96	T381V		0,89
V058L	179	1,54	H179S		0,51	R383A		0,51
V058N	184	0,49	H179T		0,43	R383E		0,51
V058P	180	0,90	H179V		0,42	R383H		0,71
V058Q	181	4,54	L180F		0,59	R383I	702	0,71
V058R	182	1,92	L180G		0,62	R383K	703	1,30
V058S		0,83	L180K		0,44	R383L	704	1,31
V058W		0,65	L180M		0,64	R383M		0,61
V058Y	185	1,07	W181M		0,88	R383N		0,77
D059Q		0,40	L061F		0,3	T381E		0,35
D059N	186	1,27	W181Q		0,88	R383S	705	0,87
R060K		0,69	G182L		0,90	R383T		0,98
L061I		0,42	Y183L		0,70	R383V		1,05
L061M		0,73	F186Y		0,59	K385A	706	1,12
L061V		0,59	H192S		0,49	K385G		0,62
Y063A		0,63	H192T		0,50	K385H		0,50
Y063H		1,07	H193G		0,68	K385N		0,41
Y063I		1,03	H193Q	443	0,82	K385Q	707	0,73
Y063K	187	1,36	H193S		0,42	K385R		0,94
Y063L	188	1,33	H193Y		0,58	K385S		1,05
Y063M	189	1,32	K195A		0,51	K385T		0,46

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
Y063N		0,96	K195G		0,45	K385V	708	0,43
Y063R	190	1,40	K195H		0,45	T387S		0,93
Y063S		1,00	K195I		0,50	L388F		0,92
Y063T		1,07	K195L		0,45	L388H		0,47
Y063V		0,43	K195N	445	0,74	L388I		0,98
Y063W	191	1,53	K195Q		0,71	L388M		0,79
P065R		0,57	K195R		0,85	L388R		0,60
Y066H		0,47	K195S		0,42	L388T		0,51
Y066R		0,51	K195T	444	0,58	L388V		0,78
I067F		1,00	K195W		0,49	L388W		0,77
I067L		0,45	K196E	446	0,43	L388Y		1,18
I067R		0,24	D068G		0,37	E392W		0,31
I067V	192	1,80	K196G		0,41	E389A	709	1,14
I067Y		0,55	K196L		0,65	E389G	710	0,91
D068E		0,72	K196R	447	0,58	E389H		1,17
D068H	193	2,06	K196S		0,68	E389K	712	1,91
D068K		1,08	K196T		1,18	E389L	711	0,65
D068L		0,43	K196W		0,55	E389M		0,60
D068P	194	0,50	P197A		0,81	E389P		0,75
D068Q	195	1,67	P197D		0,58	E389Q	713	0,69
D068R		0,70	P197E		0,52	E389R		0,94
D068S		0,81	P197F		0,48	E389S	714	1,08
D068T		0,75	P197G		0,75	E389T		0,70
S069A	196	22,06	P197H		0,62	E389Y		0,77
S069C	197	1,97	P197K		0,99	L391C		0,90
S069E	198	1,48	P197L		0,56	E392A	715	0,58
S069F	199	8,75	P197M		1,03	E392F	716	0,54
S069G	200	6,06	P197Q		0,69	E392G		1,00
S069I	201	3,12	P197R		0,58	E392K		0,66
S069L	202	3,44	P197S		0,70	E392L		0,80
S069M	203	2,67	P197T		0,41	E392M	717	1,54
S069P	204	8,14	G198A		0,80	E392Q	718	1,01
S069R	205	14,06	G198D	448	1,99	E392R	719	0,66
S069T	206	0,58	G198E		0,49	E392S		0,52
S069W	207	2,18	G198H		0,84	E392T		0,72

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
S069Y	208	2,71	G198L		0,48	E392V	720	1,27
I070A	209	27,00	G198N		0,80	E392Y		0,92
I070C	210	2,57	G198Q		0,55	Q393A		1,26
I070F	211	5,69	G198R		0,58	Q393D		0,45
I070G	212	6,22	G198S		0,76	Q393F	721	1,23
I070H	213	9,09	G198T		0,41	Q393H		1,05
I070K	214	14,64	G198Y		0,81	Q393K		0,80
I070L	215	3,05	N200D		0,46	Q393L		0,91
I070N	216	6,19	S202M		0,40	Q393M	722	0,80
I070P	217	3,03	F204P	449	0,63	Q393N		0,72
I070R	218	13,95	N205A	450	1,30	Q393R		0,74
I070S	219	3,63	N205D		0,85	Q393S		1,15
I070T	220	5,43	N205E	451	1,94	Q393T		0,41
I070V	221	6,34	N205F		0,52	F394L		0,56
I070Y	222	1,26	N205G		0,79	F394W		0,41
T071A		0,86	N205K		0,76	S395A	723	1,10
T071D		0,50	N205M		0,58	S395G		0,77
T071G	223	1,41	N205P		0,75	S395H	724	0,56
T071H		0,93	N205R		0,54	S395K		0,96
T071L		1,09	N205S		0,80	S395R	725	1,98
T071M		0,89	N205T	453	0,85	E396A	726	0,52
T071N	224	1,21	N205V		0,49	E396D		0,64
T071Q		0,68	N205W		0,41	E396H	727	0,47
T071R	225	2,17	V206H		0,50	E396Q	728	0,73
T071S	226	1,54	V206I	454	0,94	E396R		0,61
G072A		0,45	V206K	455	1,75	E396S	729	0,61
G072D		0,60	V206L	456	1,57	E396T		0,89
S395W		0,4	S395T		0,39	E396L		0,39
G072E		0,69	V206M		0,43	Y399A		1,01
G072H		0,46	V206R	457	1,30	Y399C		0,46
G072K	227	1,39	V206S		0,72	Y399E		1,49
G072L		0,43	G072Y		0,35	S407L		0,4
G072M	228	3,11	V206T		0,59	Y399K	730	1,94
G072Q	229	2,33	I208A		0,62	Y399M	731	2,70
G072R		0,65	I208C		0,48	Y399N		0,52

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
G072S		0,51	I208K		0,91	Y399Q		1,18
V073A	230	1,38	I208L		0,84	Y399R		1,20
V073C		0,84	I208M		0,88	Y399S		1,01
V073D		0,94	I208Q		0,77	Y399T	732	2,40
V073G		1,17	I208R		1,14	Y399V	733	1,44
V073H	231	1,54	I208S		0,62	Y399W	734	1,92
V073K	232	1,42	I208T		1,01	S401A	735	0,82
V073L	233	1,59	I208V		1,07	S401E	736	0,46
V073M		0,68	K209A		0,53	S401N		0,42
V073Q	234	0,96	K209E		0,46	Y403F		0,62
V073R	235	0,72	K209G		0,44	S404A	737	0,63
V073S		0,86	K209N		0,50	S404P		0,64
K297R		0,34	F398L		0,35	S401G		0,38
S401Q		0,39	S404T		0,37	T405F		0,36
V073T	236	1,34	K209R	458	0,68	T405A		0,56
V073W	237	1,91	K209S		0,50	T405G	738	2,32
T074A	238	2,28	K209T		0,50	T405K		0,74
T074C	239	2,18	D212N	459	1,52	T405M		0,48
T074E	240	1,38	D212S	460	0,93	T405P		0,64
T074F	241	1,43	D212T		0,76	T405Q		0,75
T074G	242	2,75	D213A	461	0,85	T405R		0,60
T074H	243	1,40	D213E		0,79	T405S		0,94
T074K	244	1,29	D213G		0,81	T405W		0,73
T074L	245	1,43	D213H		0,75	T405Y		0,44
T074M	246	0,52	D213K		0,82	L406A		0,70
T074N	247	2,12	D213L		0,56	L406C		0,98
T074P	248	2,45	D213M	462	1,56	L406E		0,73
T074R	249	2,22	D213N	463	1,53	L406F	739	1,42
T074S	250	1,80	D213Q		1,04	L406G		1,00
T074V	251	2,27	D213R		0,92	L406I		0,61
T074W	252	2,13	D213V		0,47	L406N	740	0,76
V075A		0,71	D213W		0,49	L406Q		0,93
V075C		0,46	D213Y		0,49	L406S		0,47
V075F	253	2,00	L214Q		0,57	L406T		0,83
V075H		0,62	S215A		0,74	L406V		0,87

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
V075L	254	5,22	S215D		0,62	L406Y		0,74
V075M	255	1,16	S215E		0,74	S407A	741	1,16
V075N		0,81	S215G		0,88	S407D	742	1,52
V075Q		1,51	S215H	464	0,91	S407E	743	1,38
V075R	256	3,02	S215K		0,99	S407F	744	1,42
V075S		0,76	S215L		0,60	S407G		0,75
V075T	257	4,34	S215M	465	1,77	S407H	745	1,34
V075Y		0,63	S215Q		0,79	S407M		0,74
G077H		0,32	G077K		0,32	K411H		0,33
I079L	258	1,44	S215R		0,71	S407N		0,72
I079T		0,79	S215T		0,80	S407P	747	0,94
I079V		1,01	S215V		0,69	S407Q	746	1,71
Q081P		0,60	S215W		0,52	S407R		1,04
K082A		0,94	W216Y		0,48	S407V		0,56
K082E		0,50	L217M		0,51	S407W		0,41
K082G		0,64	W218F		0,57	K409A	748	2,18
K082H		0,44	N219A	466	1,29	K409D		0,65
K082I		1,01	N219C		0,43	K409E		0,62
K082L	259	0,87	N219D		0,75	K409G		0,50
K082M		0,58	N219E		0,95	K409H		0,64
K082N	260	0,96	N219H		0,97	K409I		0,51
K082Q		0,76	N219I	467	0,60	K409P		0,48
K082R		0,85	N219K	468	1,45	K409Q	749	3,33
K082S		0,62	N219L		0,72	K409R		0,84
K082T		0,56	N219M		1,02	K409S		0,72
K082Y		0,32	I083H		0,4	I083K		0,30
K082V		0,57	N219R		1,10	K409T		0,63
I083F		0,57	N219S	469	2,48	K409V		0,48
I083G	264	1,05	N219T		0,82	A412Y		0,66
I083L		0,93	N219W		0,48	E410D		0,47
I083N		0,82	E220A		0,75	E410K		0,70
I083Q	262	1,07	E220H	470	1,40	E410M		0,42
I083R		0,45	E220I	471	1,34	E410N		0,67
I083S	263	0,79	E220L	472	1,45	E410P		0,73
I083T		0,95	E220S		0,62	E410Q		0,85

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
I083V	261	0,99	E220T		0,91	E410R		0,61
S084D		0,98	E220V	473	1,35	E410S		0,81
S084E	265	0,52	S221A		0,72	E410T	750	1,54
S084F	266	0,72	S221C		0,59	E410V		0,65
S084G	267	8,68	S221M		0,46	E410Y		0,62
S084H		0,96	S221Q	474	1,37	K411A		0,48
S084I		0,90	S221T		0,94	K411N		1,02
S084L		0,92	S221V		1,04	K411P		0,42
S084M		0,77	T222D		0,43	K411R		0,97
S084N	268	0,89	T222F		0,43	K411S		1,21
S084P		0,57	T222G	475	0,49	K411T		0,63
S084Q		0,86	T222K		0,75	K411V		0,99
S084R	269	1,89	T222L		0,64	A412D		0,74
S084T		0,82	T222N		0,80	A412G		0,80
S084W		0,86	T222R		0,75	A412I		0,81
S084Y		0,30	E220D		0,39	E220M		0,36
S221I		0,35	T222I		0,4	P226W		0,51
L085V		0,42	T222S		0,63	A412L		0,65
Q086A	270	2,70	T222V		0,79	A412N		0,86
Q086D		0,88	L224I		0,61	A412P		0,77
Q086E		1,18	L230I		0,87	A412R	752	0,66
Q086F		0,54	N231T		1,10	A412S		0,86
Q086G		1,02	T232F	476	0,73	A412V	753	0,53
Q086H	271	1,70	T232S		0,76	A412W		0,54
Q086I		0,65	Q233A		0,71	D413E		0,52
Q086K	272	0,97	Q233F		0,53	D413K		0,42
Q086L		0,92	Q233G	477	0,46	D413N		0,94
Q086M		1,06	Q233K	478	1,69	D413R		0,50
Q086N	273	1,28	Q233L		0,69	D413T		0,41
Q086P		0,42	Q233R	479	1,50	V414I		1,12
Q086R		0,93	Q233Y		0,50	V414M		0,53
Q086S	274	0,85	Q234M	480	1,65	K415G		0,40
Q086T	275	0,58	S235A	481	0,47	K415S		0,42
Q086V		0,97	S235E		1,00	K415W		0,42
Q086W	276	1,21	S235G		0,95	D416F		0,41

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
D087A		1,00	S235H		0,44	D416G		0,67
D087C	277	1,77	S235K		0,53	D416H		0,57
D087E		0,86	S235T		0,66	D416I		0,63
D087G	278	1,00	P236A		1,07	D416K		0,76
D087H		0,72	P236G		1,09	D416L	754	0,75
D087I		0,53	P236H		0,46	D416N		0,73
D087L	279	0,55	P236K		0,71	D416Q		0,83
D087M	280	0,58	P236R	482	3,09	D416R		0,46
D087P		0,31	Q234L		0,40	V237C	483	0,35
D087Q		1,05	P236S		0,91	D416T		0,85
D087R	281	1,28	V237A		0,90	D416V		0,59
D087S	282	0,99	V237E	484	1,93	D416Y		0,40
D087T	283	1,70	V237F		0,41	T417I		1,22
A412H		0,39	A412Q	751	0,35	D413A		0,38
D413H		0,31	A413Q		0,38	D413S		0,39
V414K		0,3	V414L		0,36	K415Y		0,39
K415V		0,39	D418G		0,45			
D087V	284	0,66	V237H	485	0,75	D418A		0,92
D087Y	285	2,72	V237L		1,12	D418E	755	1,31
L089C	286	1,46	V237N		0,67	D418F		0,81
L089R		0,34	L089W		0,26	L089P		0,38
L089K		0,45	V237Q	486	1,46	D418G		0,45
L089M		0,63	V237R		0,71	D418I		0,99
D090A	287	1,48	V237S		1,03	D418L	756	1,28
D090E	288	1,15	V237T	487	1,01	D418M		1,09
D090G		0,41	V237W		0,52	D418N		0,91
D090H	289	1,24	A238D		0,75	D418P	757	2,11
D090I		1,10	A238E	488	0,59	D418Q		1,05
D090K	290	1,36	A238H	489	0,60	D418R	758	1,18
D090L		1,15	A238K		0,60	D418S		0,78
D090N	291	1,18	A238Q		1,02	D418V	759	1,43
D090Q		1,11	A238R		0,49	D418Y		0,97
D090R	292	1,49	A238S	490	2,62	A419E		0,45
D090S		1,15	A238T		0,44	A419F	760	2,17
D090T		1,02	T240K		1,13	A419G		0,42

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
D090W		0,81	T240A	491	0,48	A419H	761	1,21
K091A		0,89	T240M		0,48	A419I	762	1,64
K091Q		0,43	T240P		0,56	A419K	763	1,88
K091R		0,67	T240Q	492	0,75	A419L		0,56
A092C	293	1,97	T240R		0,91	A419N		0,53
A092H		0,22	A239N		0,32	V421I		0,39
A092L	294	1,29	T240S		0,74	A419R	764	1,81
A092M		0,86	T240V		0,77	A419S	765	2,65
A092T		0,70	Y242F		1,08	A419W		0,69
A092V		1,09	N245H		0,50	A419Y	766	1,44
K093D		0,71	V247I	493	2,01	V420I		1,04
K093E		0,83	V247L		0,83	V420P		0,48
K093F		0,50	V247M		0,52	D421A	767	1,28
K093G		0,97	R248A	494	0,43	D421E		0,81
K093H		0,61	R248W		0,52	D421G		0,62
K093I	295	3,25	R248Y		0,67	D421H	768	1,98
R248H		0,4	I251Y		0,37	K255G		0,39
K093L	296	1,53	I251L		0,58	D421K	769	2,42
K093M		0,70	I251M		0,43	D421L		0,73
K093N		0,71	V253I		0,76	D421M		0,94
K093Q	297	0,84	K255A		0,40	D421N	770	1,89
K093R	298	1,52	K255N		0,52	D421Q	771	1,54
K093S	299	1,25	K255Q		0,91	D421R	772	2,21
K093T	300	3,93	K255R		0,71	D421S	773	2,12
K093V		0,24	K093P		0,38	K094C		0,33
K094A		0,64	K255S		0,43	D421T		0,80
K094D	301	0,93	I256A		0,42	D421Y		0,66
K094E		0,79	I256H		0,51	V422I		0,42
K094F		0,59	I256L		0,64	V422T		0,49
K094H		0,72	I256V		0,51	A425G	774	1,20
K094L		0,52	P257A		0,82	A425I		0,44
K094M		0,66	P257G	496	0,51	A425K	775	1,75
K094N		0,99	P257I		1,07	A425M		0,70
K094Q	302	1,22	P257K		0,92	A425N		0,46
K094R	303	3,94	P257L		0,69	A425R		0,49

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
K094S		0,94	P257M		0,90	A425S		0,47
K094T		1,14	P257N		0,69	D426E		0,62
I096D		0,69	P257Q		0,61	D426G		0,85
I096L		0,46	P257R	498	1,38	D426N		0,61
I096V		0,68	P257T	497	2,04	D426P		1,03
T097A	304	1,25	P257V		0,88	D426Q		0,42
T097C	305	0,53	D258H		0,84	D426Y		0,43
T097D	306	1,31	D258N	499	1,44	G427K		0,52
T097E	307	1,19	D258R		0,45	G427S		0,42
T097F		0,75	D258S	500	1,44	V428L	778	1,25
P257C		0,36	D258G		0,39	A425Y		0,39
D426K		0,26	D426S		0,36	G427T	777	0,35
G427H		0,35	G427I		0,54	G427Q	776	0,39
T097G	308	4,84	A259E		0,85	V428M		0,42
T097I		0,85	A259G		0,68	V428P		0,82
T097L	309	1,22	A259I		0,46	V428T		0,62
T097N		1,10	A259K		0,76	D431A	779	2,42
T097P		0,62	A259L		0,53	D431E	781	1,27
T097Q		1,17	A259N		0,49	D431G	780	0,55
T097R		0,95	A259P	501	1,54	D431H	782	3,13
T097S	310	1,21	A259Q		0,70	D431I		1,05
T097W		0,53	A259R		0,72	D431K	783	1,83
T097Y		0,74	A259S		0,63	D431L	784	0,62
F098A		0,60	A259T		0,51	D431N	785	1,30
F098C		0,58	A259V		0,41	D431Q	786	2,16
F098D		0,47	A259W		0,55	D431R	787	2,20
F098E		0,44	A259Y		0,51	D431S	788	1,91
F098H		1,06	K260A		0,66	D431V	789	1,52
F098I		0,52	K260D		0,41	D431W		0,56
F098L		0,58	K260E		0,58	D431Y		0,85
F098M		0,87	K260H		0,87	A432E		0,60
F098Q		0,65	K260L		0,60	A432G		0,52
P436C		0,39	E249V			A432H		0,34
F098R		0,72	K260M	502	0,85	A432N		0,51
F098S		0,56	K260Q		0,58	A432S		0,61

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
F098V		0,46	K260R		0,83	A432V		0,56
F098W		0,81	K260S		0,66	F433A	790	0,97
Y099A		0,33	K260G		0,37	R270T		0,40
Y099R		0,53	K260Y	503	1,73	F433C		0,69
Y099S		0,43	S261A	504	0,74	F433D		0,95
V102A		0,83	S261F		0,73	F433E		0,82
V102C		0,69	S261K	505	2,54	F433G		0,54
V102E		0,90	S261M		0,56	F433H	791	0,83
V102G		0,67	S261N	506	1,98	F433I	792	1,06
V102H		0,88	S261Q		0,76	F433K	793	1,36
V102K		1,03	S261R		1,19	F433L	794	1,87
V102L		0,71	S261T		0,66	F433P		0,95
V102M		0,77	S261V		0,48	F433R	795	1,63
V102N		1,02	S261W		0,44	F433S		0,86
V102Q		1,03	L263A		0,76	F433T	796	1,86
V102R		0,94	L263K	507	2,73	F433V	797	1,63
V102S	311	1,41	L263M		0,89	F433W	798	1,28
V102T	312	1,26	L263R	508	1,63	L434F		0,41
V102W		0,76	L263T		0,49	L434G		0,47
D103N		0,39	N104I		0,35	L263H		0,36
N104A		0,69	L263V		0,75	L434I		0,89
N104C		0,41	P264A		0,43	L434M		0,60
N104G		0,48	P264H		0,60	L434V		0,46
N104K		0,88	V265I		0,58	K435A		1,08
N104M		0,61	F266Y		0,58	K435C		0,53
N104R	313	1,25	A267M		0,45	K435E		0,78
N104S		1,03	A267T	509	1,34	K435G		0,64
N104T		0,71	T269A	510	1,63	K435H		1,05
L105A		0,54	T269C		0,75	K435R		1,01
L105G		0,51	T269D		0,76	K435S		1,03
L105I		0,94	T269S		1,01	K435T		0,73
L105P		0,84	R270M		0,46	K435V		0,44
L105Q		0,90	R270N		0,52	K435Y		0,50
L105R		0,65	R270S		0,69	P436D		1,19
L105S		0,61	I271F		0,72	P436E		0,74

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
L105T		0,51	I271G		1,29	P436G		1,19
L105W		0,34	L105C		0,33	L105H		0,36
L105V		0,99	I271L	511	10,62	P436H		0,72
G106V		0,43	V272E		0,39	V272M		0,31
M107F		0,91	I271M	512	3,24	P436I		0,84
M107I		0,67	I271S		0,42	P436K	799	2,05
M107L	314	1,32	I271V		1,05	P436L		0,63
A108G		0,47	V272D	513	1,36	P436M		0,61
I110V		0,51	V272R		0,74	P436Q		0,86
E114A	315	1,44	V272S		0,96	P436R		1,00
E114G		0,73	V272T	514	1,61	P436S		0,92
E114H		0,75	F273H	515	1,41	P436T		0,59
E114M		0,44	F273T		0,48	P436W		0,43
E114S		0,69	F273Y	516	0,90	P436Y		0,49
P117D		0,56	T274A		0,51	P437A		0,56
T118H		0,47	T274F	517	1,28	P437D		0,62
T118K		0,53	T274S		0,62	P437G		0,50
T118L		1,09	Q276C		0,88	P437H		1,11
T118M		0,53	Q276D	518	1,69	P437I	800	2,46
T118N		0,67	Q276E		1,05	P437K		0,83
T118Q	316	3,37	Q276H	519	1,20	P437L		0,51
T118V		0,79	Q276I		0,51	P437M	801	2,55
W119F		0,53	Q276L		0,48	P437Q		0,96
W119P		0,36	W119Q		0,72	D275L		0,24
W119Y		1,08	Q276M	520	1,14	P437R		0,85
A120D		0,76	Q276R	521	1,30	P437S		0,57
A120F	318	2,62	Q276S	522	1,63	P437Y		0,42
A120G		1,03	Q276Y	523	1,94	M438A	802	0,75
A120H	317	1,11	V277A	524	0,65	M438C		0,63
A120I	319	1,33	V277C		0,41	M438D	803	0,87
A120L		1,25	V277D		0,79	M438E	804	0,72
A120N		0,81	V277E	525	1,02	M438G		0,83
A120P		0,42	V277G		1,18	M438L	805	0,86
A120R		0,82	V277H	526	1,09	M438N	806	1,08
A120S	320	1,21	V277K	527	1,51	M438P		0,81

ES 2 609 582 T3

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
A120T		0,62	V277M	528	0,94	M438Q		0,85
A120V	321	1,53	V277N	529	1,15	M438R		0,99
A120W		0,59	V277Q	530	0,82	M438S		0,83
A120Y	322	1,95	V277R	531	1,63	M438T	807	3,99
N122M		0,56	V277S	532	0,83	M438V		0,85
K124L		0,34	K124H		0,35	P125A		0,36
K124R		0,62	V277T	533	1,94	M438W		0,57
P125H		0,43	V277Y		0,66	E439A	808	1,20
P125R		0,63	L278A		1,13	E439C	809	0,58
P125S		0,54	L278E	534	1,03	E439F		1,00
D127A		0,89	L278F	535	1,26	E439G		1,22
D127E	323	1,31	L278G	536	1,33	E439H		0,74
D127G		0,97	L278H	537	4,50	E439K	810	1,20
D127H	324	2,33	L278I		0,93	E439L		0,88
D127L		0,84	L278K	538	1,75	E439P	811	1,16
D127M		0,4	D275V		0,4	Q276G		0,36
D127N	325	1,69	L278N	539	1,74	E439Q	812	1,32
D127Q	326	1,21	L278R	540	5,87	E439S		1,02
D127R	327	0,51	L278S	541	1,67	E439T	813	1,15
D127S		0,77	L278T	542	1,66	E439V	814	1,57
D127T		1,11	L278V		0,44	E439W		0,62
D127V		0,56	L278Y	543	1,51	T440A		1,22
D127W		0,44	K279H	544	0,44	T440D	815	1,03
V128A		0,53	K279Q		0,84	T440E		1,00
V128C		0,68	K279R		1,10	T440F		0,85
V128G		0,49	K279T		0,86	T440G		0,86
V128I	328	1,25	F280G		0,47	T440H	816	3,00
V128K		1,16	F280Q		0,43	T440I		1,04
V128L		0,95	S282D		0,41	T440L		0,97
V128Q		0,55	S282G		0,54	T440M	817	1,08
V128R		0,74	S282M	545	2,64	T440P	818	0,88
V128S		0,53	S282Q		0,41	T440R	819	1,77
V128W		0,50	Q283E		0,63	T440S	820	1,17
K130I		0,50	Q283P		1,18	T440V		1,02
K130R	329	1,42	Q283R		0,59	T440Y		1,11

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
N131C		0,60	Q283S	546	1,73	E441A	821	1,47
N131E		0,44	Q283T		0,65	E441D		0,67
N131F		0,63	D284A		0,58	E441F	822	3,91
N131G	330	2,47	D284E		1,21	E441G		0,87
N131H		0,80	D284G		0,60	E441H		0,65
N131I	331	1,40	D284H		0,51	E441K		0,80
N131L		0,82	D284L		0,50	E441L		0,82
N131M	332	0,99	D284M		0,56	E441N		0,82
N131Q	333	1,24	D284N		0,40	E441Q		0,81
N131R	334	2,81	D284Q		0,95	E441S		0,79
N131S		0,76	D284S		0,99	E441T		0,66
N131T		1,02	E285F		0,47	E441V		0,54
N131V	335	2,08	E285G		0,52	E441Y		0,51
N131Y		0,85	E285H	547	1,30	E442C	823	1,38
R132A		0,68	E285M		0,43	E442G	824	0,51
R132C		0,58	E285N		0,40	E442H		0,76
R132E		0,70	E285Q		0,59	E442K		0,73
R132F		0,60	E285Y		0,99	E442P		0,91
R132H		0,66	L286S		0,46	E442Q		0,74
K279A		0,27	D284T		0,39	D284Y		0,37
E285A		0,34	L286R		0,53	L286W		0,38
R132I		0,56	V287I		0,51	E442R	825	3,94
R132K		1,05	V287T	548	0,50	E442T		0,61
R132L	337	0,76	Y288L		0,79	E442V		0,65
R132N	336	1,28	Y288W		0,49	E442Y		0,60
R132Q		0,69	T289K		0,75	P443A	826	1,63
R132S		0,79	T289S	549	0,48	P443E	827	1,07
R132T		0,61	F290I		0,41	P443F	828	0,70
R132V		0,73	F290M		1,03	P443G	829	1,12
R132Y		0,78	G291Q		0,80	P443H		1,08
S133I		0,54	G291R		0,45	P443L		1,19
I134L		1,04	G291S	550	0,41	P443M	830	1,99
I134T		0,60	G291V	551	1,63	P443N	831	1,25
I134V		1,08	E292A		0,66	P443Q		0,96
E135A		0,99	E292C	552	0,71	P443R		1,04

ES 2 609 582 T3

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
E135C		0,77	E292F	553	0,90	P443S		0,99
E135D	338	2,68	E292G		0,41	P443T		0,87
E135F		0,73	E292H	554	1,26	P443W		0,64
E442L		0,4	E442W		0,38	Q444M		0,37
E135G	339	2,79	E292K	555	1,27	Q444D		0,97
E135H		0,79	E292N		0,99	Q444E	832	1,19
E135K		1,15	E292P		1,05	Q444F		0,66
E135L		0,82	E292R	556	0,42	Q444G		0,93
E135N		0,56	E292V	557	1,28	Q444H	833	0,97
E135Q		1,59	E292W		0,83	Q444I		0,58
E135R	340	2,08	T293A	558	1,90	Q444K		1,03
E135S		1,13	T293C	559	1,67	Q444N		1,01
E135W		0,63	T293D	560	1,46	Q444R		0,85
E135Y		0,50	V137C		0,37	Q444V	834	1,12
L136A		0,73	V137S		0,36	Q444W		0,64
L136C		0,56	V137L		0,21	Q444Y		0,67
L136D		0,47	Q143C		0,28	I445A		0,97
L136F		0,96	L144R	360	0,26	I445G		0,98
L136H		1,00	K152W	396	0,37	I445H	835	1,35
L136I		0,65	A153S		0,34	I445L		1,06
L136M		1,05	K154I		0,38	I445M	836	1,57
L136N		0,48	E156C		0,35	I445N	837	1,24
L136Q		0,61	E158G		0,37	I445P	838	1,67
L136R		0,74	K159G		0,38	I445Q	839	1,26
L136S		0,80	A160W		0,39	I445R		1,08
L136T		0,72	G161V		0,42	I445S	840	1,21
L136W		1,11	D163W		0,38	I445T	841	1,38
V137A		0,48	D163F		0,39	I445V	842	1,25
V137I		1,01	L165C		0,27	I445W	843	0,69
V137T		0,51	V166N		0,47	I445Y		0,53
Q138A		0,69	E167F		0,31	F446A	844	1,58
Q138C		0,65	K170A		0,40	F446C		0,75
Q138H		0,71	K170Q		0,40	F446D		1,18
Q138I		0,54	K173Q		0,32	F446E		1,10
Q138L	341	0,59	L174H		0,38	F446G		1,12

TABLA 9: MUTANTES ACTIVOS

mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio	mutante	SEQ ID NO	Act. Norm Promedio
Q138M		0,68	R176L		0,40	F446H		1,28
Q138N		0,61	P177V		0,36	F446I		1,06
Q138R		0,53	L180I		0,38	F446K		0,94
Q138S		0,48	W181K		0,29	F446L		0,93
Q138W		0,41	Y183E		0,32	F446M	845	1,31
Q138Y		0,60	Y184W		0,39	F446Q		0,72
Q139A		0,92	H193R		0,33	F446R		0,89
Q139C		0,44	H193F		0,38	F446T		0,89
Q139D		0,48	K195V		0,36	F446V		0,91
Q139E		0,94	K196N		0,39	F446W	846	1,40
Q139F		0,53	K196Y		0,39	Y447D	847	3,25
Q139G		0,65	P197W		0,39	Y447E	848	1,36
Q139H		0,56	G198W		0,29	Y447F		1,41
Q139K		0,73	N200T		0,37	Y447G	849	0,92
Q139L		0,70	F204W		0,39	Y447I	850	1,36
Q139M		0,95	N205L	452	0,39	Y447L		1,09
Q139R		0,79	N205Y		0,4	Y447M		0,90
Q139S		0,81	V206Q		0,33	Y447N	851	1,58
Q139T	342	1,31	K209F		0,4	Y447P	852	1,46
Q139V		0,77	K209L		0,38	Y447Q	853	2,37
Q140A		0,96	N211L		0,41	Y447R		1,12
Q140C		0,50	N211W		0,51	Y447T	854	1,90
Q140D		0,59	W218M		0,38	Y447V	855	1,38
Q140F		0,66	W218V		0,28	Y447W		1,07

2. Mutantes inactivos

- 5 Los otros mutantes que mostraron menos de 20 % de actividad hialuronidasa de PH20 de tipo silvestre, en al menos uno de los duplicados, se volvieron a explorar para confirmar que los mutantes muertos estaban inactivos. Para confirmar los mutantes inactivos, el ensayo de actividad hialuronidasa descrito en el Ejemplo 3 se modificó para incorporar una etapa de incubación de muestra-sustrato a 37 °C durante una noche antes de la medición de la actividad enzimática. Se pretende que el ensayo modificado detecte actividades de PH20 por debajo de 0,2 U/ml.
- 10 La preparación de las placas recubiertas con bHA y el bloqueo de las placas antes de la adición de los sobrenadantes de variantes transfectadas o PH20 de tipo silvestre fue la misma que se ha descrito en el Ejemplo 3. El ensayo se modificó de la siguiente manera. En primer lugar, se diluyeron sobrenadantes de variantes transfectadas o PH20 de tipo silvestre que no contenía una mutación generada como se ha descrito en el Ejemplo 2 por duplicado 1:25 en diluyente de ensayo. Para la curva patrón, se realizaron diluciones en serie 1:3 de rHuPH20
- 15 (generada como se ha descrito en el Ejemplo 1) en diluyente de ensayo por duplicado comenzando desde 0,1 U/ml hasta 0,00014 U/ml. También se incluyó un pocillo en blanco. Después, se añadieron 100 µl de las muestras diluidas o patrón a pocillos predesignados de la placa recubierta con bHA y bloqueada y se dejó incubar a 37 °C durante una noche. Después de la incubación, las placas se lavaron y se detectó la unión a bHA como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3. La densidad óptica se midió a 450 nm dentro en un periodo de 30 minutos después
- 20 de la adición de la solución de terminación.

ES 2 609 582 T3

Los mutantes inactivos reconfirmados identificados se exponen en la Tabla 10. La Tabla expone el reemplazo de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de PH20 expuesta en SEQ ID NO: 3.

Tabla 10: Mutantes Inactivos							
N002H	R060V	R121W	C189P	P236I	V287N	L336W	G377V
N002K	R060Y	R121Y	C189R	P236L	V287P	L336Y	G378D
N002W	L061A	N122A	C189S	P236N	V287Q	A337C	G378E
N002Y	L061E	N122C	C189T	P236Q	V287R	A337F	G378F
F003A	L061F	N122E	C189V	P236T	V287S	A337G	G378I
F003G	L061G	N122F	C189W	P236Y	Y288D	A337I	G378L
F003K	L061H	N122I	C189Y	A238F	Y288E	A337K	G378M
F003P	L061N	N122K	Y190C	A238G	Y288F	A337L	G378Q
F003T	L061P	N122Q	Y190E	A238L	Y288G	A337M	G378T
F003V	L061Q	N122R	Y190F	A238P	Y288H	A337R	G378W
R004D	L061R	N122S	Y190G	A238V	Y288I	A337T	G378Y
R004E	L061T	N122T	Y190H	A238W	Y288K	A337W	K379A
R004F	L061W	N122V	Y190K	A238Y	Y288P	A338C	K379C
R004G	L061Y	W123A	Y190L	A239C	Y288R	A338D	K379E
R004L	G062A	W123C	Y190N	A239F	Y288T	A338E	K379F
R004P	G062C	W123D	Y190Q	A239G	T289A	A338F	K379I
R004W	G062D	W123E	Y190R	A239H	T289C	A338G	K379L
R004Y	G062F	W123H	Y190S	A239I	T289E	A338H	K379M
A005D	G062I	W123L	Y190T	A239L	T289G	A338I	K379W
A005G	G062K	W123M	Y190V	A239P	T289H	A338K	F380C
A005I	G062L	W123P	Y190W	A239R	T289L	A338L	F380D
A005L	G062M	W123Q	N191A	A239S	T289P	A338P	F380E
A005M	G062P	W123R	N191E	A239T	T289Q	A338R	F380G
A005N	G062Q	W123S	N191F	A239V	T289R	A338T	F380Q
A005P	G062R	W123T	N191G	A239W	T289S	A338V	F380R
A005Q	G062S	W123V	N191K	A239Y	T289Y	K339D	F380S

A005R	G062T	W123Y	N191L	T240E	F290D	K339E	T381G
A005T	G062V	K124C	N191M	T240F	F290Q	K339F	T381L
A005V	G062Y	K124D	N191P	T240G	F290Y	K339G	T381P
A005W	Y063C	K124E	N191Q	T240N	G291A	K339H	T381W
A005Y	Y063G	K124F	N191R	T240W	G291C	K339L	T381Y
P006E	Y063P	K124N	N191S	T240Y	G291D	K339N	V382E
P006F	Y064A	P125C	N191T	L241A	G291E	K339P	V382G
P006T	Y064C	P125D	N191V	L241C	G291F	K339S	V382H
P006V	Y064D	P125G	N191W	L241D	G291M	K339T	V382K
P006Y	Y064E	P125L	N191Y	L241E	G291N	K339V	V382L
P007C	Y064F	P125N	H192C	L241G	G291T	K339W	V382M
P007D	Y064G	P125W	H192F	L241I	G291W	K339Y	V382N
P007F	Y064H	K126F	H192G	L241P	G291Y	M340A	V382P
P007G	Y064I	K126H	H192K	L241R	E292I	M340C	V382Q
P007H	Y064K	K126I	H192L	L241S	E292L	M340D	V382R
P007I	Y064L	K126L	H192M	L241T	E292T	M340E	V382S
P007K	Y064P	K126N	H192N	L241V	T293E	M340F	V382T
P007L	Y064Q	K126P	H192P	L241W	T293N	M340G	V382W
P007Q	Y064R	K126Y	H192Q	Y242A	V294A	M340H	V382Y
P007R	Y064S	D127K	H192R	Y242C	V294E	M340K	R383G
P007S	Y064T	V128E	H192V	Y242D	V294G	M340P	R383P
P007T	Y064V	V128P	H192W	Y242G	V294H	M340R	G384C
P007W	Y064W	Y129A	H192Y	Y242I	V294K	M340S	G384F
P007Y	P065A	Y129C	H193A	Y242L	V294L	M340T	G384M
V008D	P065C	Y129D	H193D	Y242M	V294N	M340V	G384Q
V008E	P065D	Y129E	H193K	Y242P	V294P	M340W	G384S
V008G	P065G	Y129G	H193L	Y242R	V294Q	C341A	G384T
V008H	P065H	Y129H	H193M	Y242S	V294R	C341E	K385C
V008N	P065I	Y129L	H193P	Y242T	V294S	C341G	K385L
V008R	P065K	Y129P	H193V	Y242V	V294T	C341H	K385M
V008S	P065N	Y129Q	Y194A	Y242W	V294W	C341K	K385P
V008W	P065R	Y129S	Y194C	V243C	A295C	C341L	K385W
I009C	P065S	Y129T	Y194I	V243D	A295G	C341M	K385Y
I009D	P065T	Y129V	Y194L	V243F	A295H	C341N	P386A
I009E	P065V	Y129W	Y194P	V243G	A295I	C341Q	P386C
I009G	P065W	K130C	Y194S	V243H	A295L	C341R	P386F
I009N	P065Y	K130D	Y194T	V243L	A295N	C341S	P386G
I009P	Y066A	K130G	Y194V	V243M	A295P	C341T	P386H

Tabla 10: Mutantes Inactivos							
P010F	Y066C	K130H	K195S	V243P	A295T	C341V	P386I
P010I	Y066D	K130L	P197C	V243Q	A295V	C341Y	P386L
P010L	Y066E	K130N	G198V	V243R	A295Y	S342D	P386M
P010M	Y066G	K130S	G198W	V243S	L296C	S342E	P386N
P010Y	Y066I	K130T	Y199E	V243W	L296F	S342F	P386Q
N011A	Y066K	K130W	Y199G	V243Y	L296G	S342H	P386R
N011C	Y066L	K130Y	Y199H	R244A	L296I	S342K	P386S
N011F	Y066N	N131P	Y199I	R244D	L296K	S342L	P386T
NO11I	Y066P	R132P	Y199K	R244G	L296M	S342M	P386V
N011L	Y066S	S133D	Y199L	R244I	L296Q	S342P	P386Y
N011P	Y066T	S133E	Y199P	R244V	L296R	S342Q	T387C
N011T	Y066V	S133F	Y199R	R244Y	L296S	S342R	T387E
N011W	I067D	S133G	Y199S	N245A	L296T	S342T	T387F
N011Y	I067E	S133H	Y199W	N245C	L296V	S342Y	T387G
V012G	I067G	S133L	N200A	N245F	L296W	Q343C	T387H
V012H	I067P	S133M	N200F	N245L	L296Y	Q343D	T387I
V012W	I067R	S133N	N200G	N245P	G297C	Q343F	T387L
P013E	I067T	S133P	N200H	N245Q	G297E	Q343I	T387M
P013G	I067W	S133R	N200K	N245R	G297H	Q343P	T387N
P013I	D068A	S133T	N200L	N245S	G297L	Q343W	T387V
P013L	D068C	S133V	N200M	N245T	G297N	V344F	T387W
P013M	D068G	S133W	N200P	N245V	G297P	V344G	T387Y
P013V	D068I	I134A	N200Q	R246A	G297Q	V344H	L388C
F014A	D068L	I134C	N200R	R246C	G297R	V344L	L388G
F014E	D068P	I134D	N200S	R246D	G297S	V344M	L388P
F014G	D068V	I134F	N200W	R246E	G297T	V344N	L388Q
F014H	D068Y	I134G	N200Y	R246G	G297Y	V344P	L388S
F014K	S069N	I134H	G201A	R246H	A298C	V344Q	E389F
F014N	S069T	I134K	G201F	R246I	A298E	V344R	E389V
F014P	I070Q	I134P	G201L	R246K	A298L	V344S	D390A
F014Q	T071P	I134Q	G201M	R246L	A298M	V344T	D390C
F014W	G072C	I134R	G201N	R246M	A298N	V344W	D390E
L015E	G072F	I134S	G201P	R246P	A298P	V344Y	D390F
L015F	G072H	I134W	G201R	R246S	A298Q	L345A	D390G
L015G	G072I	E135P	G201S	R246T	A298S	L345C	D390H
L015K	G072P	L136P	G201T	R246V	A298T	L345E	D390L
L015N	G072V	V137F	G201V	R246W	A298W	L345H	D390N
L015P	G072W	V137G	G201W	V247A	A298Y	L345K	D390P

Tabla 10: Mutantes Inactivos							
L015Q	V073P	V137H	S202A	V247C	S299A	L345N	D390R
L015R	V075D	V137N	S202E	V247F	S299C	L345Q	D390S
L015S	V075G	V137P	S202F	V247H	S299D	L345R	D390T
L015Y	V075P	V137R	S202G	V247N	S299F	L345T	D390V
W016A	N076A	V137W	S202H	V247P	S299G	L345V	D390W
W016C	N076C	V137Y	S202K	V247Q	S299H	L345Y	D390Y
W016D	N076F	Q138V	S202N	V247R	S299L	C346A	L391A
W016E	N076G	Q139P	S202P	V247S	S299M	C346D	L391D
W016F	N076I	Q143C	S202Q	V247T	S299P	C346F	L391G
W016G	N076K	Q143H	S202R	V247W	S299Q	C346G	L391H
W016H	N076L	Q143P	S202V	V247Y	S299T	C346I	L391K
W016K	N076P	Q143R	S202W	R248C	G300A	C346K	L391N
W016M	N076Q	Q143S	S202Y	R248D	G300C	C346L	L391P
W016P	N076R	Q143T	C203A	R248E	G300D	C346M	L391Q
W016R	N076S	L144A	C203D	R248G	G300E	C346P	L391R
W016S	N076T	L144E	C203E	R248I	G300F	C346R	L391S
W016T	N076V	L144F	C203G	R248M	G300L	C346S	L391T
W016Y	N076W	L144I	C203H	R248P	G300M	C346T	L391V
A017D	G077D	L144K	C203L	R248T	G300N	C346V	L391W
A017E	G077E	L144P	C203M	E249A	G300P	C346W	L391Y
A017G	G077L	L144Q	C203N	E249G	G300Q	Q347C	E392C
A017H	G077P	L144S	C203Q	E249H	G300S	Q347F	E392P
A017I	G077Q	L144V	C203R	E249I	G300T	Q347I	Q393C
A017L	G077R	L144Y	C203S	E249K	G300V	Q347P	Q393P
A017N	G077T	S145T	C203T	E249M	G300W	Q347T	F394A
A017P	G077V	S145W	C203V	E249Q	I301E	Q347V	F394D
A017Q	G078A	A149E	F204A	E249S	I301G	Q347W	F394E
A017R	G078D	A149P	F204C	E249Y	I301H	E348C	F394G
A017S	G078I	T150V	F204E	A250C	I301K	E348H	F394I
A017T	G078M	K152L	F204G	A250F	I301M	E348I	F394K
A017V	G078P	A153E	F204H	A250G	I301N	E348L	F394N
A017W	G078T	A153F	F204I	A250H	I301P	E348P	F394P
A017Y	G078Y	A153M	F204K	A250K	I301Q	E348Q	F394Q
W018C	I079A	A153P	F204Q	A250L	I301R	E348R	F394R
W018D	I079D	A153R	F204R	A250M	I301S	E348T	F394S
W018F	I079F	A153T	F204S	A250N	I301W	E348V	F394T
W018G	I079G	A153V	F204T	A250P	I301Y	E348W	F394V
W018H	I079H	K154D	V206C	A250Q	V302C	E348Y	S395C

Tabla 10: Mutantes Inactivos							
W018I	I079K	K154E	V206D	A250R	V302D	Q349D	S395L
W018L	I079N	K154G	V206F	A250S	V302E	Q349F	S395M
W018M	I079P	K154P	V206G	A250T	V302F	Q349G	S395P
W018P	I079S	K154S	V206P	A250V	V302G	Q349P	E396C
W018Q	I079W	K154W	V206Y	A250W	V302H	Q349V	E396F
W018S	I079Y	K154Y	E207A	I251D	V302L	Q349W	E396G
W018T	P080A	Q155P	E207F	I251F	V302M	Q349Y	E396I
W018V	P080D	Q155Y	E207G	I251G	V302P	G350A	E396P
W018Y	P080E	E156P	E207M	I251H	V302R	G350D	E396Y
N019A	P080F	F157A	E207P	I251K	V302S	G350E	K397A
N019C	P080G	F157C	E207Q	I251P	V302T	G350F	K397C
N019F	P080I	F157D	E207R	I251S	V302Y	G350H	K397E
N019G	P080K	F157E	E207S	I251T	I303A	G350K	K397F
N019H	P080L	F157G	E207T	I251W	I303C	G350L	K397G
N019I	P080M	F157H	E207V	R252A	I303D	G350M	K397I
N019L	P080N	F157I	E207W	R252D	I303E	G350N	K397L
N019M	P080R	F157K	I208D	R252E	I303F	G350P	K397M
N019P	P080S	F157L	I208G	R252F	I303G	G350R	K397P
N019Q	P080T	F157M	I208P	R252G	I303K	G350S	K397Q
N019R	P080V	F157P	I208W	R252H	I303L	G350T	K397T
N019S	P080Y	F157Q	K209C	R252I	I303M	G350V	K397V
N019V	Q081A	F157R	K209P	R252K	I303R	G350Y	F398A
N019W	Q081C	F157S	R210A	R252L	I303W	V351C	F398C
N019Y	Q081E	F157T	R210C	R252N	I303Y	V351D	F398E
A020D	Q081G	F157V	R210D	R252P	W304A	V351E	F398G
A020E	Q081H	E158D	R210E	R252S	W304C	V351F	F398H
A020F	Q081L	E158K	R210G	R252T	W304D	V351H	F398I
A020H	Q081N	E158P	R210K	R252Y	W304G	V351N	F398L
A020K	Q081P	E158R	R210M	V253A	W304I	V351R	F398N
A020L	Q081S	E158Y	R210N	V253D	W304M	V351W	F398P
A020N	Q081V	K159W	R210P	V253E	W304N	V351Y	F398R
A020P	Q081W	K159Y	R210S	V253G	W304P	C352A	F398S
A020R	Q081Y	G161W	R210T	V253H	W304Q	C352D	F398T
A020T	K082W	D163C	R210V	V253L	W304S	C352E	F398V
A020V	K082Y	D163P	R210W	V253M	W304T	C352F	F398W
A020Y	I083E	F164A	R210Y	V253N	W304V	C352G	F398Y
P021A	I083K	F164C	N211C	V253Q	W304Y	C352K	Y399D
P021C	S084Y	F164D	N211F	V253R	G305L	C352M	Y399P

ES 2 609 582 T3

Tabla 10: Mutantes Inactivos							
P021D	L085A	F164E	N211G	V253S	G305P	C352P	C400A
P021E	L085C	F164G	N211H	V253W	G305Q	C352Q	C400D
P021G	L085D	F164H	N211I	S254C	G305R	C352R	C400E
P021H	L085E	F164N	N211K	S254D	G305S	C352S	C400F
P021I	L085F	F164P	N211M	S254E	G305T	C352T	C400G
P021L	L085G	F164Q	N211P	S254G	G305V	C352V	C400I
P021M	L085H	F164R	N211R	S254I	G305Y	C352W	C400L
P021R	L085N	L165C	N211S	S254K	T306A	C352Y	C400M
P021S	L085Q	L165H	N211T	S254L	T306C	I353C	C400P
P021T	L085S	L165P	N211V	S254P	T306H	I353F	C400Q
P021V	L085T	L165T	N211W	S254Q	T306I	I353G	C400R
P021W	Q086C	V166D	D212A	S254R	T306L	I353H	C400S
S022C	Q086P	E167V	D212G	S254T	T306V	I353K	C400T
S022E	D087P	T168A	D212H	S254V	T306W	I353L	C400V
S022G	H088A	T168C	D212I	S254W	T306Y	I353M	C400Y
S022K	H088C	T168D	D212K	S254Y	L307C	I353Q	S401C
S022P	H088E	T168E	D212L	K255C		I353R	S401F
E023A	H088F	T168F	D212M	K255D	L307I	I353S	S401H
E023F	H088G	T168G	D212P	K255L	L307P	I353W	S401K
E023L	H088I	T168K	D212V	K255P	S308C	R354C	S401R
E023M	H088K	T168L	D212W	K255V	S308F	R354D	S401W
E023N	H088L	T168P	D213P	K255W	S308L	R354E	S401Y
E023P	H088M	T168R	D213S	I256C	S308M	R354G	C402A
E023R	H088P	T168S	L214A	I256D	S308V	R354H	C402D
E023S	H088R	T168V	L214C	I256E	S308W	R354I	C402E
E023T	H088S	T168W	L214D	I256G	S308Y	R354K	C402F
E023V	H088T	T168Y	L214E	I256P	M310C	R354L	C402L
C025D	H088V	I169A	L214G	P257D	M310E	R354M	C402M
C025E	H088Y	I169D	L214H	D258L	M310F	R354P	C402P
C025F	L089A	I169F	L214K	D258P	M310K	R354Q	C402Q
C025G	L089D	I169G	L214N	D258V	M310L	R354S	C402R
C025H	L089E	I169H	L214P	D258W	R311C	R354V	C402S
C025I	L089G	I169K	L214R	K260C	R311E	R354W	C402T
C025K	L089Q	I169N	L214S	K260P	R311F	R354Y	C402V
C025L	L089S	I169P	L214T	S261P	R311I	K355D	C402W
C025N	L089T	I169Q	L214Y	P262A	R311L	K355F	C402Y
C025P	L089W	I169S	S215C	P262D	R311P	K355G	Y403A
C025R	L089Y	I169T	S215P	P262E	R311V	K355H	Y403C

Tabla 10: Mutantes Inactivos							
C025S	D090C	I169Y	W216D	P262F	R311W	K355L	Y403E
C025T	D090G	K170C	W216E	P262G	S312C	K355M	Y403G
C025V	K091D	K170D	W216G	P262H	S312E	K355N	Y403H
C025Y	K091E	K170E	W216H	P262I	S312M	K355P	Y403K
G027C	K091F	K170G	W216I	P262K	S312V	K355Q	Y403L
L033C	K091G	K170M	W216K	P262Q	S312W	K355R	Y403M
L033D	K091H	K170P	W216L	P262R	M313C	K355S	Y403N
L033H	K091I	K170W	W216M	P262S	K314C	K355T	Y403P
L033N	K091L	K170Y	W216N	P262T	K314L	K355V	Y403Q
L033V	K091N	L171C	W216P	P262V	K314W	K355W	Y403R
L033Y	K091T	L171D	W216Q	P262W	S315C	K355Y	Y403T
D034I	A092E	L171H	W216R	P262Y	S315I	N356C	S404C
D034L	A092F	L171M	W216T	L263E	S315V	N356G	S404D
D034N	A092H	L171N	W216V	L263F	C316E	N356K	S404F
D034S	A092K	L171R	L217A	L263P	C316G	N356L	S404G
D034T	A092P	L171S	L217C	L263Q	C316I	N356P	S404H
D034V	A092Q	L171W	L217G	L263W	C316K	N356R	S404L
M035A	A092R	L171Y	L217H	P264D	C316L	N356T	S404M
M035D	A092W	G172D	L217P	P264E	C316M	N356V	S404N
M035G	A092Y	G172E	L217Q	P264F	C316P	N356W	S404R
M035P	K094G	G172I	L217S	P264G	C316R	W357D	S404V
M035R	K094P	G172L	L217T	P264L	C316S	W357E	S404W
M035S	D095A	G172P	L217V	P264M	C316T	W357F	S404Y
S036C	D095C	G172Q	L217W	P264R	C316V	W357G	T405C
S036F	D095E	G172T	W218A	P264T	C316W	W357L	T405I
S036V	D095F	G172V	W218I	P264V	C316Y	W357M	T405V
S036W	D095G	G172W	W218K	P264W	L317G	W357Q	L406P
S036Y	D095H	G172Y	W218L	P264Y	L317P	W357R	L406R
L037C	D095K	K173D	W218P	V265A	L318C	N358E	C408A
L037E	D095L	K173E	W218S	V265D	L318P	N358H	C408E
L037G	D095M	K173G	W218V	V265F	L318W	N358I	C408F
L037N	D095P	K173H	N219P	V265G	L319C	N358K	C408G
L037S	D095Q	K173I	E220G	V265H	L319E	N358P	C408I
F038E	D095S	K173L	E220K	V265K	L319F	N358Q	C408K
F038G	D095V	K173M	E220N	V265L	L319G	N358R	C408L
F038K	D095W	K173P	E220P	V265M	L319H	N358W	C408P
F038L	D095Y	K173S	E220R	V265N	L319I	S359A	C408R
F038N	I096A	K173V	E220W	V265Q	L319K	S359F	C408S

F038Q	I096C	K173W	S221D	V265R	L319M	S359G	C408T
F038R	I096G	K173Y	S221E	V265S	L319P	S359L	C408V
F038T	I096H	L174P	S221H	F266A	L319Q	S359P	C408W
F038W	I096P	L175C	S221K	F266C	L319R	S359W	C408Y
S039C	I096R	L175D	S221P	F266G	L319S	S360A	E410W
S039D	I096S	L175G	S221R	F266H	L319V	S360C	K411D
S039F	I096T	L175K	T222P	F266M	L319W	S360E	K411E
S039W	I096W	L175P	T222Y	F266P	L319Y	S360F	K411F
F040A	F098P	L175R	A223C	F266Q	D320C	S360G	K411G
F040D	Y099C	L175S	A223D	F266R	D320P	S360I	A412E
F040E	Y099E	R176A	A223E	F266S	D320V	S360K	A412H
F040G	Y099G	R176C	A223G	F266T	N321E	S360L	D413H
F040K	Y099I	R176E	A223H	F266V	N321M	S360M	D413I
F040N	Y099N	R176F	A223K	F266W	N321P	S360P	D413K
F040R	Y099P	R176G	A223L	A267D	Y322C	S360Q	D413L
F040S	Y099V	R176H	A223P	A267G	Y322D	S360R	D413P
F040T	Y099W	R176I	A223Q	A267H	Y322E	S360V	V414A
F040V	M100C	R176P	A223R	A267I	Y322G	D361A	V414D
I041Q	M100E	R176Q	A223S	A267K	Y322I	D361C	V414E
G042D	M100F	R176S	A223T	A267N	Y322L	D361E	V414G
G042E	M100G	R176T	A223V	A267R	Y322N	D361G	V414H
G042H	M100N	R176V	A223W	A267S	Y322P	D361M	V414K
G042I	M100P	R176W	A223Y	A267W	Y322R	D361N	V414R
G042K	M100R	P177A	L224A	Y268A	Y322S	D361P	V414S
G042L	M100S	P177C	L224D	Y268C	Y322T	D361Q	V414T
G042M	M100T	P177D	L224E	Y268F	Y322V	D361R	K415C
G042P	M100W	P177F	L224F	Y268G	Y322W	D361S	K415D
G042Q	M100Y	P177G	L224G	Y268H	M323A	D361V	K415E
G042R	P101A	P177H	L224M	Y268K	M323C	D361W	K415P
G042S	P101C	P177L	L224P	Y268L	M323E	Y362A	D416C
G042T	P101F	P177M	L224Q	Y268N	M323G	Y362C	D416S
G042V	P101H	P177Q	L224R	Y268P	M323H	Y362E	T417A
S043A	P101I	P177R	L224S	Y268Q	M323K	Y362G	T417D
S043E	P101K	P177S	L224T	Y268S	M323N	Y362H	T417E
S043F	P101L	P177T	L224W	Y268T	M323R	Y362K	T417F
S043G	P101M	P177V	L224Y	Y268V	M323S	Y362L	T417G
S043I	P101N	P177W	Y225A	Y268W	M323T	Y362M	T417H
S043K	P101Q	N178E	Y225D	T269E	M323V	Y362N	T417K

Tabla 10: Mutantes Inactivos							
S043L	P101R	N178I	Y225E	T269K	E324C	Y362P	T417M
S043Q	P101S	N178L	Y225G	T269L	E324F	Y362R	T417P
S043R	P101T	N178V	Y225H	T269M	E324P	Y362S	T417Q
S043V	V102P	N178W	Y225K	T269N	E324V	Y362T	T417R
P044A	D103A	N178Y	Y225P	T269P	E324W	Y362V	A419D
P044C	D103E	H179W	Y225Q	T269Q	E324Y	Y362W	A419P
P044F	D103F	L180A	Y225R	T269R	T325C	L363A	V420A
P044G	D103G	L180C	Y225T	R270A	T325R	L363C	V420D
P044H	D103H	L180E	Y225V	R270C	I326E	L363D	V420F
P044I	D103I	L180P	Y225W	R270E	I326G	L363E	V420G
P044L	D103L	L180R	P226A	R270F	I326H	L363F	V420H
P044N	D103Q	L180S	P226C	R270G	I326N	L363G	V420K
P044Q	D103R	W181A	P226D	R270H	I326W	L363H	V420L
P044R	D103T	W181C	P226E	R270I	L327A	L363I	V420N
P044S	D103V	W181D	P226F	R270P	L327E	L363P	V420R
P044T	D103W	W181E	P226G	R270Y	L327F	L363Q	V420S
P044W	D103Y	W181F	P226L	I271A	L327G	L363R	V420T
P044Y	N104F	W181H	P226N	I271D	L327H	L363S	V420W
R045A	N104P	W181I	P226Q	I271E	L327N	L363T	V420Y
R045D	N104W	W181K	P226R	I271H	L327Q	L363V	V422C
R045F	L105C	W181L	P226S	I271K	L327R	L363W	V422D
R045G	L105M	W181R	P226T	I271T	L327S	H364A	V422G
R045P	L105N	W181S	P226V	I271W	L327T	H364C	V422H
R045W	G106A	W181V	P226W	V272A	L327V	H364D	V422L
I046P	G106C	G182A	P226Y	V272H	L327W	H364E	V422M
I046W	G106D	G182C	S227A	V272L	L327Y	H364F	V422N
N047V	G106F	G182D	S227F	V272N	P329C	H364G	V422Q
A048P	G106H	G182E	S227G	V272P	P329F	H364K	V422R
T049C	G106L	G182H	S227H	V272W	P329G	H364L	V422S
T049D	G106M	G182N	S227I	F273A	P329H	H364M	V422Y
T049G	G106N	G182P	S227K	F273C	P329I	H364P	C423A
T049H	G106P	G182Q	S227L	F273D	P329K	H364R	C423D
T049P	G106S	G182R	S227M	F273G	P329L	H364S	C423E
	G106W	G182S	S227P	F273I	P329N	H364T	C423F
Q051C	G106Y	G182T	S227Q	F273L	P329Q	H364V	C423G
Q051F	M107A	G182V	S227R	F273P	P329R	H364Y	C423H
Q051I	M107C	G182Y	S227T	F273Q	P329S	L365A	C423L
Q051M	M107H	Y183C	S227V	F273S	P329T	L365C	C423M

Q051P	M107K	Y183D	S227W	F273V	P329V	L365D	C423P
Q051T	M107P	Y183E	S227Y	F273W	P329W	L365E	C423Q
Q051W	M107Q	Y183G	I228A	T274C	P329Y	L365G	C423R
Q051Y	M107S	Y183I	I228E	T274E	Y330A	L365M	C423S
G052C	M107V	Y183K	I228F	T274G	Y330C	L365N	C423T
G052E	M107W	Y183N	I228G	T274H	Y330D	L365P	C423V
G052F	A108D	Y183P	I228H	T274N	Y330E	L365Q	C423W
G052W	A108E	Y183Q	I228L	T274Q	Y330G	L365R	I424A
G052Y	A108F	Y183R	I228M	T274W	Y330I	L365S	I424C
V053A	A108K	Y183S	I228N	T274Y	Y330L	L365T	I424E
V053C	A108L	Y183V	I228P	D275A	Y330M	L365W	I424G
V053D	A108M	Y184A	I228R	D275F	Y330N	L365Y	I424H
V053E	A108P	Y184C	I228S	D275G	Y330P	N366A	I424N
V053G	A108Q	Y184D	I228T	D275I	Y330R	N366C	I424Q
V053H	A108T	Y184E	I228W	D275K	Y330S	N366E	I424R
V053L	A108V	Y184F	Y229E	D275L	Y330V	N366F	I424S
V053N	A108Y	Y184G	Y229F	D275M	Y330W	N366G	I424W
V053P	V109C	Y184H	Y229G	D275Q	I331A	N366K	I424Y
V053Q	V109D	Y184K	Y229K	D275T	I331C	N366M	A425E
V053R	V109E	Y184L	Y229L	D275V	I331D	N366P	A425L
V053S	V109L	Y184M	Y229P	D275W	I331E	N366Q	A425P
V053T	V109M	Y184P	Y229Q	Q276F	I331F	N366R	A425W
V053W	V109R	Y184R	Y229T	Q276P	I331H	N366T	A425Y
V053Y	V109T	Y184S	Y229V	Q276W	I331K	N366W	D426C
T054D	V109W	Y184V	Y229W	L278M	I331Q	P367E	D426F
T054E	I110F	L185A	L230A	L278P	I331R	P367F	D426M
T054G	I110K	L185D	L230E	K279A	I331S	P367I	D426R
T054P	I110L	L185E	L230G	K279C	I331T	P367L	G427A
T054R	I110M	L185F	L230H	K279F	I331W	P367M	G427C
T054Y	I110P	L185G	L230K	K279G	I331Y	P367Q	G427F
I055A	I110W	L185I	L230M	K279L	I332A	P367V	G427L
I055D	D111H	L185K	L230N	K279W	I332C	D368C	G427P
I055G	D111I	L185P	L230P	K279Y	I332D	D368P	
I055H	D111Q	L185R	L230R	F280D	I332E	D368W	G427V
I055N	W112C	L185S	L230S	F280I	I332F	N369C	G427W
I055P	W112E	L185T	L230T	F280L	I332G	N369E	G427Y
I055Q	W112G	L185V	L230V	F280M	I332H	N369F	V428A
I055R	W112H	L185W	L230W	F280N	I332K	N369I	V428C

I055T	W112L	L185Y	L230Y	F280R	I332L	N369K	V428D
I055V	W112N	F186A	N231A	F280S	I332N	N369L	V428E
I055Y	W112P	F186D	N231C	F280T	I332P	N369P	V428G
F056A	W112S	F186G	N231D	F280V	I332R	N369Q	V428H
F056C	E113R	F186H	N231F	F280W	I332S	N369V	V428N
F056E	E113V	F186I	N231G	L281A	I332T	N369W	V428R
F056G	E114I	F186K	N231H	L281D	I332Y	F370A	V428S
F056H	E114L	F186L	N231I	L281G	N333G	F370D	V428Y
F056I	E114P	F186N	N231K	L281H	N333H	F370E	C429A
F056K	E114T	F186P	N231L	L281I	N333I	F370G	C429D
F056L	E114V	F186Q	N231P	L281K	N333K	F370H	C429K
F056P	W115A	F186R	N231Q	L281N	N333P	F370K	C429L
F056R	W115C	F186S	N231R	L281P	N333R	F370L	C429N
F056S	W115D	F186V	N231S	L281Q	N333S	F370N	C429P
F056T	W115F	F186W	N231V	L281R	N333T	F370P	C429S
F056V	W115G	P187A	T232C	L281S	N333W	F370Q	C429T
F056W	W115H	P187F	T232G	L281V	N333Y	F370R	C429V
Y057A	W115I	P187G	T232H	L281W	V334A	F370S	C429W
Y057D	W115K	P187H	T232K	S282F	V334C	F370V	C429Y
Y057F	W115L	P187I	T232L	S282L	V334D	F370Y	I430A
Y057G	W115M	P187L	T232N	S282V	V334E	A371P	I430D
Y057I	W115R	P187M	T232P	S282W	V334G	A371W	I430E
Y057L	W115S	P187N	T232Q	S282Y	V334M	I372A	I430L
Y057M	W115V	P187Q	T232V	Q283A	V334N	I372D	I430M
Y057P	W115Y	P187R	T232Y	Q283C	V334R	I372E	I430N
Y057Q	R116A	P187S	Q233D	Q283D	V334S	I372F	I430S
Y057R	R116C	P187T	Q233I	Q283F	T335F	I372G	I430T
Y057V	R116D	P187V	Q233P	Q283W	T335G	I372H	I430V
Y057W	R116E	P187W	Q233S	D284C	T335H	I372K	D431P
V058A	R116G	P187Y	Q233T	D284I	T335I	I372L	A432C
D059A	R116H	D188A	Q234A	D284P	T335K	I372N	A432F
D059E	R116I	D188C	Q234D	E285K	T335L	I372P	A432I
D059I	R116L	D188F	Q234E	E285P	T335P	I372R	A432K
D059L	R116N	D188G	Q234G	E285R	T335V	I372S	A432L
D059M	R116P	D188H	Q234H	E285T	T335W	I372T	A432M
D059P	R116Q	D188L	Q234N	E285V	T335Y	I372V	A432P
D059R	R116S	D188M	Q234P	L286A	L336A	I372W	A432Y
D059T	R116V	D188N	Q234S	L286C	L336E	Q373C	L434H

D059V	R116W	D188P	Q234T	L286D	L336F	Q373P	L434K
D059W	P117D	D188Q	Q234V	L286F	L336G	Q373W	L434P
D059Y	P117G	D188R	Q234W	L286H	L336K	L374D	L434Q
R060A	P117I	D188S	S235F	L286K	L336N	L374E	L434R
R060D	P117K	D188T	S235L	L286M	L336P	E375C	L434W
R060F	P117N	D188V	S235M	L286P	L336R	E375F	P437T
R060G	P117Q	D188W	S235R	L286T	L336S	E375P	M438Y
R060H	P117R	C189A	S235W	L286Y	L336T	E375V	E439N
R060I	P117S	C189E	S235Y	V287A	L336V	E375Y	E439R
R060L	P117V	C189G	P236C	V287C	R121G	K376I	T440Q
R060N	P117W	C189H	W119L	V287D	R121H	K376P	E441R
R060P	T118C	C189K	W119N	V287E	R121K	K376W	E442M
R060Q	T118D	C189L	W119P	V287G	R121L	G377C	E442N
R060S	T118E	C189M	W119R	V287K	R121M	G377I	E442S
R060T	T118G	C189N	R121A	V287L	R121P	G377L	P443D
T118R	T118P	T118W	R121C	R121F	G378D	G377V	G378E
T118Y	W119I	W119A	W119K	R121E	G378F	G378I	

Ejemplo 5

5 ENSAYO CON RESPECTO A ACTIVIDAD HIALURONIDASA EN CONDICIONES DE TEMPERATURA Y FENÓFILAS

Se ensayaron sobrenadantes de variantes de actividad de PH20 expuestos en la Tabla 9, como se ha identificado en el Ejemplo 4, con respecto a estabilidad en condiciones termófilas y/o fenófilas. El ensayo para medir la actividad hialuronidasa en condiciones de temperatura y fenófilas usando HA biotinilado (bHA) como sustrato para medir la actividad hialuronidasa se modificó a partir del ensayo original descrito en el Ejemplo 3 porque incorporó una incubación a 37 °C durante 4 horas de muestras con o sin m-cresol antes de la medición de la actividad enzimática. El ensayo se usó para identificar mutantes de PH20 con propiedades termófilas (actividad mayor a la condición de 37 °C que a 4 °C) y/o con propiedades fenófilas (mayor actividad en presencia de m-cresol que PH20 de tipo silvestre).

1. Exploración primaria

Antes de incubar muestras con bHA, se diluyeron muestras de PH20 variantes en pocillos designados de una placa 4XHB no recubierta para preincubación a 37 °C durante 4 horas en las siguientes condiciones: 1) preincubación a 37 °C con m-cresol 0,4 %; y 2) preincubación a 37 °C sin m-cresol 0,4 %. Para la preincubación a 37 °C con m-cresol 0,4 %, se preparó una reserva de intermedio de m-cresol 1 % a partir de una solución de reserva de m-cresol 50 % (v/v). Brevemente, en un vial de vidrio Wheaton de 2 ml se preparó una reserva al 50 % de m-cresol (Fluka, Catálogo n.º 65996; Spectrum, Catálogo n.º C2773) en metanol basándose en la densidad ($D = 1,034 \text{ g/l}$). El vial se selló y se almacenó a -20 °C con protección de la luz en alícuotas pequeñas. Después, se generó la reserva de intermedio 1 % por dilución en tampón de ensayo HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl_2 1 mM, BSA 1 mg/ml, pH 7,4, Tween-20 0,05 %) diariamente inmediatamente antes de su uso en una campana extractora con agitación vortical.

Después, los duplicados de muestras de sobrenadante variantes transfectadas expuestas en la Tabla 9, generadas como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2, se sometieron cada una por separado a una dilución 1:2,5 de m-cresol 1 % y tampón de ensayo de HEPES/sobrenadante transfectado para obtener una concentración final de 0,4 % de m-cresol. Para la preincubación a 37 °C sin m-cresol 0,4 %, se sometieron muestras de sobrenadantes variantes transfectadas a dilución 1:2,5 en tampón de ensayo HEPES/sobrenadante transfectado. Además, para cada condición, también se ensayó un control de destrucción interna añadiendo 3 U/ml de rHuPH20 en tampón HEPES pH 7,4 (generado como se ha descrito en el Ejemplo 1) que se diluyó igual que se ha descrito anteriormente para las

muestras transfectadas. Las placas se sellaron con sellantes de placas y se incubaron a 37 °C durante 4 horas.

La preparación de las placas recubiertas con bHA y el bloqueo de las placas antes de la adición de los sobrenadantes variantes transfectados o PH20 de tipo silvestre fue igual que se ha descrito en el Ejemplo 3. El ensayo se modificó adicionalmente de la siguiente manera. En primer lugar, se diluyeron muestras por duplicado 1:10 en tampón de ensayo HEPES en placas 4XHB. Para cada variante, las muestras que se ensayaron eran 1) sobrenadante variante transfectado no preincubado (sin incubación; 4 °C); 2) sobrenadantes variantes transfectados preincubados a 37 °C durante 4 horas con m-cresol 0,4 % (Cresol); o 3) sobrenadante variante transfectado preincubado a 37 °C durante 4 horas sin m-cresol 0,4 % (sin cresol, 37 °C). Además, también se ensayaron las muestras con adiciones. Se preparó una curva patrón que usaba rHuPH20 como se ha descrito en el Ejemplo 3 sin m-cresol. Se transfirieron cien microlitros (100 µl) de cada patrón y muestra a pocillos predesignados de la placa recubierta con bHA y bloqueada y se incubaron durante aproximadamente 1,5 horas a 37 °C. Por lo tanto, cada muestra de cada variante se ensayó por cuadruplicado debido a la preincubación de muestras duplicadas de cada sobrenadante variante transfectado en la etapa de preincubación y el duplicado adicional de cada muestra en el ensayo de bHA.

Después de la incubación, las placas se lavaron y se unieron con bHA detectado como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3. La densidad óptica se midió a 450 nm en un periodo de 30 minutos desde la adición de la solución de terminación.

La actividad U/ml se calculó a partir de la curva patrón y se comparó. Los resultados se representaron como el porcentaje (%) de actividad restante con cada uno de los siguientes parámetros: relación de actividad en 1) preincubación a 37 °C sin m-cresol/4 °C; 2) 37 °C después de preincubación con m-cresol/4 °C; y 3) 37 °C después de preincubación con m-cresol/después de preincubación a 37 °C sin m-cresol. Se identificaron los aciertos de fenófilos iniciales para reconfirmación como los que en un ensayo por duplicado mostraron un porcentaje de actividad restante en la condición 3) de $\geq 20\%$ de la actividad original a 37 °C

Los aciertos iniciales se volvieron a explorar usando un ensayo de reexploración en placas de 6 pocillos. Para la reexploración, el ADN plasmídico correspondiente al acierto potencial se transformó en bacterias *E. coli* y se preparó ADN plasmídico y se purificó usando MaxiPrep según las instrucciones de los fabricantes. Se confirmó la secuencia de ADN.

El ADN plasmídico se transfectó en células CHO-S en monocapa (Invitrogen, Cat. n.º 11619-012) cultivadas en placas de 6 pocillos a una densidad de aproximadamente 50-80 % de confluencia usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cat. n.º 11668-027) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Se realizaron transfecciones por duplicado. Las células se incubaron a 37 °C en un incubador de CO₂ durante 96 horas después de la transfección antes de recoger el sobrenadante para el ensayo. Como controles, las células también se transfectaron con el vector de expresión HSA24-PH20(OHO)-SEAP-SEAP (SEQ ID NO: 4) que contiene una secuencia de PH20 de tipo silvestre con codones optimizados (OHO). También se incluyeron como controles células de simulación.

Noventa y seis (96) horas después de la transfección, se recogió sobrenadante de cada muestra, incluyendo los controles de OHO y simulación, y se ensayó con respecto a actividad hialuronidasa en diversas condiciones como se ha descrito anteriormente: 1) sobrenadante variante transfectado no preincubado (sin incubación; 4 °C); 2) sobrenadantes variantes transfectados preincubados a 37 °C durante 4 horas con m-cresol 0,4 % (Cresol; 37 °C); o 3) sobrenadante variante transfectado preincubado a 37 °C durante 4 horas sin m-cresol 0,4 % (sin cresol; 37 °C). Se determinó la actividad hialuronidasa como se ha descrito anteriormente usando el ensayo de bHA.

Los resultados se evaluaron como se ha descrito anteriormente. Se generó actividad hialuronidasa absoluta (U/ml) a partir de la curva patrón. Además, se determinó el porcentaje de actividad como una relación de la actividad a 37 °C/4 °C, 37 °C más m-cresol/4 °C, y 37 °C más m-cresol/37 °C. Los resultados se exponen en las Tablas 11 y 12 a continuación.

Mutante	Sin incubación (4 °C)		37 °C sin cresol (37 °C)		37 °C con m-cresol (37 °C más m-cresol)	
L001A	2,993	2,511	3,529	3,214	0,287	0,295
L001E	2,669	2,539	2,862	3,179	0,376	0,341
L001G	0,348	0,583	0,596	0,676	0,055	0,031
L001Q	5,135	6,443	6,133	5,719	0,621	0,636
L001R	5,603	4,390	6,576	7,042	0,458	0,396

TABLA 11: actividad hialuronidasa absoluta

Mutante	Sin incubación (4 °C)		37 °C sin cresol (37 °C)		37 °C con m-cresol (37 °C más m-cresol)	
P006A	2,965	3,208	4,088	3,495	0,404	0,435
V008M	1,376	1,401	1,856	1,678	0,000	0,008
I009Q	0,447	0,381	0,469	0,476	0,031	0,030
P010G	0,747	0,564	0,820	0,688	0,123	0,114
P010H	0,473	0,485	0,624	0,548	0,000	0,000
N011S	0,862	0,962	1,313	1,263	0,094	0,064
V012E	11,019	5,519	5,312	5,528	0,753	0,934
V012I	2,804	3,844	3,610	6,566	0,106	0,090
V012K	1,691	1,963	2,479	2,243	0,330	0,321
F014V	0,144	0,165	0,222	0,242	0,003	0,000
L015M	0,902	1,073	1,026	0,901	0,017	0,017
A020S	1,494	2,205	2,822	2,620	0,413	0,397
S022T	3,035	3,788	3,375	3,273	0,684	0,748
L026M	1,482	1,226	2,027	1,704	0,224	0,178
K028R	0,944	0,845	1,043	0,925	0,112	0,095
F029R	1,195	1,511	1,848	1,839	0,140	0,140
F029S	3,019	3,615	3,566	3,521	0,250	0,283
F029T	1,451	1,712	1,839	2,065	0,220	0,212
P032C	0,370	0,419	0,476	0,534	0,006	0,040
L033G	0,566	0,700	0,686	0,627	0,001	0,026
D034W	0,340	0,321	0,499	0,471	0,076	0,069
M035V	0,887	0,639	0,721	0,652	0,116	0,023
S036H	1,109	0,752	1,178	1,135	0,117	0,026
S036N	0,797	0,933	0,893	0,859	0,171	0,260
L037M	0,574	0,404	0,455	0,353	0,049	0,032
F040L	2,603	3,941	3,515	4,148	0,277	0,361
I046L	3,027	2,959	4,011	3,342	0,513	0,557
N047D	2,222	2,359	2,573	2,639	0,032	0,021
N047W	0,404	0,415	0,423	0,456	0,000	0,017
A048N	12,398	45,971	14,252	23,873	0,797	0,902
T049R	7,893	13,334	9,685	12,102	0,563	0,649
G050D	3,287	3,148	3,084	3,020	0,242	0,264
G050M	1,763	2,333	2,780	3,244	0,250	0,393
G052N	7,217	9,809	6,939	13,978	1,109	1,083
G052T	1,542	1,224	1,795	1,433	0,381	0,463

TABLA 11: actividad hialuronidasa absoluta

Mutante	Sin incubación (4 °C)		37 °C sin cresol (37 °C)		37 °C con m-cresol (37 °C más m-cresol)	
G052S	2,152	1,999	2,120	1,963	0,498	0,566
V058C	1,428	1,312	1,321	1,301	0,212	0,210
V058K	28,000	28,000	61,016	61,016	23,586	23,586
V058R	5,719	4,688	5,542	4,822	3,134	3,149
V058N	1,200	1,175	1,550	1,525	0,200	0,175
V058Y	1,040	0,770	1,071	1,088	0,388	0,454
V058Q	11,956	15,363	18,458	45,092	1,567	2,166
V058P	3,360	2,949	2,799	5,121	0,592	0,884
V058H	3,790	5,074	7,590	9,222	0,826	1,205
D068P	0,215	0,215	0,213	0,180	0,001	0,184
S069T	1,927	2,179	2,671	2,671	0,289	0,240
I070P	1,284	1,593	1,306	1,589	0,010	0,032
I070V	1,818	2,437	3,099	3,335	0,433	0,363
V073Q	4,846	5,441	5,880	5,827	0,383	0,477
V073R	0,522	0,803	0,720	0,804	0,018	0,059
T074E	2,903	3,834	3,868	3,871	0,666	0,626
T074M	0,569	0,744	0,656	0,771	0,079	0,083
T074N	2,792	1,905	2,565	2,995	0,281	0,204
T074P	2,331	1,593	2,525	2,648	0,309	0,265
T074R	0,999	0,820	0,806	1,066	0,060	0,023
T074V	1,186	1,280	1,365	1,460	0,101	0,080
V075M	0,917	1,087	1,233	1,321	0,003	0,028
K082L	1,362	1,311	1,563	3,302	0,325	0,354
K082N	3,202	3,411	3,396	3,244	0,792	0,861
I083V	3,706	2,633	5,194	3,615	1,552	1,017
I083Q	2,376	1,946	2,665	3,674	0,720	0,510
I083S	0,841	1,054	0,880	1,005	0,235	0,268
I083G	2,276	2,443	2,418	1,866	0,545	0,601
S084E	1,470	1,484	1,834	1,683	0,115	0,115
S084F	1,179	1,212	0,982	1,103	0,025	0,000
S084N	2,255	1,888	3,268	2,476	0,597	0,547
S084R	8,534	14,779	10,230	30,016	1,117	1,494
Q086A	2,084	2,120	2,845	3,310	0,405	0,322
Q086H	1,187	1,000	1,218	1,296	0,087	0,065
Q086K	0,127	0,110	0,126	0,072	0,032	0,023

TABLA 11: actividad hialuronidasa absoluta

Mutante	Sin incubación (4 °C)		37 °C sin cresol (37 °C)		37 °C con m-cresol (37 °C más m-cresol)	
Q086S	2,528	2,082	2,539	2,149	0,173	0,241
Q086T	3,018	2,542	2,832	4,562	0,290	0,406
D087G	2,755	2,176	2,252	1,971	0,034	0,122
D087L	2,070	2,277	2,195	2,311	0,324	0,299
D087M	2,262	2,325	2,510	2,038	0,191	0,335
D087S	5,210	10,305	6,983	14,399	0,569	0,928
D087V	1,361	1,364	1,553	1,187	0,142	0,189
D090E	8,251	12,299	7,666	19,836	1,093	1,234
D090N	2,812	2,775	3,123	2,737	0,379	0,290
K093Q	2,491	2,065	2,267	1,971	0,132	0,131
K093R	2,986	2,862	3,094	2,842	0,362	0,465
K094D	2,393	2,088	2,071	2,132	0,135	0,211
K094R	1,407	1,542	1,764	1,676	0,158	0,166
T097C	0,330	0,618	0,545	0,505	0,044	0,087
T097D	0,520	0,565	0,643	0,664	0,055	0,073
T097E	1,096	1,410	1,394	1,623	0,217	0,262
T097L	0,899	1,198	1,065	1,241	0,246	0,300
N104R	2,508	2,356	2,876	2,790	0,279	0,238
A120H	2,155	2,551	2,028	2,883	0,168	0,199
D127R	0,264	0,339	0,149	0,199	0,105	0,068
V128I	3,120	3,313	3,546	3,401	0,389	0,504
N131M	15,335	20,678	27,143	15,899	0,505	0,447
N131R	8,195	8,748	7,724	8,392	1,645	1,626
N131V	1,656	1,870	2,280	1,962	0,233	0,214
R132L	3,306	3,235	3,259	2,966	0,337	0,430
Q138L	1,494	1,660	1,611	1,521	0,410	0,347
Q140K	2,829	4,065	4,996	4,464	0,546	0,559
N141R	1,290	1,320	1,334	1,527	0,058	0,035
N141S	2,201	2,708	2,900	2,966	0,135	0,164
N141W	1,475	1,568	1,927	1,643	0,100	0,105
V142D	2,552	2,186	2,914	3,193	0,128	0,067
V142G	1,357	1,796	1,597	1,621	0,211	0,219
V142K	3,532	2,381	3,867	3,681	0,571	0,575
V142N	0,432	0,567	0,672	0,589	0,103	0,087
V142P	4,624	7,213	7,722	7,021	1,074	1,081

TABLA 11: actividad hialuronidasa absoluta

Mutante	Sin incubación (4 °C)		37 °C sin cresol (37 °C)		37 °C con m-cresol (37 °C más m-cresol)	
V142Q	5,090	6,900	7,618	6,897	0,678	0,678
V142R	1,968	2,595	2,941	2,689	0,364	0,330
V142S	2,789	2,988	4,763	3,497	0,416	0,591
V142T	1,926	3,260	4,313	4,031	0,495	0,472
Q143G	3,922	4,903	5,632	4,846	0,782	0,780
Q143K	3,634	3,671	7,285	5,008	1,043	1,039
L144R	3,810	4,581	5,191	5,107	0,556	0,520
L144T	1,496	1,681	1,941	1,831	0,285	0,219
L146P	0,818	0,782	0,954	0,904	0,011	0,031
T147S	0,984	1,149	1,399	1,497	0,055	0,039
T150N	0,442	0,585	0,622	0,684	0,039	0,046
T150S	1,747	1,400	1,875	1,988	0,120	0,121
E151A	2,870	2,269	2,965	2,860	0,359	0,337
E151L	3,365	3,289	4,446	4,007	0,218	0,251
E151S	5,187	4,591	5,987	6,262	0,371	0,294
E151T	2,442	3,000	3,134	3,309	0,000	0,000
E151V	3,998	4,247	4,459	4,232	0,326	0,314
E151W	7,166	14,248	11,352	13,524	0,131	0,121
K152T	1,204	1,377	1,796	1,883	0,100	0,067
K152W	2,084	1,795	2,549	2,406	0,063	0,069
E158S	0,339	0,397	0,451	0,407	0,000	0,000
K162E	0,168	0,195	0,114	0,080	0,004	0,024
L165F	4,775	5,250	5,075	5,075	0,600	0,725
V166Q	1,883	2,507	2,937	2,958	0,392	0,324
V166T	0,993	1,315	1,821	1,800	0,231	0,235
E167D	0,811	0,910	1,109	1,480	0,111	0,056
I169L	1,812	1,796	2,540	2,196	0,335	0,341
K170R	1,578	2,054	2,536	1,995	0,209	0,201
G172A	0,413	0,581	0,692	0,777	0,052	0,056
K173R	1,654	1,551	1,766	2,083	0,173	0,156
L174G	0,184	0,087	0,210	0,230	0,026	0,031
L174N	1,616	2,276	2,494	2,872	0,331	0,543
L174T	0,552	0,566	0,689	0,820	0,090	0,050
N178K	2,931	4,375	4,891	4,513	0,258	0,362
N178R	8,160	13,820	16,287	20,033	0,665	0,790

TABLA 11: actividad hialuronidasa absoluta

Mutante	Sin incubación (4 °C)		37 °C sin cresol (37 °C)		37 °C con m-cresol (37 °C más m-cresol)	
H193Q	1,060	1,367	2,264	1,888	0,346	0,346
K195T	1,227	0,806	1,548	1,911	0,348	0,292
K195N	1,266	1,437	1,649	1,385	0,369	0,353
K196E	0,732	0,660	0,663	1,017	0,244	0,239
K196R	2,246	2,285	2,383	2,174	0,315	0,384
F204P	3,500	4,550	2,925	3,750	2,475	4,725
N205A	0,515	0,837	0,717	0,854	0,153	0,160
N205E	1,011	2,004	1,627	1,870	0,314	0,346
N205L	1,084	1,029	1,165	0,000	0,123	0,088
N205T	0,295	0,367	0,428	0,406	0,043	0,053
V206I	0,317	0,508	0,600	0,565	0,079	0,088
K209R	2,041	2,453	2,445	1,951	0,291	0,077
D212N	5,568	4,549	6,271	6,016	0,167	0,322
D212S	1,987	1,502	2,442	2,222	0,204	0,152
D213A	0,235	0,283	0,432	0,438	0,116	0,060
D213M	1,664	2,080	2,650	2,046	0,181	0,142
S215H	2,448	3,056	2,670	2,414	0,268	0,139
S215M	1,497	2,175	2,618	1,630	0,110	0,146
N219I	0,338	0,250	0,860	0,728	0,076	0,082
E220V	3,783	3,828	4,993	4,349	0,371	0,257
T222G	3,528	5,262	5,399	5,549	0,033	0,044
T232F	0,539	1,242	0,716	0,781	0,089	0,153
Q233G	0,041	0,095	0,115	0,121	0,000	0,000
Q234M	6,029	6,031	5,764	4,871	1,286	0,988
S235A	0,550	0,502	0,714	0,607	0,079	0,073
V237C	0,623	0,708	0,860	0,824	0,000	0,000
V237H	0,303	0,316	0,370	0,459	0,046	0,034
V237T	0,152	0,196	0,254	0,247	0,054	0,053
A238E	2,050	1,800	1,945	2,559	0,159	0,171
A238H	0,579	0,363	0,345	0,743	0,090	0,062
T240A	1,107	0,900	1,564	1,302	0,143	0,118
T240Q	0,333	0,510	0,542	0,617	0,080	0,085
R248A	2,274	2,499	2,575	3,115	0,027	0,075
E249V	3,001	3,894	4,284	4,325	0,655	0,712
P257G	3,981	4,452	4,985	5,022	0,039	0,034

TABLA 11: actividad hialuronidasa absoluta

Mutante	Sin incubación (4 °C)		37 °C sin cresol (37 °C)		37 °C con m-cresol (37 °C más m-cresol)	
K260M	0,719	0,960	0,839	0,935	0,072	0,068
S261A	3,253	3,117	1,872	2,686	1,264	1,451
S261K	6,089	5,421	9,860	6,297	1,583	1,437
S261N	14,149	40,257	20,219	14,303	2,115	1,917
A267T	0,052	0,095	0,102	0,106	0,036	0,041
F273H	0,340	0,436	0,417	0,519	0,025	0,031
F273Y	0,558	0,505	0,668	0,519	0,052	0,050
Q276H	2,706	1,877	2,027	1,997	0,181	0,201
Q276M	0,775	0,768	0,762	0,806	0,043	0,000
Q276R	6,080	9,717	7,383	14,593	0,807	1,281
Q276S	1,353	1,212	1,497	1,681	0,149	0,147
V277A	1,202	1,643	1,692	2,129	0,118	0,110
V277E	2,440	2,340	4,289	4,577	0,161	0,239
V277H	5,548	5,302	7,181	7,300	0,227	0,512
V277K	8,950	8,996	33,627	33,627	4,442	4,045
V277M	1,279	1,622	1,754	1,818	0,264	0,270
V277N	14,351	4,306	12,865	11,772	0,938	0,796
V277Q	5,459	5,461	6,547	6,343	0,373	0,493
V277R	18,300	12,038	17,581	20,641	2,737	2,023
V277S	14,351	10,444	9,509	15,135	0,727	0,716
V277T	8,412	7,804	8,497	11,184	0,679	0,871
L278E	4,416	2,795	3,330	2,800	0,170	0,202
L278G	7,502	7,456	9,173	7,760	0,596	0,612
K279H	0,888	1,087	1,234	1,339	0,185	0,269
V287T	0,580	0,667	0,843	0,832	0,139	0,100
T289S	0,783	1,019	0,819	1,001	0,008	0,007
G291S	0,227	0,322	0,419	0,385	0,051	0,016
G291V	3,662	3,707	4,131	5,599	0,821	0,706
E292C	1,344	1,599	1,711	1,617	0,138	0,144
E292F	6,106	4,697	8,422	6,216	0,520	0,363
E292H	2,620	3,316	4,458	3,830	0,389	0,451
E292R	2,810	2,178	3,155	2,829	0,398	0,339
E292V	0,891	1,121	1,453	1,494	0,193	0,177
T293A	1,986	3,110	2,546	1,789	0,086	0,076
A298G	0,161	0,274	0,342	0,236	0,030	0,022

TABLA 11: actividad hialuronidasa absoluta

Mutante	Sin incubación (4 °C)		37 °C sin cresol (37 °C)		37 °C con m-cresol (37 °C más m-cresol)	
L307G	0,616	0,661	0,726	0,605	0,000	0,000
S308D	0,264	0,325	0,337	0,344	0,014	0,010
S308K	0,651	0,722	0,826	0,716	0,011	0,000
S308N	3,995	4,406	6,808	6,128	0,386	0,362
I309E	3,166	2,819	3,921	3,663	0,637	0,528
I309G	6,651	5,429	6,824	6,194	0,503	0,400
I309L	0,326	0,403	0,501	0,431	0,048	0,047
I309M	2,809	2,473	3,467	3,383	0,278	0,239
I309N	4,865	5,191	5,444	5,054	0,380	0,327
I309S	10,719	28,759	18,217	158,604	0,748	1,367
I309T	3,052	2,509	2,989	3,735	0,228	0,207
I309V	1,705	1,292	1,929	1,787	0,029	0,062
M310G	4,514	6,397	7,568	7,084	0,866	0,915
M310Q	3,648	3,179	3,912	3,380	1,088	0,955
M313G	0,252	0,325	0,348	0,355	0,034	0,036
M313H	3,767	5,276	10,243	10,395	0,380	0,404
M313K	12,689	12,122	15,085	12,984	0,129	0,072
M313P	4,050	2,951	4,198	3,919	0,209	0,177
M313R	4,634	10,863	7,288	3,568	0,337	0,296
M313T	2,903	4,474	4,705	4,467	0,331	0,313
M313Y	1,063	1,262	1,276	1,300	0,096	0,089
K314S	2,848	4,450	4,042	5,879	0,391	0,533
K314Y	0,093	0,131	0,226	0,182	0,013	0,020
S315A	1,472	1,082	1,345	1,484	0,222	0,148
S315H	2,412	3,242	3,648	3,414	0,440	0,371
S315Y	0,279	0,626	0,477	0,362	0,146	0,143
L317A	3,254	2,845	4,019	3,776	0,280	0,317
L317I	1,078	1,524	2,021	1,687	0,257	0,180
L317K	12,129	9,382	11,668	12,591	0,402	0,445
L317N	2,907	3,066	3,703	3,717	0,445	0,540
L317R	8,631	15,187	20,585	15,106	0,796	0,857
L317S	11,586	29,267	10,535	25,114	1,637	1,613
L317T	1,338	1,073	1,953	1,656	0,136	0,018
L317W	0,810	1,128	1,326	1,665	0,158	0,171
L318D	1,750	1,970	1,847	1,930	0,322	0,322

TABLA 11: actividad hialuronidasa absoluta

Mutante	Sin incubación (4 °C)		37 °C sin cresol (37 °C)		37 °C con m-cresol (37 °C más m-cresol)	
L318H	1,073	0,806	1,072	1,005	0,046	0,074
L318R	2,856	3,464	4,583	4,187	0,258	0,260
N321R	3,069	4,409	5,059	4,946	0,482	0,426
N321S	0,683	0,710	0,700	0,772	0,058	0,035
E324N	4,309	2,530	4,508	3,321	0,348	0,303
T325E	1,071	1,270	1,337	1,352	0,193	0,143
N328G	0,379	0,504	0,747	0,553	0,031	0,040
N328Y	2,629	4,543	4,758	4,543	0,490	0,477
T335S	0,905	0,787	0,977	0,986	0,113	0,062
Q347A	8,316	11,961	8,432	11,508	0,918	1,266
Q347G	1,358	1,120	3,021	2,319	0,253	0,209
Q349M	1,493	1,629	1,486	1,760	0,178	0,217
Q349R	0,451	0,572	0,663	0,598	0,078	0,079
V351S	1,379	1,633	1,804	1,647	0,000	0,000
I353V	2,335	1,954	3,090	2,697	0,323	0,321
N356H	0,445	0,451	0,445	0,588	0,038	0,023
N356S	0,262	0,253	0,136	0,318	0,000	0,008
S359E	2,616	2,635	3,547	3,560	0,382	0,333
S359H	0,403	0,371	0,445	0,374	0,000	0,000
P367A	0,643	0,782	1,074	0,996	0,139	0,131
P367G	0,593	0,530	0,686	0,650	0,000	0,000
P367K	0,707	0,767	0,890	0,513	0,045	0,052
P367S	3,967	3,478	2,946	3,073	0,424	0,505
D368A	1,762	2,321	2,143	1,895	0,031	0,040
D368E	3,464	4,944	5,772	4,842	0,530	0,555
D368L	0,557	0,566	0,607	0,619	0,000	0,006
D368M	0,861	1,065	1,031	1,104	0,028	0,028
D368R	4,503	5,270	7,418	6,226	0,754	0,735
D368T	2,345	1,993	2,512	2,525	0,072	0,085
N369R	1,548	2,719	2,503	2,022	0,160	0,125
A371F	2,760	5,207	4,974	3,980	0,308	0,222
A371H	8,101	86,587	77,531	77,531	1,403	1,316
A371H	3,509	4,058	3,900	3,879	0,000	0,334
A371K	2,903	3,546	3,963	4,055	0,509	0,505
A371L	11,018	40,668	76,587	43,516	1,159	0,964

TABLA 11: actividad hialuronidasa absoluta

Mutante	Sin incubación (4 °C)		37 °C sin cresol (37 °C)		37 °C con m-cresol (37 °C más m-cresol)	
A371L	3,328	3,445	3,472	2,075	0,000	0,025
A371R	25,855	25,855	n/d	n/d	2,851	3,634
A371R	6,592	7,733	7,987	7,576	0,000	0,196
A371S	3,329	3,505	4,916	4,611	0,412	0,781
L374P	2,939	7,129	11,522	8,771	0,665	0,646
E375A	0,627	0,507	0,557	0,683	0,000	0,014
E375G	1,596	1,299	2,025	1,806	0,209	0,265
E375R	0,937	1,132	1,529	1,318	0,201	0,260
K376D	0,458	0,312	0,518	0,515	0,064	0,026
K376E	1,572	1,094	1,572	1,674	0,213	0,174
K376Q	0,727	0,940	0,910	0,846	0,116	0,102
K376R	2,086	1,351	1,704	2,690	0,539	0,279
K376T	0,847	1,001	1,026	1,135	0,153	0,064
K376V	0,834	0,861	1,036	1,021	0,033	0,026
K376Y	1,316	0,777	1,353	0,747	0,125	0,097
G377D	1,159	1,332	1,285	1,763	0,202	0,186
G377E	0,877	0,926	1,144	1,189	0,092	0,088
G377H	3,037	3,432	4,460	3,598	0,372	0,364
G377K	3,445	4,101	6,405	4,911	0,283	0,245
G377R	1,096	1,257	1,312	1,191	0,077	0,085
G377S	0,453	0,452	0,492	0,457	0,034	0,036
G377T	2,198	2,313	2,474	2,522	0,424	0,461
F380W	17,497	27,987	25,734	29,353	2,566	2,716
T381S	2,861	3,161	3,886	3,558	0,521	0,367
R383I	1,959	6,936	10,340	6,820	0,655	0,513
R383S	2,429	2,548	3,228	3,044	0,339	0,321
K385A	0,479	0,669	0,604	0,754	0,028	0,000
K385Q	1,746	2,089	2,403	2,609	0,217	0,196
K385V	1,232	1,750	1,387	1,410	0,071	0,042
E389A	6,872	10,944	21,081	24,610	0,449	0,449
E389G	0,166	0,203	0,188	0,284	0,004	0,000
E389L	1,814	2,142	2,598	2,403	0,370	0,303
E389Q	2,547	3,432	3,459	3,423	0,411	0,437
E389S	1,847	2,640	3,059	2,456	0,000	0,007
E392A	1,797	1,370	2,021	2,133	0,147	0,136

TABLA 11: actividad hialuronidasa absoluta

Mutante	Sin incubación (4 °C)		37 °C sin cresol (37 °C)		37 °C con m-cresol (37 °C más m-cresol)	
E392F	1,575	1,407	1,821	2,023	0,071	0,079
E392Q	5,826	4,653	6,583	4,364	0,693	0,729
E392R	4,555	5,306	5,900	6,548	0,218	0,193
E392V	3,817	2,936	4,747	4,544	0,367	0,291
Q393F	1,754	2,186	2,455	2,222	0,260	0,226
Q393M	1,252	1,826	1,749	1,588	0,028	0,049
S395A	4,220	6,127	8,788	6,906	1,141	0,856
S395H	1,609	2,261	2,574	2,564	0,323	0,268
E396A	1,135	1,184	1,497	1,524	0,126	0,149
E396H	0,357	0,532	0,751	0,684	0,069	0,022
E396Q	1,310	1,625	1,611	1,559	0,162	0,160
E396S	3,375	5,709	5,274	6,380	0,146	0,129
Y399T	2,538	3,250	3,313	3,989	0,000	0,002
Y399V	2,738	2,697	3,028	3,129	0,484	0,557
Y399W	1,400	1,883	1,715	1,946	0,236	0,233
S401A	2,636	3,171	3,216	3,148	0,447	0,410
S401E	1,685	1,601	2,110	2,060	0,344	0,309
S404A	1,288	1,635	1,924	1,724	0,000	0,019
L406F	0,706	0,490	0,867	0,716	0,000	0,000
L406N	0,617	0,795	0,943	1,044	0,060	0,070
S407A	2,428	2,949	3,432	3,255	0,389	0,548
S407D	2,090	5,790	5,038	5,682	0,569	0,575
S407P	2,660	2,708	3,812	3,301	0,261	0,366
A412Q	2,001	2,918	2,925	2,902	0,279	0,247
A412R	4,562	5,132	6,390	6,347	0,570	0,596
A412V	2,581	3,451	3,789	3,511	0,189	0,189
D416L	0,610	0,817	0,737	1,043	0,130	0,160
D418R	4,541	4,847	5,347	5,438	0,406	0,583
A419H	10,409	20,311	25,109	38,221	2,214	2,293
A419K	12,835	10,298	24,536	208,289	2,556	3,173
D421A	5,968	5,617	6,094	16,940	0,761	0,764
D421H	48,012	48,012	160,106	32,481	16,300	28,113
D421K	5,527	5,225	6,864	5,346	0,523	0,725
D421N	9,060	8,635	10,039	8,645	1,502	1,422
D421Q	7,529	5,581	7,858	8,016	0,842	0,994

TABLA 11: actividad hialuronidasa absoluta

Mutante	Sin incubación (4 °C)		37 °C sin cresol (37 °C)		37 °C con m-cresol (37 °C más m-cresol)	
D421R	6,637	5,463	9,211	7,537	0,815	0,737
D421S	5,556	5,355	7,899	8,898	0,869	0,762
A425G	10,421	8,827	7,796	10,676	0,827	1,189
G427Q	1,008	1,252	1,342	1,230	0,031	0,106
G427T	1,330	1,380	1,664	1,643	0,080	0,065
V428L	2,138	2,769	2,930	3,029	0,053	0,030
D431E	2,810	2,220	1,972	2,112	0,519	0,438
D431H	2,154	3,185	4,017	3,028	0,294	0,301
D431K	8,123	16,953	19,563	11,575	2,272	2,339
D431L	1,211	1,215	1,564	1,448	0,164	0,170
D431N	11,819	12,063	16,358	15,131	1,601	1,399
D431Q	6,077	9,828	14,157	10,760	1,533	1,153
D431S	14,523	10,220	11,338	9,075	0,853	0,829
F433A	4,035	4,673	5,943	4,649	0,581	0,595
F433H	1,836	2,397	2,574	2,108	0,347	0,356
F433I	2,754	2,643	2,990	2,299	0,338	0,382
F433K	17,815	14,495	16,240	49,615	1,806	1,790
F433R	8,198	6,719	10,572	8,960	1,113	0,857
F433T	6,005	5,941	9,716	8,019	1,327	1,542
F433V	10,645	7,762	150,315	8,696	2,415	1,505
F433W	0,526	0,795	0,784	0,903	0,082	0,068
P437I	0,759	0,996	1,130	1,066	0,027	0,019
M438A	1,996	1,518	2,125	2,060	0,214	0,210
M438D	2,849	2,522	3,002	2,857	0,305	0,074
M438E	4,681	4,992	5,386	5,680	0,431	0,518
M438L	10,127	5,268	6,663	11,324	0,670	0,739
M438N	6,172	5,531	8,050	5,568	0,649	0,662
M438T	2,218	2,411	2,308	2,500	0,309	0,304
E439A	3,557	4,432	4,883	4,235	0,568	0,596
E439A	1,099	0,998	1,694	1,470	0,080	0,109
E439C	0,148	0,256	0,286	0,286	0,042	0,045
E439K	0,466	0,588	0,580	0,616	0,077	0,065
E439P	2,868	3,736	3,394	3,267	0,529	0,490
E439Q	1,070	0,848	1,087	1,080	0,116	0,115
E439T	1,965	1,889	2,179	2,323	0,313	0,263

TABLA 11: actividad hialuronidasa absoluta

Mutante	Sin incubación (4 °C)		37 °C sin cresol (37 °C)		37 °C con m-cresol (37 °C más m-cresol)	
T440D	4,148	4,443	4,931	3,533	0,568	0,651
T440H	2,317	1,982	3,297	2,595	0,147	0,196
T440M	3,397	3,305	2,878	2,873	0,254	0,367
T440P	3,562	3,593	3,987	3,277	0,540	0,566
T440S	2,522	2,207	2,533	2,895	0,283	0,284
E441F	1,402	1,407	1,813	1,560	0,204	0,178
E442G	2,871	3,340	3,193	3,347	0,327	0,367
P443E	0,907	0,710	0,856	0,928	0,044	0,063
P443F	1,830	2,370	2,683	2,321	0,301	0,286
P443G	4,077	2,921	9,751	4,614	0,835	0,756
Q444E	8,293	3,861	6,800	6,213	0,581	0,594
Q444H	3,823	3,936	5,746	4,710	0,486	0,513
Q444V	2,193	2,107	2,847	2,583	0,384	0,284
I445M	5,265	4,438	4,480	4,489	0,773	0,691
I445N	3,375	4,024	3,592	3,515	0,499	0,455
I445W	2,289	2,694	2,683	2,695	0,314	0,296
Y447E	2,373	2,464	2,363	2,685	0,391	0,345
Y447G	0,945	1,352	1,358	1,401	0,187	0,162
Y447P	0,991	1,383	1,379	1,490	0,190	0,183
control positivo (OHO)	2,919	2,173	2,773	2,105	0,145	0,178
	3,984	4,463	4,215	4,823	0,189	0,253
	3	2,725	3	3,325	0,1	0,125
	2,501	2,883	2,370	3,158	0,452	0,522
	7,629	2,989	10,835	3,914	0,485	0,219
	5,783	5,356	2,609	3,643	0,542	0,402
	5,279	5,422	2,815	4,026	0,618	0,401
	4,775	4,385	2,845	3,327	0,718	0,540
	3,617	4,264	3,322	3,427	0,633	0,479
	5,881	4,511	5,518	4,359	0,743	0,848
	6,754	4,932	3,902	4,120	0,665	0,724
	3,911	3,494	3,911	5,179	0,726	0,841
	5,406	7,559	4,018	4,620	0,735	0,429
	4,015	3,887	3,9400	3,4080	0,3340	0,3410
	2,604	2,339	2,4430	2,3910	0,2350	0,2330
3,736	3,473	3,6210	3,0560	0,3100	0,2770	

TABLA 11: actividad hialuronidasa absoluta

Mutante	Sin incubación (4 °C)		37 °C sin cresol (37 °C)		37 °C con m-cresol (37 °C más m-cresol)	
		3,759	3,509	3,6330	3,0490	0,3600

n/d (no disponible; por ejemplo, más allá del límite de detección)

TABLA 12: porcentaje (%) de actividad

	duplicado 1			duplicado 2		
	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C
L001A	117,908	8,13	9,59	127,997	9,179	11,75
L001E	107,231	13,14	14,09	125,207	10,727	13,43
L001G	171,264	9,23	15,80	115,952	4,586	5,32
L001Q	119,435	10,13	12,09	88,763	11,121	9,87
L001R	117,366	6,96	8,17	160,410	5,623	9,02
P006A	137,875	9,88	13,63	108,946	12,446	13,56
V008M	134,884	0,00	0,00	119,772	0,477	0,57
I009Q	104,922	6,61	6,94	124,934	6,303	7,87
P010G	109,772	15,00	16,47	121,986	16,570	20,21
P010H	131,924	0,00	0,00	112,990	0,000	0,00
N011S	152,320	7,16	10,90	131,289	5,067	6,65
V012E	48,208	14,18	6,83	100,163	16,896	16,92
V012I	128,745	2,94	3,78	170,812	1,371	2,34
V012K	146,600	13,31	19,52	114,264	14,311	16,35
F014V	154,167	1,35	2,08	146,667	0,000	0,00
L015M	113,747	1,66	1,88	83,970	1,887	1,58
A020S	188,889	14,64	27,64	118,821	15,153	18,00
S022T	111,203	20,27	22,54	86,404	22,854	19,75
L026M	136,775	11,05	15,11	138,989	10,446	14,52
K028R	110,487	10,74	11,86	109,467	10,270	11,24
F029R	154,644	7,58	11,72	121,707	7,613	9,27
F029S	118,119	7,01	8,28	97,400	8,037	7,83
F029T	126,740	11,96	15,16	120,619	10,266	12,38
P032C	128,649	1,26	1,62	127,446	7,491	9,55
L033G	121,201	0,15	0,18	89,571	4,147	3,71
D034W	146,765	15,23	22,35	146,729	14,650	21,50
M035V	81,285	16,09	13,08	102,034	3,528	3,60
S036H	106,222	9,93	10,55	150,931	2,291	3,46

TABLA 12: porcentaje (%) de actividad

	duplicado 1			duplicado 2		
	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C
S036N	112,045	19,15	21,46	92,069	30,268	27,87
L037M	79,268	10,77	8,54	87,376	9,065	7,92
F040L	135,036	7,88	10,64	105,252	8,703	9,16
I046L	132,507	12,79	16,95	112,944	16,667	18,82
N047D	115,797	1,24	1,44	111,869	0,796	0,89
N047W	104,703	0,00	0,00	109,880	3,728	4,10
A048N	114,954	5,59	6,43	51,931	3,778	1,96
T049R	122,704	5,81	7,13	90,760	5,363	4,87
G050D	93,824	7,85	7,36	95,934	8,742	8,39
G050M	157,686	8,99	14,18	139,048	12,115	16,85
G052N	96,148	15,98	15,37	142,502	7,748	11,04
G052T	116,407	21,23	24,71	117,075	32,310	37,83
G052S	98,513	23,49	23,14	98,199	28,833	28,31
V058C	92,507	16,05	14,85	99,162	16,141	16,01
V058K	217,914	38,66	84,24	217,914	38,655	84,24
V058R	96,905	56,55	54,80	102,858	65,305	67,17
V058N	129,167	12,90	16,67	129,787	11,475	14,89
V058Y	102,981	36,23	37,31	141,299	41,728	58,96
V058Q	154,383	8,49	13,11	293,510	4,804	14,10
V058P	83,304	21,15	17,62	173,652	17,262	29,98
V058H	200,264	10,88	21,79	181,750	13,067	23,75
D068P	99,070	0,47	0,47	83,721	102,222	85,58
S069T	138,609	10,82	15,00	122,579	8,985	11,01
I070P	101,713	0,77	0,78	99,749	2,014	2,01
I070V	170,462	13,97	23,82	136,849	10,885	14,90
V073Q	121,337	6,51	7,90	107,094	8,186	8,77
V073R	137,931	2,50	3,45	100,125	7,338	7,35
T074E	133,241	17,22	22,94	100,965	16,172	16,33
T074M	115,290	12,04	13,88	103,629	10,765	11,16
T074N	91,870	10,96	10,06	157,218	6,811	10,71
T074P	108,323	12,24	13,26	166,227	10,008	16,64
T074R	80,681	7,44	6,01	130,000	2,158	2,80
T074V	115,093	7,40	8,52	114,063	5,479	6,25
V075M	134,460	0,24	0,33	121,527	2,120	2,58

TABLA 12: porcentaje (%) de actividad

	duplicado 1			duplicado 2		
	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C
K082L	114,758	20,79	23,86	251,869	10,721	27,00
K082N	106,059	23,32	24,73	95,104	26,541	25,24
I083V	140,151	29,88	41,88	137,296	28,133	38,63
I083Q	112,163	27,02	30,30	188,798	13,881	26,21
I083S	104,637	26,70	27,94	95,351	26,667	25,43
I083G	106,239	22,54	23,95	76,381	32,208	24,60
S084E	124,762	6,27	7,82	113,410	6,833	7,75
S084F	83,291	2,55	2,12	91,007	0,000	0,00
S084N	144,922	18,27	26,47	131,144	22,092	28,97
S084R	119,873	10,92	13,09	203,099	4,977	10,11
Q086A	136,516	14,24	19,43	156,132	9,728	15,19
Q086H	102,612	7,14	7,33	129,600	5,015	6,50
Q086K	99,213	25,40	25,20	65,455	31,944	20,91
Q086S	100,435	6,81	6,84	103,218	11,215	11,58
Q086T	93,837	10,24	9,61	179,465	8,900	15,97
D087G	81,742	1,51	1,23	90,579	6,190	5,61
D087L	106,039	14,76	15,65	101,493	12,938	13,13
D087M	110,964	7,61	8,44	87,656	16,438	14,41
D087S	134,031	8,15	10,92	139,728	6,445	9,01
D087V	114,107	9,14	10,43	87,023	15,922	13,86
D090E	92,910	14,26	13,25	161,281	6,221	10,03
D090N	111,060	12,14	13,48	98,631	10,596	10,45
K093Q	91,008	5,82	5,30	95,448	6,646	6,34
K093R	103,617	11,70	12,12	99,301	16,362	16,25
K094D	86,544	6,52	5,64	102,107	9,897	10,11
K094R	125,373	8,96	11,23	108,690	9,905	10,77
T097C	165,152	8,07	13,33	81,715	17,228	14,08
T097D	123,654	8,55	10,58	117,522	10,994	12,92
T097E	127,190	15,57	19,80	115,106	16,143	18,58
T097L	118,465	23,10	27,36	103,589	24,174	25,04
N104R	114,673	9,70	11,12	118,421	8,530	10,10
A120H	94,107	8,28	7,80	113,015	6,903	7,80
D127R	56,439	70,47	39,77	58,702	34,171	20,06
V128I	113,654	10,97	12,47	102,656	14,819	15,21

TABLA 12: porcentaje (%) de actividad

	duplicado 1			duplicado 2		
	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C
N131M	177,000	1,86	3,29	76,888	2,811	2,16
N131R	94,253	21,30	20,07	95,930	19,376	18,59
N131V	137,681	10,22	14,07	104,920	10,907	11,44
R132L	98,578	10,34	10,19	91,685	14,498	13,29
Q138L	107,831	25,45	27,44	91,627	22,814	20,90
Q140K	176,600	10,93	19,30	109,815	12,522	13,75
N141R	103,411	4,35	4,50	115,682	2,292	2,65
N141S	131,758	4,66	6,13	109,527	5,529	6,06
N141W	130,644	5,19	6,78	104,783	6,391	6,70
V142D	114,185	4,39	5,02	146,066	2,098	3,06
V142G	117,686	13,21	15,55	90,256	13,510	12,19
V142K	109,485	14,77	16,17	154,599	15,621	24,15
V142N	155,556	15,33	23,84	103,880	14,771	15,34
V142P	166,998	13,91	23,23	97,338	15,397	14,99
V142Q	149,666	8,90	13,32	99,957	9,830	9,83
V142R	149,441	12,38	18,50	103,622	12,272	12,72
V142S	170,778	8,73	14,92	117,035	16,900	19,78
V142T	223,936	11,48	25,70	123,650	11,709	14,48
Q143G	143,600	13,88	19,94	98,837	16,096	15,91
Q143K	200,468	14,32	28,70	136,421	20,747	28,30
L144R	136,247	10,71	14,59	111,482	10,182	11,35
L144T	129,746	14,68	19,05	108,923	11,961	13,03
L146P	116,626	1,15	1,34	115,601	3,429	3,96
T147S	142,175	3,93	5,59	130,287	2,605	3,39
T150N	140,724	6,27	8,82	116,923	6,725	7,86
T150S	107,327	6,40	6,87	142,000	6,087	8,64
E151A	103,310	12,11	12,51	126,047	11,783	14,85
E151L	132,125	4,90	6,48	121,830	6,264	7,63
E151S	115,423	6,20	7,15	136,397	4,695	6,40
E151T	128,337	0,00	0,00	110,300	0,000	0,00
E151V	111,531	7,31	8,15	99,647	7,420	7,39
E151W	158,415	1,15	1,83	94,919	0,895	0,85
K152T	149,169	5,57	8,31	136,747	3,558	4,87
K152W	122,313	2,47	3,02	134,039	2,868	3,84

TABLA 12: porcentaje (%) de actividad

	duplicado 1			duplicado 2		
	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C
E158S	133,038	0,00	0,00	102,519	0,000	0,00
K162E	67,857	3,51	2,38	41,026	30,000	12,31
L165F	106,283	11,82	12,57	96,667	14,286	13,81
V166Q	155,975	13,35	20,82	117,990	10,953	12,92
V166T	183,384	12,69	23,26	136,882	13,056	17,87
E167D	136,745	10,01	13,69	162,637	3,784	6,15
I169L	140,177	13,19	18,49	122,272	15,528	18,99
K170R	160,710	8,24	13,24	97,128	10,075	9,79
G172A	167,554	7,51	12,59	133,735	7,207	9,64
K173R	106,771	9,80	10,46	134,300	7,489	10,06
L174G	114,130	12,38	14,13	264,368	13,478	35,63
L174N	154,332	13,27	20,48	126,186	18,907	23,86
L174T	124,819	13,06	16,30	144,876	6,098	8,83
N178K	166,871	5,27	8,80	103,154	8,021	8,27
N178R	199,596	4,08	8,15	144,957	3,943	5,72
H193Q	213,585	15,28	32,64	138,113	18,326	25,31
K195T	126,161	22,48	28,36	237,097	15,280	36,23
K195N	130,253	22,38	29,15	96,381	25,487	24,57
K196E	90,574	36,80	33,33	154,091	23,500	36,21
K196R	106,100	13,22	14,02	95,142	17,663	16,81
F204P	83,571	84,62	70,71	82,418	126,000	103,85
N205A	139,223	21,34	29,71	102,031	18,735	19,12
N205E	160,930	19,30	31,06	93,313	18,503	17,27
N205L	107,472	10,56	11,35	0,000	#DIV/0!	8,55
N205T	145,085	10,05	14,58	110,627	13,054	14,44
V206I	189,274	13,17	24,92	111,220	15,575	17,32
K209R	119,794	11,90	14,26	79,535	3,947	3,14
D212N	112,626	2,66	3,00	132,249	5,352	7,08
D212S	122,899	8,35	10,27	147,936	6,841	10,12
D213A	183,830	26,85	49,36	154,770	13,699	21,20
D213M	159,255	6,83	10,88	98,365	6,940	6,83
S215H	109,069	10,04	10,95	78,992	5,758	4,55
S215M	174,883	4,20	7,35	74,943	8,957	6,71
N219I	254,438	8,84	22,49	291,200	11,264	32,80

TABLA 12: porcentaje (%) de actividad

	duplicado 1			duplicado 2		
	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C
E220V	131,985	7,43	9,81	113,610	5,909	6,71
T222G	153,033	0,61	0,94	105,454	0,793	0,84
T232F	132,839	12,43	16,51	62,882	19,590	12,32
Q233G	280,488	0,00	0,00	127,368	0,000	0,00
Q234M	95,605	22,31	21,33	80,766	20,283	16,38
S235A	129,818	11,06	14,36	120,916	12,026	14,54
V237C	138,042	0,00	0,00	116,384	0,000	0,00
V237H	122,112	12,43	15,18	145,253	7,407	10,76
V237T	167,105	21,26	35,53	126,020	21,457	27,04
A238E	94,878	8,17	7,76	142,167	6,682	9,50
A238H	59,585	26,09	15,54	204,683	8,345	17,08
T240A	141,283	9,14	12,92	144,667	9,063	13,11
T240Q	162,763	14,76	24,02	120,980	13,776	16,67
R248A	113,237	1,05	1,19	124,650	2,408	3,00
E249V	142,752	15,29	21,83	111,068	16,462	18,28
P257G	125,220	0,78	0,98	112,803	0,677	0,76
K260M	116,690	8,58	10,01	97,396	7,273	7,08
S261A	57,547	67,52	38,86	86,173	54,021	46,55
S261K	161,931	16,05	26,00	116,159	22,820	26,51
S261N	142,901	10,46	14,95	35,529	13,403	4,76
A267T	196,154	35,29	69,23	111,579	38,679	43,16
F273H	122,647	6,00	7,35	119,037	5,973	7,11
F273Y	119,713	7,78	9,32	102,772	9,634	9,90
Q276H	74,908	8,93	6,69	106,393	10,065	10,71
Q276M	98,323	5,64	5,55	104,948	0,000	0,00
Q276R	121,431	10,93	13,27	150,180	8,778	13,18
Q276S	110,643	9,95	11,01	138,696	8,745	12,13
V277A	140,765	6,97	9,82	129,580	5,167	6,70
V277E	175,779	3,75	6,60	195,598	5,222	10,21
V277H	129,434	3,16	4,09	137,684	7,014	9,66
V277K	375,721	13,21	49,63	373,799	12,029	44,96
V277M	137,138	15,05	20,64	112,084	14,851	16,65
V277N	89,645	7,29	6,54	273,386	6,762	18,49
V277Q	119,930	5,70	6,83	116,151	7,772	9,03

TABLA 12: porcentaje (%) de actividad

	duplicado 1			duplicado 2		
	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C
V277R	96,071	15,57	14,96	171,465	9,801	16,81
V277S	66,260	7,65	5,07	144,916	4,731	6,86
V277T	101,010	7,99	8,07	143,311	7,788	11,16
L278E	75,408	5,11	3,85	100,179	7,214	7,23
L278G	122,274	6,50	7,94	104,077	7,887	8,21
K279H	138,964	14,99	20,83	123,183	20,090	24,75
V287T	145,345	16,49	23,97	124,738	12,019	14,99
T289S	104,598	0,98	1,02	98,234	0,699	0,69
G291S	184,581	12,17	22,47	119,565	4,156	4,97
G291V	112,807	19,87	22,42	151,039	12,609	19,05
E292C	127,307	8,07	10,27	101,126	8,905	9,01
E292F	137,930	6,17	8,52	132,340	5,840	7,73
E292H	170,153	8,73	14,85	115,501	11,775	13,60
E292R	112,278	12,61	14,16	129,890	11,983	15,56
E292V	163,075	13,28	21,66	133,274	11,847	15,79
T293A	128,197	3,38	4,33	57,524	4,248	2,44
A298G	212,422	8,77	18,63	86,131	9,322	8,03
L307G	117,857	0,00	0,00	91,528	0,000	0,00
S308D	127,652	4,15	5,30	105,846	2,907	3,08
S308K	126,882	1,33	1,69	99,169	0,000	0,00
S308N	170,413	5,67	9,66	139,083	5,907	8,22
I309E	123,847	16,25	20,12	129,940	14,414	18,73
I309G	102,601	7,37	7,56	114,091	6,458	7,37
I309L	153,681	9,58	14,72	106,948	10,905	11,66
I309M	123,425	8,02	9,90	136,797	7,065	9,66
I309N	111,901	6,98	7,81	97,361	6,470	6,30
I309S	169,951	4,11	6,98	551,493	0,862	4,75
I309T	97,936	7,63	7,47	148,864	5,542	8,25
I309V	113,138	1,50	1,70	138,313	3,470	4,80
M310G	167,656	11,44	19,18	110,739	12,916	14,30
M310Q	107,237	27,81	29,82	106,323	28,254	30,04
M313G	138,095	9,77	13,49	109,231	10,141	11,08
M313H	271,914	3,71	10,09	197,024	3,886	7,66
M313K	118,882	0,86	1,02	107,111	0,555	0,59

TABLA 12: porcentaje (%) de actividad

	duplicado 1			duplicado 2		
	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C
M313P	103,654	4,98	5,16	132,802	4,516	6,00
M313R	157,272	4,62	7,27	32,845	8,296	2,72
M313T	162,074	7,04	11,40	99,844	7,007	7,00
M313Y	120,038	7,52	9,03	103,011	6,846	7,05
K314S	141,924	9,67	13,73	132,112	9,066	11,98
K314Y	243,011	5,75	13,98	138,931	10,989	15,27
S315A	91,372	16,51	15,08	137,153	9,973	13,68
S315H	151,244	12,06	18,24	105,305	10,867	11,44
S315Y	170,968	30,61	52,33	57,827	39,503	22,84
L317A	123,510	6,97	8,60	132,724	8,395	11,14
L317I	187,477	12,72	23,84	110,696	10,670	11,81
L317K	96,199	3,45	3,31	134,204	3,534	4,74
L317N	127,382	12,02	15,31	121,233	14,528	17,61
L317R	238,501	3,87	9,22	99,467	5,673	5,64
L317S	90,929	15,54	14,13	85,810	6,423	5,51
L317T	145,964	6,96	10,16	154,334	1,087	1,68
L317W	163,704	11,92	19,51	147,606	10,270	15,16
L318D	105,543	17,43	18,40	97,970	16,684	16,35
L318H	99,907	4,29	4,29	124,690	7,363	9,18
L318R	160,469	5,63	9,03	120,872	6,210	7,51
N321R	164,842	9,53	15,71	112,180	8,613	9,66
N321S	102,489	8,29	8,49	108,732	4,534	4,93
E324N	104,618	7,72	8,08	131,265	9,124	11,98
T325E	124,837	14,44	18,02	106,457	10,577	11,26
N328G	197,098	4,15	8,18	109,722	7,233	7,94
N328Y	180,981	10,30	18,64	100,000	10,500	10,50
T335S	107,956	11,57	12,49	125,286	6,288	7,88
Q347A	101,395	10,89	11,04	96,213	11,001	10,58
Q347G	222,459	8,37	18,63	207,054	9,013	18,66
Q349M	99,531	11,98	11,92	108,042	12,330	13,32
Q349R	147,007	11,76	17,29	104,545	13,211	13,81
V351S	130,819	0,00	0,00	100,857	0,000	0,00
I353V	132,334	10,45	13,83	138,025	11,902	16,43
N356H	100,000	8,54	8,54	130,377	3,912	5,10

TABLA 12: porcentaje (%) de actividad

	duplicado 1			duplicado 2		
	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C
N356S	51,908	0,00	0,00	125,692	2,516	3,16
S359E	135,589	10,77	14,60	135,104	9,354	12,64
S359H	110,422	0,00	0,00	100,809	0,000	0,00
P367A	167,030	12,94	21,62	127,366	13,153	16,75
P367G	115,683	0,00	0,00	122,642	0,000	0,00
P367K	125,884	5,06	6,36	66,884	10,136	6,78
P367S	74,263	14,39	10,69	88,355	16,433	14,52
D368A	121,623	1,45	1,76	81,646	2,111	1,72
D368E	166,628	9,18	15,30	97,937	11,462	11,23
D368L	108,977	0,00	0,00	109,364	0,969	1,06
D368M	119,744	2,72	3,25	103,662	2,536	2,63
D368R	164,735	10,16	16,74	118,140	11,805	13,95
D368T	107,122	2,87	3,07	126,693	3,366	4,26
N369R	161,693	6,39	10,34	74,366	6,182	4,60
A371F	180,217	6,19	11,16	76,436	5,578	4,26
A371H	957,055	1,81	17,32	89,541	1,697	1,52
A371H	111,143	0,00	0,00	95,589	8,610	8,23
A371K	136,514	12,84	17,53	114,354	12,454	14,24
A371L	695,108	1,51	10,52	107,003	2,215	2,37
A371L	104,327	0,00	0,00	60,232	1,205	0,73
A371R	#VALUE!	#VALUE!	11,03	#VALUE!	#VALUE!	14,06
A371R	121,162	0,00	0,00	97,970	2,587	2,53
A371S	147,672	8,38	12,38	131,555	16,938	22,28
L374P	392,038	5,77	22,63	123,033	7,365	9,06
E375A	88,836	0,00	0,00	134,714	2,050	2,76
E375G	126,880	10,32	13,10	139,030	14,673	20,40
E375R	163,180	13,15	21,45	116,431	19,727	22,97
K376D	113,100	12,36	13,97	165,064	5,049	8,33
K376E	100,000	13,55	13,55	153,016	10,394	15,90
K376Q	125,172	12,75	15,96	90,000	12,057	10,85
K376R	81,687	31,63	25,84	199,112	10,372	20,65
K376T	121,133	14,91	18,06	113,387	5,639	6,39
K376V	124,221	3,19	3,96	118,583	2,547	3,02
K376Y	102,812	9,24	9,50	96,139	12,985	12,48

TABLA 12: porcentaje (%) de actividad

	duplicado 1			duplicado 2		
	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C
G377D	110,871	15,72	17,43	132,357	10,550	13,96
G377E	130,445	8,04	10,49	128,402	7,401	9,50
G377H	146,855	8,34	12,25	104,837	10,117	10,61
G377K	185,922	4,42	8,21	119,751	4,989	5,97
G377R	119,708	5,87	7,03	94,749	7,137	6,76
G377S	108,609	6,91	7,51	101,106	7,877	7,96
G377T	112,557	17,14	19,29	109,036	18,279	19,93
F380W	147,077	9,97	14,67	104,881	9,253	9,70
T381S	135,827	13,41	18,21	112,559	10,315	11,61
R383I	527,820	6,33	33,44	98,328	7,522	7,40
R383S	132,894	10,50	13,96	119,466	10,545	12,60
K385A	126,096	4,64	5,85	112,706	0,000	0,00
K385Q	137,629	9,03	12,43	124,892	7,512	9,38
K385V	112,581	5,12	5,76	80,571	2,979	2,40
E389A	306,767	2,13	6,53	224,872	1,824	4,10
E389G	113,253	2,13	2,41	139,901	0,000	0,00
E389L	143,219	14,24	20,40	112,185	12,609	14,15
E389Q	135,807	11,88	16,14	99,738	12,767	12,73
E389S	165,620	0,00	0,00	93,030	0,285	0,27
E392A	112,465	7,27	8,18	155,693	6,376	9,93
E392F	115,619	3,90	4,51	143,781	3,905	5,61
E392Q	112,993	10,53	11,89	93,789	16,705	15,67
E392R	129,528	3,69	4,79	123,407	2,947	3,64
E392V	124,365	7,73	9,61	154,768	6,404	9,91
Q393F	139,966	10,59	14,82	101,647	10,171	10,34
Q393M	139,696	1,60	2,24	86,966	3,086	2,68
S395A	208,246	12,98	27,04	112,714	12,395	13,97
S395H	159,975	12,55	20,07	113,401	10,452	11,85
E396A	131,894	8,42	11,10	128,716	9,777	12,58
E396H	210,364	9,19	19,33	128,571	3,216	4,14
E396Q	122,977	10,06	12,37	95,938	10,263	9,85
E396S	156,267	2,77	4,33	111,753	2,022	2,26
Y399T	130,536	0,00	0,00	122,738	0,050	0,06
Y399V	110,592	15,98	17,68	116,018	17,801	20,65

TABLA 12: porcentaje (%) de actividad

	duplicado 1			duplicado 2		
	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C
Y399W	122,500	13,76	16,86	103,346	11,973	12,37
S401A	122,003	13,90	16,96	99,275	13,024	12,93
S401E	125,223	16,30	20,42	128,670	15,000	19,30
S404A	149,379	0,00	0,00	105,443	1,102	1,16
L406F	122,805	0,00	0,00	146,122	0,000	0,00
L406N	152,836	6,36	9,72	131,321	6,705	8,81
S407A	141,351	11,33	16,02	110,376	16,836	18,58
S407D	241,053	11,29	27,22	98,135	10,120	9,93
S407P	143,308	6,85	9,81	121,898	11,088	13,52
A412Q	146,177	9,54	13,94	99,452	8,511	8,46
A412R	140,070	8,92	12,49	123,675	9,390	11,61
A412V	146,804	4,99	7,32	101,739	5,383	5,48
D416L	120,820	17,64	21,31	127,662	15,340	19,58
D418R	117,749	7,59	8,94	112,193	10,721	12,03
A419H	241,224	8,82	21,27	188,179	5,999	11,29
A419K	191,165	10,42	19,91	2022,616	1,523	30,81
D421A	102,111	12,49	12,75	301,584	4,510	13,60
D421H	333,471	10,18	33,95	67,652	86,552	58,55
D421K	124,190	7,62	9,46	102,316	13,562	13,88
D421N	110,806	14,96	16,58	100,116	16,449	16,47
D421Q	104,370	10,72	11,18	143,630	12,400	17,81
D421R	138,783	8,85	12,28	137,964	9,778	13,49
D421S	142,171	11,00	15,64	166,162	8,564	14,23
A425G	74,810	10,61	7,94	120,947	11,137	13,47
G427Q	133,135	2,31	3,08	98,243	8,618	8,47
G427T	125,113	4,81	6,02	119,058	3,956	4,71
V428L	137,044	1,81	2,48	109,390	0,990	1,08
D431E	70,178	26,32	18,47	95,135	20,739	19,73
D431H	186,490	7,32	13,65	95,071	9,941	9,45
D431K	240,835	11,61	27,97	68,277	20,207	13,80
D431L	129,149	10,49	13,54	119,177	11,740	13,99
D431N	138,404	9,79	13,55	125,433	9,246	11,60
D431Q	232,960	10,83	25,23	109,483	10,716	11,73
D431S	78,069	7,52	5,87	88,796	9,135	8,11

TABLA 12: porcentaje (%) de actividad

	duplicado 1			duplicado 2		
	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C
F433A	147,286	9,78	14,40	99,486	12,798	12,73
F433H	140,196	13,48	18,90	87,943	16,888	14,85
F433I	108,569	11,30	12,27	86,984	16,616	14,45
F433K	91,159	11,12	10,14	342,290	3,608	12,35
F433R	128,958	10,53	13,58	133,353	9,565	12,75
F433T	161,799	13,66	22,10	134,977	19,229	25,96
F433V	1412,071	1,61	22,69	112,033	17,307	19,39
F433W	149,049	10,46	15,59	113,585	7,530	8,55
P437I	148,880	2,39	3,56	107,028	1,782	1,91
M438A	106,463	10,07	10,72	135,705	10,194	13,83
M438D	105,370	10,16	10,71	113,283	2,590	2,93
M438E	115,061	8,00	9,21	113,782	9,120	10,38
M438L	65,794	10,06	6,62	214,958	6,526	14,03
M438N	130,428	8,06	10,52	100,669	11,889	11,97
M438T	104,058	13,39	13,93	103,691	12,160	12,61
E439A	137,279	11,63	15,97	95,555	14,073	13,45
E439A	154,140	4,72	7,28	147,295	7,415	10,92
E439C	193,243	14,69	28,38	111,719	15,734	17,58
E439K	124,464	13,28	16,52	104,762	10,552	11,05
E439P	118,340	15,59	18,44	87,446	14,998	13,12
E439Q	101,589	10,67	10,84	127,358	10,648	13,56
E439T	110,891	14,36	15,93	122,975	11,322	13,92
T440D	118,877	11,52	13,69	79,518	18,426	14,65
T440H	142,296	4,46	6,34	130,928	7,553	9,89
T440M	84,722	8,83	7,48	86,929	12,774	11,10
T440P	111,931	13,54	15,16	91,205	17,272	15,75
T440S	100,436	11,17	11,22	131,174	9,810	12,87
E441F	129,315	11,25	14,55	110,874	11,410	12,65
E442G	111,216	10,24	11,39	100,210	10,965	10,99
P443E	94,377	5,14	4,85	130,704	6,789	8,87
P443F	146,612	11,22	16,45	97,932	12,322	12,07
P443G	239,171	8,56	20,48	157,960	16,385	25,88
Q444E	81,997	8,54	7,01	160,917	9,561	15,38
Q444H	150,301	8,46	12,71	119,665	10,892	13,03

TABLA 12: porcentaje (%) de actividad

	duplicado 1			duplicado 2		
	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C	% de actividad a 37 °C/4 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/37 °C	% de actividad a 37 °C + m-cresol/4 °C
Q444V	129,822	13,49	17,51	122,591	10,995	13,48
I445M	85,090	17,25	14,68	101,149	15,393	15,57
I445N	106,430	13,89	14,79	87,351	12,945	11,31
I445W	117,213	11,70	13,72	100,037	10,983	10,99
Y447E	99,579	16,55	16,48	108,969	12,849	14,00
Y447G	143,704	13,77	19,79	103,624	11,563	11,98
Y447P	139,152	13,78	19,17	107,737	12,282	13,23
control positivo (OHO)	94,998	5,23	4,97	96,871	8,456	8,19
	105,798	4,48	4,74	108,066	5,246	5,67
	100,000	3,33	3,33	82,7780	3,759	4,59
	94,762	19,07	18,07	109,539	16,529	18,11
	142,024	4,48	6,36	130,947	5,595	7,33
	45,115	20,77	9,37	68,017	11,035	7,51
	53,324	21,95	11,71	74,253	9,960	7,40
	59,581	25,24	15,04	75,872	16,231	12,31
	91,844	19,05	17,50	80,371	13,977	11,23
	93,828	13,47	12,63	96,630	19,454	18,80
	57,773	17,04	9,85	83,536	17,573	14,68
	100,000	18,56	18,56	148,226	16,239	24,07
	74,325	18,29	13,60	61,119	9,286	5,68
	98,132	8,48	8,32	87,677	10,006	8,77
	93,817	9,62	9,02	102,223	9,745	9,96
96,922	8,56	8,30	87,993	9,064	7,98	
96,648	9,91	9,58	86,891	9,938	8,63	
n/d (no disponible; por ejemplo, más allá del límite de detección)						

2. Sumario de resultados para F204P

5 Para el mutante F204P, los resultados anteriores de sobrenadante ensayado de transfección transitoria de células CHO-S incubadas en presencia de m-cresol en un ensayo de actividad enzimática de bHA mostraron que la proteína mutante F204P era altamente resistente a tratamiento con m-cresol 0,4 %. Los resultados mostraron que la actividad que permanecía después de 4 horas de incubación con m-cresol 0,4 % a 37 °C era aproximadamente igual a la actividad observada cuando la enzima se incubó a 4 °C o a 37 °C en ausencia de m-cresol. El control positivo (WT PH20 - OHO) mostró una reducción de la actividad del 75 % y 83 % el día del ensayo (como se ensaya a partir de dos transfecciones de OHO diferentes). Esto demostró que el fenótipo F204P era capaz de conservar de 60 % a 10 90 % o más de su actividad por encima de la actividad residual de la enzima de control PH20 de tipo silvestre.

15 Para confirmar la estabilidad de F204P tras tratamiento con m-cresol o exposición a temperatura aumentada, se realizó una segunda transfección de F204P por duplicado usando células CHO-S y se ensayó de nuevo sobrenadante clarificado con respecto a su estabilidad a 4 °C, a 37 °C durante 4 horas con m-cresol 0,4 % y a 37 °C

durante 4 horas sin m-cresol 0,4 %. Los resultados confirmaron que la enzima mutante F204P conservaba una alta cantidad de actividad hialuronidasa después de la incubación de 4 horas en m-cresol a 37 °C. Los resultados fueron similares a los resultados observados en la primera exploración del mutante, conservando F204P cualquiera desde 57 % hasta más de 90 % de su actividad por encima de la actividad residual de la enzima de control PH20 de tipo silvestre después de la incubación de 4 horas.

Se expone en la Tabla 13 un resumen de la actividad enzimática de F204P en comparación con el control de tipo silvestre.

n.º de transfección	Actividad Restante después de incubación de 4 h (37 °C + m-cre/37 °C)		% de Aumento Neto en la Actividad Frente a WT (37 °C)	Actividad Restante después de 4 h (37 °C + m-cre/4 °C)		% de Aumento Neto de la Actividad Frente a WT (4 °C)
	F204P	WT (OHO)		F204P	WT (OHO)	
1	73,6 %	16,4 %	57,2 %	86,0 %	25,3 %	60,7 %
2	122,3 %	25,2 %	97,1 %	109,7 %	16,6 %	93,1 %

Ejemplo 6

EXPRESIÓN A GRAN ESCALA Y PURIFICACIÓN DE VARIANTE DE ACIERTO DE PH20

1. Expresión y purificación

Se transfectó ADN del plásmido HZ24-PH20-IRES-SEAP que contenía ADNc que codificaba una de las PH20 variantes en células CHO-S monocapa como se ha descrito en general en el Ejemplo 2. Las células CHO-S se cultivaron en matraces de agitación usando medio CD-CHO complementado con GlutaMAX (8 mM). El día de la transfección, se prepararon 15 matraces de aproximadamente 300 ml de volumen que contenían las células CHO-S a una densidad aproximada de $1,0 \times 10^6$ células/ml. Cada matraz de 300 ml se transfectó usando 375 µg de ADN plasmídico que codificaba el mutante F204P combinado con 375 µl de reactivo de transfección Freestyle MAX. El ADN plasmídico transfectado tenía una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4 que contenía un cambio de codón de TTC a CCT en las posiciones de nucleótidos 1733-1735, codificando de este modo el mutante F204P. Después se permitió que las células transfectadas permanecieran en cultivo durante 96 horas, tras lo cual las células y los medios se recogieron y se agruparon. Las células se sedimentaron por centrifugación (4000 x g, 20'), y el sobrenadante se conservó para purificación de la proteína F204P (aproximadamente 4,5 litros).

El sobrenadante en bruto se concentró 10x usando un sistema de filtro de flujo tangencial (TFF) de 30 kDa (Millipore Pellicon XL, Bimax 30, volumen vacío de 200 ml; área de superficie de filtro de 50 cm²) hasta que el volumen fue de aproximadamente 450 ml. El permeado se guardó para ensayo para detectar el flujo continuo de la proteína F204P. Después se realizó un intercambio de tampón de flujo libre para el retenido usando 4 litros de tampón (NaPO₄ 10 mM; NaCl 25 mM, pH 7,2). El volumen del retenido se redujo de nuevo hasta aproximadamente 200 ml, y después se purgó el permeado restante en el sistema (volumen vacío ~200 ml) y el sistema se lavó abundantemente usando aproximadamente 50 ml de tampón para producir un producto concentrado final de aproximadamente 450 ml.

Se preparó una columna de afinidad anti-rHuPH20 acoplado IgG de conejo anti rHuPH20 purificado por afinidad a antígeno con Sepharose 4 Fast Flow activado por CNBr (GEHealth catálogo n.º 17-0981-01). Brevemente, se suspendieron 0,7 g de polvo de Sepharose 4 preactivado en HCl 1 mM en una columna de vidrio de 10 ml durante 30 minutos para permitir que el polvo se hinchara. La solución se drenó de la columna y se lavó con 15 volúmenes de gel (aproximadamente 30 ml) de HCl 1 mM por gravedad. La columna se lavó con 5 volúmenes de gel de tampón de acoplamiento (NaHCO₃ 0,1 M, NaCl 0,5 M a pH 8,3). A continuación, se añadieron 5 mg de IgG de conejo anti rHuPH20 a > 1,0 mg/ml en tampón de acoplamiento a la columna a una relación de proteína/gel de 2-3 mg/ml de gel. La columna se rotó en vertical a 4 °C durante una noche. El flujo continuo se recogió para determinación de la eficacia de acoplamiento. El gel se lavó con 2 volúmenes de gel de tampón de acoplamiento, y después se lavó y se resuspendió en etanolamina 1 M pH 9,5 durante 2 horas a temperatura ambiente para bloquear sitios activados no utilizados. El gel se lavó 6 veces con 5 volúmenes en gel por lavado alternando tampón de acoplamiento y NaAc 0,1, NaCl 0,5 M, pH 4,5. El gel se lavó después con 10 volúmenes de gel de TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5). Se determinó la eficacia de acoplamiento (1-concentración de proteína después del acoplamiento/concentración de proteína antes del acoplamiento x 100 %). El gel acoplado a anticuerpo se almacenó en TBS con NaN₃ 0,02 % a 4 °C.

El producto de sobrenadante concentrado se cargó posteriormente en una columna de afinidad anti rHuPH20 a una velocidad aproximada de 5 ml/min. La elución se realizó de acuerdo con el procedimiento convencional usando un

sistema de purificación GE™ AKTA FPLC (GE Healthcare, Producto n.º 18-1900-26), por lo que la proteína se eluyó mediante un lavado de glicina de pH bajo (glicina-HCl 0,1 M, pH 2,5) En fracciones de 1 ml. Cada fracción se neutralizó inmediatamente por la adición de 100 µl de Tris 1 M, pH 7,5.

5 La proteína eluida se ensayó resolviendo bandas proteicas en un gel de Tris-glicina de gradiente de SDS-PAGE de 4-20 %. Se usaron patrones de PM preteñidos SeeBlue®Plus2 (Life Technologies, Catálogo n.º LC5925) como patrones de peso molecular, y se usaron 50 ng de rHuPH20 (como se ha descrito en el Ejemplo 1) como un control positivo. El gel de poliacrilamida se tiñó con Instant Blue para mostrar la proteína total de cada fracción. Para confirmar que las bandas en el gel son PH20, el gel se transfirió a una membrana de PVDF (Invitrogen), que se sometió a Transferencia de Western usando un anticuerpo primario de conejo anti PH20 generado inmunizando conejos con rHuPH20 y un anticuerpo secundario de Cabra anti conejo-HRP (Calbiochem, Cat. n.º DC03L).

15 Después, se volvió a cargar el flujo continuo de la carga inicial de la columna de afinidad en la columna dos veces debido a la baja capacidad de la columna de afinidad. Todas las fracciones que contenían la proteína se combinaron después dando como resultado un volumen total que era aproximadamente de 13 ml. Este producto se dializó después durante una noche frente a cuatro litros de tampón (NaPO₄ 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,2) usando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer G2 (PCPM 20.000) con una capacidad de 15 ml. Después se cambió el tampón y el producto se dializó frente a unos segundos cuatro litros nuevos del mismo tampón. La proteína F204P se concentró después usando una columna de Centrifugación Amicon Ultra (Millipore, PCPM 10.000) hasta un volumen final de 20 aproximadamente 450 µl (10 minutos a 4000 xg).

2. Caracterización de proteína

25 La proteína purificada se caracterizó con respecto a su concentración, actividad y pureza proteica.

30 Para determinar la concentración proteica de la proteína purificada, se realizó un ELISA de cuantificación como se ha descrito en el Ejemplo 7. Además, se determinó la actividad hialuronidasa como se ha descrito en el Ejemplo 3. Se estimó que la concentración proteica después de centrifugación era de aproximadamente 400 µg/ml. La proteína purificada también se resolvió en un gel de Tris-glicina de gradiente de SDS-PAGE de 4-20 %, que después se tiñó con Instant Blue. Los resultados de tinción demostraron que la proteína era esencialmente una proteína de un único peso molecular de aproximadamente 63 kDa, similar al control de rHuPH20. No se detectaron productos degradantes apreciables por este método. Se describen en la Tabla 14 rendimientos aproximados de la proteína en diversos puntos temporales y actividad durante la purificación.

TABLA 14: caracterización de Etapas de Purificación

Etapa de Purificación	Volumen (ml)	Ensayo de Actividad		Ensayo de ELISA Cuant		Actividad Específica (U/µg)
		Actividad (U/ml)	Actividad Total (U)	Concentración Proteica (ng/ml)	Proteína Total (µg)	
Sobrenadante	4500	2,66	11.700	0,046	207	56,5
Concentración después de TFF e Intercambio de Tampón	450	42	18.900	0,4	178	105,9
Fracciones Agrupadas 5-7 después de AC, Diálisis y Conc. -A280	0,45	11.741	5283	396	180	35,3

35 La pureza de la proteína purificada se determinó por HPLC de fase inversa (RP-HPLC). El tiempo de elución desde la columna de fase inversa fue esencialmente idéntico al observado con la hialuronidasa humana recombinante (HUB), y proporciona una base para la estimación aproximada de la pureza de la muestra a aproximadamente 80-90 %.

40 Ejemplo 7

CUANTIFICACIÓN USANDO ELISA

45 La cuantificación de PH20 o variantes se realizó usando un ELISA que captura la proteína usando un anticuerpo de captura anti rHuPH20 monoclonal. Específicamente, un día antes de realizar el ELISA, se recubrieron placas de 4HBX de 96 pocillos con anticuerpo de captura (anticuerpo policlonal de conejo anti PH20 purificado con Proteína G generado por inmunización de conejos con rHuPH20; reserva de 1 mg/ml) a 1 µg/ml en fosfato 100 mM (pH 7,2) en un volumen total de 100 µl por pocillo. Las placas se almacenaron a 4 °C durante una noche. Al día siguiente, las

placas se lavaron 5x con PBS 1x a 300 µl/pocillo con un lavador de placas. Después de cada lavado, las placas se secaron por golpes suaves en servilletas de papel. Después, las placas se bloquearon con 200 µl de PBS que contenía Tween 20 (PBST 1x) por pocillo a temperatura ambiente durante 1 hora.

- 5 Los patrones y muestras se añadieron a la placa. Para generación del patrón, se diluyó nuevamente una reserva de 1 mg/ml de rHuPH20 (Ejemplo 1) a 50 µg/ml en un tampón de ensayo HEPES pH 7,4 como una reserva intermedia. Después, para los patrones, la reserva de 50 µg/ml se diluyó por duplicado en 360 µl de PBST 0,5x a 300 ng/ml para el primer patrón (primera fila). Para las otras filas convencionales, se añadieron 240 µl de PBST 0,5x a cada pocillo, y se realizaron diluciones en serie 1:3. Para las muestras de sobrenadante transfectadas, se añadieron 360 µl por pocillo por duplicado a la primera fila, y cada una se diluyó también en serie como se ha descrito anteriormente en PBST 0,5 x. Para muestras purificadas, se añadieron 100 µl por pocillo. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de incubación, las placas se lavaron 5x con PBST 1x a 300 µl/pocillo usando un lavador de placas. Después de cada lavado, las placas se secaron por golpes suaves en servilletas de papel.
- 10
- 15 Se preparó un anticuerpo anti-PH20 conjugado con HRP para detección usando un kit de conjugación de HRP (Pierce, Thermo-Fisher, Catálogo n.º 31489). Se diluyó 1 mg de un anticuerpo policlonal de conejo purificado para Proteína G generado por inmunización de conejos con rHuPH20 en 1 ml de PBS y 1 ml de tampón de kit de carbonato 2 x. A continuación, se añadieron 100 µl de peroxidasa a 1 ml de la solución de anticuerpo anterior y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se añadieron 10 µl de reserva de NaBH₄ en una campana extractora, y la muestra se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Para detener la reacción, se añadieron 20 µl de etanolamina y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. A esta se añadieron 1/25 de volumen de albúmina de suero humano 5 % (jeringa de 0,1 ml) para proporcionar una reacción de reserva de albúmina de 2 mg/ml. El pH se ajustó a aproximadamente 7,9 mediante la adición de 250 µl de Tris 1 M pH 7,4. La concentración de la reserva fue de 400 µg/ml. La solución de reserva se diluyó adicionalmente 1/10 en PBS
- 20
- 25 Tween20 (0,05 %) que contenía albúmina de suero humano 0,5 % y conservantes, y después se esterilizó por filtración. La reserva se almacenó a 4 °C o se congeló a -20 °C.

Se detectaron anticuerpos usando el anticuerpo anti PH20 conjugado con HRP que se diluyó 1000x en PBST 0,5 x. Se añadieron 100 µl del anticuerpo diluido a todos los pocillos de la placa y la placa se incubó durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron 5x con PBST 1x a 300 µl/pocillo usando un lavador de placas. Después de cada lavado, las placas se secaron por golpes suaves en servilletas de papel. Después, se añadieron 100 µl de sustrato de TMB a cada pocillo y la reacción se detuvo después de 5-10 minutos añadiendo 100 µl de solución de terminación por pocillo. La placa se leyó a DO₄₅₀.

35 **Ejemplo 8**

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PH20

- La actividad enzimática de PH20 en muestras tales como cultivos celulares, fracciones de purificación y soluciones purificadas se determinó usando un ensayo turbidimétrico, que se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando se une ácido hialurónico con cloruro de cetilpiridinio (CPC). La actividad se mide incubando PH20 con hialuronano durante un periodo de tiempo definido (30 minutos) y después precipitando el hialuronano no digerido con la adición de CDC. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm. La reducción de la turbidez resultante de la actividad enzimática en el sustrato de hialuronano es una medida de la actividad enzimática de PH20. El método se realiza usando una curva de calibración generada con diluciones de un patrón de referencia de trabajo de ensayo de PH20 (patrón de rHuPH20 generado como se ha descrito en el Ejemplo 1), y se realizan mediciones de actividad de la muestra en relación con esta curva de calibración.
- 40
- 45

- Se prepararon diluciones de la muestra y patrones en Solución de Diluyente de Enzima (NaCl 70 mM, albúmina de suero humano 0,1 % [HSA], hidrolizado de gelatina 0,67 g/l en tampón de PIPES 25 mM, pH 5,5). Las muestras se diluyeron hasta una concentración apropiada. También se preparó ácido hialurónico (HA, PM promedio de 20 – 50 kDa) de Lifecore Biomedical (Chaska, MN) a 1 mg/ml en solución de sustrato que contiene PIPES 25 mM, NaCl 70 mM a pH 5,5. Se mezclaron cantidades iguales de las dos soluciones anteriores para preparar una mezcla de reacción de 1 ml y se incubaron a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 4 ml de Solución de Cloruro de Cetilpiridinio (CPC, 5,0 mg/ml). Después de agitación vorticial breve, la turbidez de la mezcla de muestra se leyó a 640 nm y la actividad se determinó ajustando frente a una curva patrón. Se calculó la actividad específica (unidades/mg) dividiendo la actividad enzimática (U/ml) por la concentración de proteínas (mg/ml).
- 50
- 55

60 **Ejemplo 9**

ESTABILIDAD DE LA VARIANTE DE PH20 F204P EN CONSERVANTE

- Para confirmar los resultados de exploración, se formuló una cantidad que se estimó que era de aproximadamente 450 U/ml de la proteína F204P purificada como se ha descrito en el Ejemplo 6 en fosfato sódico 10 mM, pH 6,5, NaCl 120 mM, metionina 10 mM, Pluronic F-68 0,01 %, fenol 0,1 % y m-cresol 0,15 %. También se preparó un artículo de ensayo que también contenía una cantidad que se estimó que era de aproximadamente 450 U/ml de
- 65

rHuPH20 de tipo silvestre (generado como se ha descrito en el Ejemplo 1) en la misma formulación para actuar como un control. Cada solución de formulación se separó en alícuotas en 0,5 ml y se cargó en 2 ml de vidrio de borosilicato de Tipo I USP con un tapón de goma clorobutilo y un sello de aluminio. Los viales se incubaron a 5 °C, 30 °C o 37 °C. Se extrajeron muestras del incubador en diversos tiempos y se midió la actividad enzimática como se ha descrito en el Ejemplo 8.

Los resultados de las mediciones de actividad enzimática se muestran en la Tabla 15. Como puede verse, el control de tipo silvestre de rHuPH20 mostró una rápida reducción de la actividad cuando se incubó a 37 °C en presencia de conservantes fenólicos. Por el contrario, el mutante F204P no mostró ninguna pérdida significativa de actividad a lo largo del estudio. Los resultados también muestran que la actividad de PH20 se conserva después de incubación durante hasta 4 semanas a 5 °C y 30 °C en comparación con la actividad del control de tipo silvestre de rHuPH20 que no contiene la mutación. Estos resultados confirman que F204P tolera el nivel de EPB de conservante (fenol 0,1 % y m-cresol 0,15 %) y es estable a 37 °C durante hasta al menos 6 días a 5 °C y 30 °C durante más de un mes.

ID	Actividad relativa de PH20 (%) a 5 °C			Actividad relativa de PH20 (%) a 30 °C			Actividad relativa de PH20 (%) a 37 °C		
	T0	2s	4s	6d	2s	4s	2d	4d	6d
F204P	100	-	91,8	84,1	100	96,6	105	91,1	95,9
control de tipo silvestre	100	-	81,9	66,7	61,7	60,5	48,6	29,6	15,2

Ejemplo 10

ESTABILIDAD DE LA VARIANTE DE PH20 F204P EN COFORMULACIÓN DE INSULINA

Se ensayó la variante de PH20 F204P con respecto a su estabilidad en una coformulación que contenía un análogo de insulina (insulina aspart o insulina lispro).

En las coformulaciones ensayadas, la insulina lispro fue un producto comercial (Insulina Lispro: Eli Lilly Humalog® (insulina Lispro) 100 U/ml, Lote A572364).

En las coformulaciones ensayadas, el análogo de insulina aspart fue una aspart reprocesada preparada agrupando 12 viales (10 ml cada uno) de un producto comercial (Insulina Aspart: Novo Nordisk, NovoRapid® (insulina Aspart), Lote XS60195), que se concentró usando un concentrador de columna Amicon Ultracel-10 K hasta que la concentración final fue de aproximadamente 5 veces la concentración original. El análogo de insulina se precipitó mediante la adición de acetato sódico 1 M, pH 5,3 y cloruro de cinc 30 mM (ZnCl₂, EMD, Cat n.º ZX0065-1) a 1/10 del volumen de solución de proteína. La solución se colocó en hielo durante 30 minutos seguido de centrifugación a 5600 rpm durante 20 minutos en una Centrifuga Avanti J-E con rotor de cubeta oscilante JS-5,3 (Beckman Coulter). El sobrenadante se decantó y el sedimento se resuspendió y se lavó con acetato sódico 20 mM, cloruro de cinc 2 mM, solución de pH 5,5. La solución resuspendida se centrifugó como se ha descrito anteriormente. La etapa de lavado se repitió en total 5 veces. Se realizó un lavado final con acetato sódico 20 mM, pH 5,5 para retirar todos los restos de cloruro de cinc. La pasta de proteína resultante se disolvió con agua que contenía HCl 20 mM. Después de una disolución completa, se añadió Tris 250 mM, pH 10,7 a una concentración de Tris final de 20 mM. El pH de la solución resultante se ajustó de modo que el análogo de insulina se formuló como se describe posteriormente y la concentración de proteína se ajustó a aproximadamente 15-20 mg/ml. Un análogo de insulina preparado de este modo típicamente tuvo un rendimiento de aproximadamente 90 % con una concentración de conservante residual de menos de 100 veces el material de partida.

Brevemente, se generaron (3) formulaciones que contenían cada una 600 Unidades (U) de PH20-F204P o rHuPH20 de tipo silvestre (generado como se ha descrito en el Ejemplo 1) para un total de 6 formulaciones como se expone en la Tabla 16:

TABLA 16: Sumario de Formulaciones de Insulina

ID	pH	Tampón		Modificador de tonicidad	Anti-Ox	Metal	Tensioactivo	Conservantes		API	
		NaPO ₄	Tris/H Cl					Fenol	m-Cresol	PH20 (U/ml)	Análogo (mg/ml)
F1.Humalog + F204P	7,0-7,8	13,2 mM		NaCl	Metionina	Zn 0,242 mM	F68		0,315%	600	3,5
F2.Humalog + wt	7,0-7,8	13,2 mM				0,242 mM			0,315%	600	3,5
F3.Aspart + F204P	7,3		30 mM	100 mM	5 mM		0,010%	0,100 %	0,150%	600	3,5
F4.Aspart + wt	7,3		30 mM	100 mM	5 mM		0,010%	0,100 %	0,150%	600	3,5
F5.Aspart + F204P	7,3		30 mM	100 mM	5 mM		0,010%		0,315%	600	3,5
F6.Aspart+ wt	7,3		30 mM	100 mM	5 mM		0,010%		0,315%	600	3,5

Cada solución de formulación se distribuyó en alícuotas de 0,5 ml en viales de vidrio de borosilicato de Tipo I USP de 2 ml con un tapón de goma de clorobutilo y un sello de aluminio. Los viales se incubaron a 5 °C, 30 °C y 37 °C. Las muestras se retiraron del incubador en puntos temporales programados para mediciones de actividad enzimática como se ha descrito en el Ejemplo 8.

5 Los resultados de las mediciones de actividad enzimática para muestras incubadas a 37 °C, 30 °C y 5 °C se muestran en las Tablas 17-19, respectivamente. A 37 °C, la actividad enzimática de muestras que contienen rHuPH20 de tipo silvestre (F2, F4 y F6) se perdió casi totalmente en dos días de incubación. Por el contrario, después de 6 días de incubación a 37 °C, la formulación F3 y F5, que contienen PH20-F204P, perdieron solamente aproximadamente 10 % y 30 %, respectivamente. La PH20-F204P formulada en Humalog comercial (F1) perdió la mayoría de su actividad en 2 días a 37 °C más probablemente debido a la falta de NaCl en la formulación.

15 Se observó una tendencia similar para las actividades enzimáticas de ampollas incubadas a 30 °C entre PH20-F204P y rHuPH20. Para formulaciones que contienen un nivel conservante de EPA, las diferencias entre de tipo silvestre y F204P fueron drásticas (Tabla 17; F1 y F5 frente a F2 y F6). Cuando la concentración de conservante se redujo a un nivel de EPB (F3 y F4), la F204P aún rindió mejor que rHuPH20 de tipo silvestre, aunque hubo una estabilidad de rHuPH20 ligeramente mayor en comparación con las condiciones de EPA. En los niveles conservantes tanto de EPA como de EPB, PH20-F204P fue capaz de mantener su actividad hasta 14 días a 30 °C, cuando se incluyó NaCl 100 mM en la formulación.

Tabla 17. Actividad enzimática de rHuPH20 de tipo silvestre y mutante F204P incubados a 37 °C

ID	Actividad de PH20 U/ml, (% de actividad restante)				
	Actividad Inicial	2d	4d	6d	2s
F1.Humalog + F204P	583 (100%)	61 (10%)	15 (3%)	10 (2%)	-
F2.Humalog + wt	439 (100%)	4(1%)	-	-	-
F3.Aspart + F204P	625 (100%)	613 (98%)	496 (79%)	570(91%)	532 (85%)
F4.Aspart + wt	566 (100%)	58 (10%)	24 (4%)	4 (1%)	-
F5.Aspart + F204P	657 (100%)	484 (74%)	462 (70%)	478 (73%)	360 (55%)
F6.Aspart+ wt	596 (100%)	-1(0%)	-	-	-

Tabla 18. Actividad enzimática de rHuPH20 de tipo silvestre y mutante F204P incubados a 30 °C

ID	Actividad de PH20 U/ml, (% de actividad restante)			
	Actividad inicial	6d	2s	4s
F1.Humalog + F204P	583 (100%)	345 (59%)	250 (43%)	111 (19%)
F2.Humalog + wt	439 (100%)	1 (0%)	16 (4%)	-1
F3.Aspart + F204P	625 (100%)	601 (96%)	650 (104%)	579 (93%)
F4.Aspart + wt	566 (100%)	428 (76%)	390 (69%)	277 (49%)
F5.Aspart + F204P	657 (100%)	632 (96%)	655 (100%)	561 (85%)
F6.Aspart+ wt	596 (100%)	145 (24%)	65 (11%)	9 (1,5 %)

TABLA 19: Actividad enzimática a 5 °C

ID	Actividad de PH20 (U/ml) a 5 °C		
	Actividad Inicial	2s	4s
F1.Humalog + F204P	583	544	565
F2.Humalog + wt	439	428	404
F3.Aspart + F204P	625	647	607
F4.Aspart + wt	566	580	496
F5.Aspart + F204P	657	695	574
F6.Aspart+ wt	596	583	519

Ejemplo 11

ESTABILIDAD DE V58R-PH20 EN COFORMULACIÓN DE INSULINA

5 A. Estabilidad de V58R-PH20

La variante de PH20 V58R se expresó en células CHO-S como se ha descrito en el Ejemplo 2 o en el Ejemplo 6. El ADN plasmídico transfectado tenía una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4 que contenía un cambio de codón de GTG a CGG en las posiciones de nucleótidos 1295-1297, codificando de este modo el mutante V58R. El mutante V58R se ensayó con respecto a su estabilidad en una coformulación que contiene insulina aspart (análogo de insulina aspart preparado como se ha descrito en el Ejemplo 10) y en niveles de conservante de EPA o EPB. Brevemente, se generaron cuatro (4) formulaciones que contenían cada una 600 Unidades (U) de PH20-V58R o rHuPH20 de tipo silvestre (generado como se ha descrito en el Ejemplo 1) como se expone en la Tabla 20. Las formulaciones F1 y F2 representan los niveles de conservante de EPB mientras que las formulaciones F3 y F4 representan los niveles de conservante de EPA.

TABLA 20: Sumario de Formulaciones de Insulina

ID	pH	Tampón		Modificador de tonicidad	Anti-Ox	Glicerina	Metal	Tensioactivo	Conservantes		API	
		NaPO ₄	Tris/H Cl						NaCl	Metionina	Fenol	m-Cresol
F1.Aspart + V58R	7,3		30 mM	100 mM	5 mM		Zn	0,010%	0,100%	0,150%	600	3,5
F2.Aspart + rHuPH20 wt	7,3		30 mM	100 mM	5 mM			0,010%	0,100%	0,150%	600	3,5
F3.Aspart + V58R	7,3		30 mM	100 mM	5 mM			0,010%		0,315%	600	3,5
F4.Aspart+ rHuPH20 wt	7,3		30 mM	100 mM	5 mM			0,010%		0,315%	600	3,5

Cada solución de formulación se distribuyó en alícuotas de 0,5 ml en viales de vidrio de borosilicato de Tipo I USP de 2 ml con un tapón de goma de clorobutilo y un sello de aluminio. Los viales se incubaron a 30 °C y 37 °C. Las muestras se extrajeron del incubador en puntos temporales programados para mediciones de actividad enzimática como se ha descrito en el Ejemplo 8.

5 Los resultados de las mediciones de actividad enzimática para muestras incubadas a 37 °C y 30 °C se muestran en la Tabla 21 y la Tabla 22. A 37 °C, la actividad enzimática de muestras que contienen rHuPH20 de tipo silvestre (F2 y F4) se perdió casi totalmente en dos días de incubación. Por el contrario, después de 6 días de incubación a 37 °C, las formulaciones F1 (EPB) y F3 (EPA), que contenían V58R-PH20, perdieron solamente aproximadamente 25 % y 40 % de actividad, respectivamente. A 30 °C, la actividad enzimática de muestras que contenían rHuPH20 de tipo silvestre también se redujo drásticamente en presencia de niveles de conservantes de EPA o EPB en un mes de incubación, aunque hubo una pérdida ligeramente menos drástica de actividad en presencia de niveles de conservante de EPB. Por el contrario, para V58R-PH20, no hubo ninguna pérdida de actividad enzimática para ninguna de las formulaciones ensayadas hasta 1 mes.

15

Formulación	Actividad de PH20 U/ml			
	Actividad Inicial	2d	4d	6d
F1.Aspart + V58R	1350	1099	1094	1006
F2.Aspart + rHuPH20 wt	677	53	-3	-
F3.Aspart + V58R	1189	793	581	464
F4.Aspart+ rHuPH20 wt	744	12	-9	-

Formulación	Actividad de PH20 U/ml		
	Actividad Inicial	2 semanas	4 semanas
F1.Aspart + V58R	1350	1368	1208
F2.Aspart + rHuPH20 wt	677	422	256
F3.Aspart + V58R	1189	1228	1171
F4.Aspart+ rHuPH20 wt	744	21	-5

20 B. Comparación de la estabilidad de F204P y V58R

La variante de PH20 V58R-PH20 se comparó con F204P con respecto a su estabilidad en una coformulación que contenía insulina aspart (análogo de insulina aspart preparado como se ha descrito en el Ejemplo 10) y a niveles de conservante de EPA o EPB. Brevemente, se generaron ocho (8) formulaciones como se expone en la Tabla 23. Las formulaciones F1-F4 representan los niveles de conservante de EPB mientras que las formulaciones F5-F8 representan los niveles de conservantes de EPA. Las formulaciones F3 y F4 y las formulaciones F7 y F8 fueron idénticas y representan las formulaciones de control de tipo silvestre usadas para los estudios de EPB o EPA, respectivamente.

25

TABLA 23: Sumario de Formulaciones de Insulina

ID	pH	Tampón		Modificador de tonicidad	Anti-Ox	Glicerina	Metal	Tensioactivo	Conservantes		API	
		NaP O ₄	Tris/ HCl						NaCl	Metionina	Fenol	m-Cresol
F1.Aspart + V58R	7,3		30 mM	100 mM	5 mM		Zn	0,010%	0,10 0%	0,150 %	600	3,5
F2 Aspart + F204P	7,3		30 mM	100 mM	5 mM			0,010%	0,10 0%	0,150 %	600	3,5
F3.Aspart + rHuIPH20 wt(1)	7,3		30 mM	100 mM	5 mM			0,010%	0,10 0%	0,150 %	600	3,5
F4.Aspart + rHuIPH20 wt(2)	7,3		30 mM	100 mM	5 mM			0,010%	0,10 0%	0,150 %	600	3,5
F5.Aspart + V58R	7,3		30 mM	100 mM	5 mM			0,010%		0,315 %	600	3,5
F6 Aspart + F204P	7,3		30 mM	100 mM	5 mM			0,010%		0,315 %	600	3,5
F7. Aspart + rHuIPH20 wt(1)	7,3		30 mM	100 mM	5 mM			0,010%		0,315 %	600	3,5
F8.Aspart + rHuIPH20 wt(2)	7,3		30 mM	100 mM	5 mM			0,010%		0,315 %	600	3,5

Cada solución de formulación se distribuyó en alícuotas de 0,5 ml en viales de vidrio de borosilicato de Tipo I USP de 2 ml con un tapón de goma de clorobutilo y un sello de aluminio. Los viales se incubaron a 30 °C y 37 °C. Las muestras se extrajeron del incubador en puntos temporales programados para medidas de la actividad enzimática como se ha descrito en el Ejemplo 8.

5 Los resultados muestran que el porcentaje de actividad hialuronidasa en las formulaciones ensayadas después de preincubación a 37 °C fue ligeramente mayor para ambos mutantes de PH20 cuando se formularon en niveles de conservante de EPB y no de EPA. Aunque el porcentaje de actividad restante fue mayor del 80 % para ambos mutantes ensayados después de 6 días de incubación en formulaciones que contenían niveles de conservante de EPB, fue menor en presencia de niveles de conservante de EPA. Por ejemplo, la actividad restante a los 6 días en niveles de conservante de EPA fue ligeramente menor del 80 % después de 6 días para F204P-PH20, mientras que fue solamente de aproximadamente 40 % para V58R-PH20. Por lo tanto, los resultados también muestran que a 37 °C, V58R-PH20 es algo menos estable que la F204-PH20, en particular en una formulación con niveles de conservante de EPA. Después de incubación a 30 °C durante al menos una semana, las F204P-PH20 y V58R-PH20 fueron estables y mostraron casi 100 % de actividad inicial en presencia de niveles conservantes tanto de EPA como de EPB. Por el contrario, rHuPH20 mostró solamente aproximadamente 40 % de su actividad inicial después de 4 semanas a 30 °C en presencia de niveles conservantes de EPB, mientras que no mostró ninguna actividad detectable después de 4 semanas a 30 °C en presencia de niveles de conservante de EPA.

20 Ejemplo 12

EXPRESIÓN DE F204P-PH20 USANDO UN VECTOR DE EXPRESIÓN DE LENTIVIRUS

25 Se generó un vector de expresión de lentivirus pLV-EF1a-PH20(F204P)-IRES-GFP-Bsd que contenía un ADNc de hialuronidasa mutante con codones optimizados que codificaba F204P-PH20. La secuencia de pLV-EF1a-PH20(F204P)-IRES-GFPBsd se expone en SEQ ID NO: 925. El vector pLV-EF1a-PH20(F204P)-IRES-GFP contiene un gen de resistencia a ampicilina (AmpR) localizado en los nucleótidos 8611-9471, un promotor de EF1a en los restos 1933 a 2327, un IRES en los restos 4786-5370, un GFP-Bsd en los restos 5394-6527 y nucleótidos que codifican F204P-PH20 en los restos 3369-4781.

30 Se produjo lentivirus como se describe en Bandaranayake *et al.* ((2011) Nucleic Acids Research, 39: e143). Brevemente, se sembraron células 293T (ATCC) a 6×10^6 células en placas de cultivo tisular de 10 cm. Después de 24 horas, se mezclaron 6 mg de psPAX2 (SEQ ID NO: 926; plásmido Addgene n.º 12260), 3 mg de PMD2.G (SEQ ID NO: 927; plásmido Addgene n.º 12259) y 9 mg de plásmido de vector lentiviral pLV-EF1a-PH20(F204P)-IRES-GFP-Bsd en 1,5 ml de Opti-MEM (Life Technologies). Se diluyeron 45 ml de Lipofectamine 2000 (LF2000; Life Technologies) en 1,5 ml de Opti-MEM (Life Technologies). El ADN y LF2000 se mezclaron suavemente, y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir que el ADN y el lípido formaran complejos. Entre tanto, el medio de cultivo de una noche se reemplazó con 5,0 ml de DMEM + FBS 10 % sin antibióticos. Se añadió un volumen de 3,0 ml que contenía los complejos de ADN-LF2000 a las células 293T. El medio que contenía los complejos de ADN-LF2000 se reemplazaron con 10 ml de medio completo a las 12-16 horas después de la transfección. El sobrenadante se recogió a las 48 horas después de la transfección y el medio se transfirió a tubo de almacenamiento de polipropileno. El medio que contenía virus se centrifugó a 1300 rpm durante 5 minutos para sedimentar cualquier célula 293T que se portara durante la recogida. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un tubo de almacenamiento de polipropileno estéril.

45 Se cultivaron células CHO-S (Invitrogen) en medio CHO-S (Invitrogen) con agitación a 120 rpm a 37 °C y CO₂ 5 % en matraces de agitación de 125 ml purgados (Nalgene). Para transducción, se añadieron células CHO-S a pocillos de una placa de seis pocillos a 2×10^6 células por pocillo en 2 ml de medio de CHO-S que contenía bromuro de hexadimetrina 4 µg/ml a una concentración final de 4 µg/ml (Polybrene; SIGMA). Se añadió virus a cada pocillo a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 y las células se incubaron con agitación (120 rpm) a 37 °C y CO₂ 5 % durante 6 horas. Después las células se recogieron y se sedimentaron mediante centrifugación a baja velocidad (500 x g, 5 min). El medio de transducción se retiró y se reemplazó con 10 ml de medio CHO-S nuevo (Invitrogen) complementado con GlutaMax (50 ml/litro) y se transfirió a un matraz T-25. Tres días después de la infección, se añadió blasticidina (Invitrogen) al medio de cultivo a una concentración de 1 µg/ml. El medio se cambió regularmente a intervalos de 3-4 días, y las células se transfirieron a un matraz T75 para expansión. Dos semanas después de la infección inicial, las células se expandieron a matraces de agitación y se mantuvieron en cultivo usando medio que contenía blasticidina 1 µg/ml. Se recogió proteína F204-PH20 secretada al medio CHO-S y se purificó por cromatografía de afinidad usando una columna de afinidad anti-rHuPH20 como se ha descrito en el Ejemplo 6. La proteína se preparó en tampón API convencional (histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5).

60 Ejemplo 13

ANÁLISIS DE ESTRUCTURA SECUNDARIA Y TEMPERATURA DE FUSIÓN

65 La estructura secundaria y temperatura de fusión de la variante de PH20 F204P se ensayó y se comparó con rHuPH20 de tipo silvestre (generado como se ha descrito en el Ejemplo 1) para evaluar adicionalmente la estabilidad

de la variante. La estructura secundaria se ensayó por dicroísmo circular. Se empleó un Jasco J-810-150S equipado con PTC-424S para la medición espectral de DC y los espectros de DC se recogieron por Spectra Manager (Versión 1.5, Jasco). Se describen procedimientos para preparación instrumental y recogida de datos en la Tabla 24.

Parámetros	Condiciones
Caudal de nitrógeno	7,62 m ³ /h
Temperatura de la muestra	30-75 °C
Concentración de la muestra	Aprox. 0,1 mg/ml
Longitud de recorrido de la celda	1 mm
Longitud de onda	220 nm
Inclinación de los datos	1 °C
Tiempo de retardo	60 segundos
Pendiente de la temperatura	1 °C/min
Sensibilidad	convencional
Respuesta	4 segundos
Ancho de banda	1 nm

5

1. Preparación y medición de muestras

Se prepararon doscientos (200) μ l de una muestra de proteínas de 0,1 mg/ml diluida en tampón de McIlvaine (McIlvaine (1921) JBC 49:183) ajustado a pH 6,5. También se generó una serie de muestras de la variante F204P que varió en su PH por ajuste usando tampón de McIlvaine a un intervalo de pH de 5,0 a 7,5 como se expone en la Tabla 25. Además, también se generaron muestras ajustando la concentración de NaCl de 17,5 mM a 140 mM como se expone en la Tabla 26. Las muestras se filtraron usando un filtro de jeringa de 0,2 μ m antes de la medición. Se generaron muestras similares para rHuPH20. Después, se transfirieron muestras de 200 μ l a una cubeta rectangular que tenía una anchura de 1 mm y se puso en un espectropolarímetro Jasco J-810. Se recogieron los espectros de DC de las muestras en las condiciones descritas en la Tabla 20. Se calculó la temperatura de fusión (T_m) usando Spectra Manager (v 1.5, Jasco) a partir de la intensidad espectral de DC medida al intervalo de temperatura de 30 °C a 75 °C. Las cubetas se limpiaron mediante limpiador Chromerge® (C577-12, Fisher scientific) entre carga de muestra individual y después del ciclo.

10

15

pH diana	pH real	F204P (μ l)	Tampón (μ l)	Concentración de F204P (mg/ml)
5,0	4,92	25	175	0,1
5,5	5,38	25	175	0,1
6,0	5,99	25	175	0,1
6,5	6,49	25	175	0,1
7,0	7,00	25	175	0,1
7,5	7,5	25	175	0,1

20

Concentración de NaCl diana (mM)	NaCl, 2,8 M (μ l)	F204P (μ l)	Tampón a pH 6,5 (μ l)	Concentración de F204P (mg/ml)
17,5	0,00	25	175	0,1
50,0	2,32	25	172,7	0,1
75,0	4,11	25	170,9	0,1
100,0	5,89	25	169,1	0,1
140,0	8,75	25	166,3	0,1

2. Resultados

Los resultados muestran que la estructura secundaria de F204P es similar a rHuPH20. En función de la temperatura, el dicroísmo circular mostró que se midió un cambio en la absorción con temperaturas crecientes. En función del pH, la distribución de T_m fue estrechamente comparable tanto a F204P como a rHuPH20 y la mayor T_m para cada una se obtuvo entre pH 5,5 y pH 6,0. Los resultados, sin embargo, mostraron que la T_m de la variante de F204P era aproximadamente 9 °C mayor en todos los intervalos ensayados que el rHuPH20 de tipo silvestre. Este resultó indicó que el mutante F204P es más estable frente a condiciones de tensión térmica. En función de la sal, los resultados muestran que la rHuPH20 F204P y de tipo silvestre mostraron ambas una T_m creciente con mayor concentración salina, lo que muestra que ambas tienen una inclinación proporcional hacia la concentración salina.

25

30

Ejemplo 14**Evaluación de la actividad enzimática en un ensayo de dispersión de azul de tripano intradérmico**

- 5 Se evaluó la actividad de propagación de la variante de PH20 F204P usando un ensayo *in vivo* de dispersión de colorante. Brevemente, se formularon tanto la variante de PH20 F204P purificada (preparada como se ha descrito en el Ejemplo 12) como rHuPH20 de tipo silvestre (preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1) en tampón de API (Histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5) a una concentración de 10.000 U/ml. Las reservas se diluyeron adicionalmente a tres concentraciones diana de 1000, 100 y 10 U/ml por diluciones 1:10 en serie en tampón de API.
- 10 Las proteínas purificadas (bien rHuPH20 o bien F204P-PH20) se diluyeron 1:1 con Azul de Tripano 0,4 % (solución líquida 0,4 %; Catálogo n.º 15250, Invitrogen) para proporcionar una concentración final de 5, 50 y 500 U/ml de proteína, conteniendo cada uno azul de tripano 0,2 %. También se preparó un control de vehículo (tampón de API). Se usaron cuarenta y dos (42) ratones homocigotos hembra NCr nu/nu en el estudio con seis ratones usados por grupo como se expone en la Tabla 27.

15

TABLA 27: Sumario de los grupos de tratamientos para estudio de dispersión de colorante

Grupo	n.º de ratones	Artículo de ensayo	Dosis final con Azul de Tripano (Unidades/ml)	Azul de Tripano	Volumen de inyección (ml)
1	6	Control	0	0,2 %	0,04
2	6	rHuPH20	5	0,2 %	0,04
3	6	rHuPH20	50	0,2 %	0,04
4	6	rHuPH20	500	0,2 %	0,04
5	6	F204P-PH20	5	0,2 %	0,04
6	6	F204P-PH20	50	0,2 %	0,04
7	6	F204P-PH20	500	0,2 %	0,04

20

Se administraron cuarenta (40 µl) de muestras en una única inyección intradérmica. El área de dispersión de colorante se midió a los 2,5, 5, 10, 15 y 20 minutos después de la inyección y se registró por captura de imágenes fotográficas mediante fotografía del sitio de inyección con una cámara digital Nikon D29 con un micro-objetivo fijo de 60 mm. Se usó un medidor de distancia láser (Leica D3) para situar con precisión la cámara a una distancia predeterminada del área de colorante de Azul de Tripano en el animal. El área del colorante se determinó usando Image-Pro Analyzer 7.0 (MediaCybernetics, Inc). Las áreas calculadas se expresaron como mm².

25

30

Los resultados se exponen en la Tabla 28. Los resultados mostraron que la actividad de dispersión de la variante de PH20 F204P era sustancialmente idéntica a la actividad de dispersión de rHuPH20. La capacidad de aumentar el área de dispersión de colorante fue dependiente de la dosis, teniendo ambas proteínas mayor actividad a 500 U/ml. Los resultados también mostraron que el área de dispersión de colorante aumentó con el tiempo después de la inyección intra-dérmica. Las áreas de dispersión de colorante de rHuPH20 y F204P-PH20 fueron significativamente mayores que las áreas de dispersión de colorante para los controles ($p < 0,05$) en todos los puntos temporales cuando se formularon a todas las concentraciones (5, 50 y 500 U/ml) con la excepción de rHuPH20 a la menor concentración (5 U/ml). Al compararlas entre sí, rHuPH20 y F204P-PH20 mostraron efectos de dispersión similares, aunque hubo una diferencia significativa en la dispersión entre los grupos a 5 U/ml y 500 U/ml pero no a 50 U/ml. En resumen, los resultados muestran que tanto rHuPH20 como F204P-PH20 proporcionaron un aumento estadísticamente significativo del área de dispersión de colorante en comparación con el control de vehículo.

35

TABLA 28: Dispersión de Azul de Tripano

Grupo	Área (mm ²)					
	Promedio (n=6)	2,5 min	5 min	10 min	15 min	20 min
1: Control		37,44 ± 2,81	38,16 ± 3,33	43,71 ± 2,12	45,70 ± 2,38	48,77 ± 2,14
2: rHuPH20 (5 U/ml)		36,68 ± 2,83	42,31 ± 2,57	45,41 ± 2,75	46,72 ± 3,35	49,61 ± 2,97
3: rHuPH20 (50 U/ml)		39,24 ± 1,20	44,90 ± 1,44	46,96 ± 1,70	50,08 ± 2,07	53,50 ± 1,59
4: rHuPH20 (500 U/ml)		44,72 ± 1,35	50,21 ± 1,92	57,47 ± 1,29	59,77 ± 1,25	57,17 ± 3,28
5: F204P (5 U/ml)		39,65 ± 1,53	46,09 ± 2,73	48,07 ± 1,43	52,54 ± 2,01	54,11 ± 1,01
6: F204P (50 U/ml)		38,10 ± 1,92	47,07 ± 2,12	51,48 ± 2,14	55,24 ± 1,90	58,34 ± 2,89
7: F204P (500 U/ml)		46,58 ± 1,67	54,06 ± 2,52	58,96 ± 1,85	64,37 ± 1,72	64,44 ± 2,17

Ejemplo 15**Evaluación de la actividad enzimática por reconstitución de barrera dérmica**

40

Se evaluó la actividad de F204P-PH20 y se comparó con rHuPH20 para medir la cantidad de tiempo requerida para que la barrera dérmica se reconstituya después de administración de hialuronidasa intradérmica. La reconstitución dérmica se evaluó comparando la duración de la actividad de propagación de hialuronidasa como se evalúa supervisando el área de difusión de Azul de Tripano 0,4 % a lo largo del tiempo. Las proteínas usadas en el estudio

fueron variante de PH20 F204P purificada (preparada como se ha descrito en el Ejemplo 12) y rHuPH20 de tipo silvestre (preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1) que se formularon ambas en tampón de API (Histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5). Se usó vehículo (tampón de API) como un control. Se usaron ratones macho NCr nu/nu homocigotos en el estudio con tres animales por punto temporal para un total de quince ratones usados por grupo como se expone en la Tabla 29.

TABLA 29: Sumario de grupos de tratamiento para estudio de reconstitución de la barrera dérmica

Grupo	N.º de ratones	Puntos temporales (h)	Artículo de ensayo	Dosis final (Unidades/ml)	Volumen de inyección (ml)
1	15	0,5, 1, 4, 24, 48	Control	0	0,04
2	15	0,5, 1, 4, 24, 48	rHuPH20	100	0,04
3	15	0,5, 1, 4, 24, 48	F204P	100	0,04

Todos los ratones recibieron dos dosis intradérmicas de control de vehículo o rHuPH20 o F204P-PH20 a 100 U/ml en 0,04 ml en el tiempo de estudio 0. El mismo control o artículo de ensayo se inyectó en los laterales opuestos de cada animal (derecha, R; izquierda, L). Los sitios de inyección se marcaron con un marcador permanente. Se administró Tinción de Azul de Tripano (solución líquida 0,4 %; 15250, Invitrogen) a un volumen de 0,04 ml por inyección intradérmica en el mismo sitio de inyección a las 0,5, 1, 4, 24 y 48 horas después de la inyección del artículo de ensayo o control. A los 5 y 20 minutos después de la inyección de la Tinción con Azul de Tripano, se midió el área del colorante en el sitio de inyección por captura de imágenes digitales de la región como se ha descrito en el Ejemplo 14.

Los resultados se exponen en la Tabla 30. Los resultados muestran que cuando el área de dispersión de colorante se midió en diversos puntos temporales después de la administración del artículo de ensayo o control, hubo un aumento estadísticamente significativo en el área de dispersión de colorante a los 30 min y 1 hora después de la inyección de rHuPH20 o F204P-PH20. A las 4 horas después de la administración de las enzimas, sin embargo, no hubo un aumento estadísticamente significativo en el área de dispersión de colorante en comparación con el control. Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el área de dispersión de colorante entre los grupos de tratamiento de rHuPH20 y F204P-PH20. Por lo tanto, la duración de la actividad de propagación de rHuPH20 y F204P fue similar y muestra que rHuPH20 y F204P-PH20 tienen rendimiento *in vivo* comparable.

TABLA 30: Reconstitución dérmica

Punto temporal	min después de la inyección	Vehículo	RHuPH20	F204P-PH20
30	5	49,96 ± 2,05	80,84 ± 8,03	80,76 ± 4,46
	20	64,42 ± 2,49	94,55 ± 7,09	95,75 ± 5,18
1 hora	5	58,01 ± 3,21	82,56 ± 6,40	77,11 ± 3,18
	20	65,19 ± 6,21	96,19 ± 6,39	91,45 ± 1,73
4 horas	5	52,10 ± 3,47	67,19 ± 2,39	67,33 ± 3,93
	20	57,69 ± 3,92	81,15 ± 4,45	82,21 ± 4,14
24 horas	5	49,87 ± 3,25	59,01 ± 2,15	54,91 ± 3,54
	20	57,15 ± 3,47	67,65 ± 2,27	62,91 ± 3,30
48 horas	5	53,64 ± 2,99	53,53 ± 4,88	55,64 ± 7,19
	20	61,57 ± 4,02	66,33 ± 4,12	63,11 ± 5,97

Ejemplo 16

Farmacocinética *in vivo* de F204P-PH20 en comparación con rHuPH20

Se comparó la farmacocinética (PK) de rHuPH20 y F204P-PH20 después de administración intravenosa en la vena de la cola midiendo los niveles de hialuronidasa en plasma a lo largo del tiempo después de la administración. Las proteínas usadas en el estudio fueron la variante de PH20 F204P (preparada como se ha descrito en el Ejemplo 12; concentración de lote 1,02 mg/ml) y rHuPH20 de tipo silvestre (preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1; concentración de lote 0,95 mg/ml) formuladas en tampón de API (histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5). Las proteínas se prepararon a una concentración de 0,087 mg/ml en tampón de API para un volumen de dosis de aproximadamente 5 ml. Se usó como control un animal al que no se le administró proteína (control pre-dosis). Se usaron cuarenta y dos (42) ratones macho CD-1 (~20-30 gramos) en un estudio con seis animales por grupo de tratamiento como se expone en la Tabla 31.

TABLA 31: Farmacocinética de dosis intravenosa individual de rHuPH20 o F204P-PH20

Grupo	número de animales (n.º)	Artículo de ensayo	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)	Sacrificio
1	6 (n.º 1-6)	Sin tratamiento	N/D	N/D	pre-dosis
2	6 (n.º 7-12)	rHuPH20	0,433	5	1 min
3	6 (n.º 13-18)	rHuPH20	0,433	5	5 ± 1 min

Grupo	número de animales (n.º)	Artículo de ensayo	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)	Sacrificio
4	6 (n.º 19-24)	rHuPH20	0,433	5	10 ± 2 min
5	6 (n.º 25-30)	F204P-PH20	0,433	5	1 min
6	6 (n.º 21-36)	F204P-PH20	0,433	5	5 ± 1 min
7	6 (n.º 37-42)	F204P-PH20	0,433	5	10 ± 2 min

Se administró a los ratones por vía intravenosa 0,433 mg/kg de rHuPH20 o F204P-PH20 por inyección en la vena de la cola. Se obtuvieron muestras sanguíneas de animales 1 minuto, 5 minutos y 10 minutos después de la administración. Se obtuvieron muestras sanguíneas por sangrado terminal (punción cardiaca) y se recogieron en tubos de recogida de sangre que contenían el anti-coagulante EDTA para la preparación de plasma. Las muestras de sangre se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos y el plasma se retiró y se congeló a -80 °C hasta la evaluación de la actividad hialuronidasa usando el ensayo de microturbidez descrito en el Ejemplo 8.

- 5 Los resultados se exponen en la Tabla 32. Los resultados muestran que la actividad hialuronidasa no se detecta en plasma antes del tratamiento con hialuronidasa. En 1 minuto después del tratamiento con hialuronidasa rHuPH20 o F204P-PH20, hay una cantidad detectablemente alta de actividad hialuronidasa presente en el plasma, que es similar entre ambos grupos de tratamiento. A lo largo del tiempo, la actividad hialuronidasa se reduce rápidamente para ambos grupos de tratamiento, aunque hay actividad hialuronidasa detectable presente en el plasma 10 minutos después de la administración. En los puntos temporales de 5 minutos y 10 minutos después de la administración, la actividad en el plasma en animales tratados con F204P-PH20 es mayor que en animales tratados con rHuPH20. Esto muestra que F204P-PH20 muestra actividad algo mayor durante un periodo de tiempo prolongado, y por lo tanto muestra mayor semivida *in vivo* que rHuPH20.

	Punto temporal (min)							
	Predosis		1 minuto		5 minutos		10 minutos	
Proteína	n.º de animal	U/ml	n.º de animal	U/ml	n.º de animal	U/ml	n.º de animal	U/ml
RHuPH20	1	DLC	7	235 ^a	13	18,3	19	3,76
	2	DLC	8	13,5	14	7,70	20	3,70
	3	DLC	9	278	15	8,85	21	2,64
	4	DLC	10	328	16	10,5	22	2,70
	5	DLC	11	356	17	12,8	23	2,36
	6	DLC	12	287	18	18,0	24	2,80
F204-PH20	1	DLC	25	249	31	48,0	37	11,5
	2	DLC	26	223	32	21,6	38	11,4
	3	DLC	27	246	33	38,4	39	10,1
	4	DLC	28	246	34	38,6	40	12,2
	5	DLC	20	0,696	35	38,2	41	10,8
	6	DLC	30	257	36	28,5	42	10,2

DLC – Debajo del límite cuantificable < 0,625 U/ml con dilución requerida mínima - Hemolizado

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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de PH20 modificado, que comprende un reemplazo de aminoácido en un polipéptido de PH20 no modificado, donde:
- 5 el polipéptido de PH20 no modificado consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 7 o 32-66;
 el reemplazo de aminoácidos es una posición de aminoácido correspondiente a una posición 10, 12, 20, 22, 26, 34, 36, 46, 50, 52, 58, 68, 70, 74, 82, 83, 84, 86, 97, 127, 138, 142, 143, 144, 166, 169, 174, 193, 195, 196, 204, 205, 206, 213, 234, 237, 238, 240, 249, 261, 267, 277, 279, 291, 309, 310, 314, 315, 317, 318, 347, 367, 375, 376, 399, 401, 407, 416, 419, 421, 431, 433, 439, 440, 443 o 445 en referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3, a condición de que si el polipéptido de PH20 modificado incluye solamente un único reemplazo de aminoácido, el reemplazo no corresponde a los reemplazos de aminoácidos V12A o E249Q en referencia a las posiciones a los aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3,
- 10 se identifican posiciones de aminoácidos correspondientes por alineamiento del polipéptido de PH20 con el polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 3;
 el polipéptido de PH20 modificado muestra estabilidad aumentada en presencia de un conservante o conservantes fenólicos en comparación con polipéptido de PH20 no modificado que no contiene el reemplazo de aminoácido;
- 15 se manifiesta estabilidad aumentada como actividad hialuronidasa aumentada en presencia del conservante o los conservantes fenólicos en comparación con la actividad hialuronidasa del polipéptido de PH20 no modificado que no contiene el reemplazo de aminoácido en presencia del mismo o los mismos conservantes fenólicos, y la actividad se compara con las mismas condiciones.
- 20
- 25 2. El polipéptido de PH20 modificado de la reivindicación 1, donde el conservante es un conservante fenólico que es m-cresol, fenol o m-cresol y fenol.
3. El polipéptido de PH20 modificado de la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comprende al menos un reemplazo de aminoácido seleccionado de entre reemplazo con:
- 30 T en una posición correspondiente a la posición 52, K en una posición correspondiente a la posición 58, R en una posición correspondiente a la posición 58, V en una posición correspondiente a la posición 83, P en una posición correspondiente a la posición 204, M en una posición correspondiente a la posición 234, A en una posición correspondiente a la posición 261, Q en una posición correspondiente a la posición 310; and H en una posición correspondiente a la posición 421, en referencia a las posiciones de restos de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3.
- 35
4. El polipéptido de PH20 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende reemplazo con P en una posición correspondiente a la posición 204 en un polipéptido de PH20 en referencia a las posiciones de restos de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3.
- 40
5. El polipéptido de PH20 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende hasta 5 reemplazos de aminoácidos.
- 45
6. Un polipéptido de PH20 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, que comprende reemplazo con P en una posición correspondiente a la posición 204 en un polipéptido de PH20 y hasta 5 reemplazos de aminoácidos adicionales, en el que el reemplazo o los reemplazos de aminoácidos están en un polipéptido de PH20 no modificado que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3.
- 50
7. El polipéptido de PH20 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que está glucosilado.
8. El polipéptido de PH20 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que está modificado por conjugación con un polímero, por ejemplo dextrano o PEG, y/o está conjugado con un resto seleccionado de entre un dominio de multimerización, toxina, marcador detectable o fármaco.
- 55
9. Una molécula de ácido nucleico, que codifica un polipéptido de PH20 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 60
10. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9.
11. Una célula, que comprende el vector de la reivindicación 10.
12. Un método para producir un polipéptido de PH20 modificado, que comprende:
- 65 introducir el ácido nucleico de la reivindicación 9 o el vector de la reivindicación 10 en una célula capaz de incorporar restos de azúcares ligados a N en el polipéptido; y

cultivar la célula en condiciones en las que un polipéptido de PH20 modificado codificado se produce y secreta por la célula.

- 5 13. El método de la reivindicación 12 que comprende además recuperar el polipéptido expresado.
14. Una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de PH20 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, que comprende un agente terapéuticamente activo.
16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, en la que el agente terapéutico es una insulina.
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, en la que el agente terapéutico es una insulina que es una insulina de acción rápida.
- 15 18. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, en la que el agente terapéutico es una insulina de acción rápida que es una insulina regular o es un análogo de insulina.
- 20 19. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 14-18 para uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno asociado a hialuronano, o para su uso en el tratamiento de la diabetes, o para su uso en el suministro de un agente terapéutico a un sujeto.

FIGURA 1

LNFRAAPPVIPNVPF~~L~~WAWNAPSEFC~~L~~GK~~F~~DEPLDMSLFSFIGSPRINATGQ~~G~~V~~T~~I~~F~~Y~~V~~DR 60
 LGYYPYI~~D~~S~~I~~TGVTVNGGIPQ~~K~~I~~S~~LQDHLDKAKKDI~~T~~FYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWA 120
 RNWKP~~K~~DVYKNRSIELVQ~~Q~~QNVQ~~L~~SLTEATEKAKQ~~E~~FEKAGK~~D~~FLVETIKLGLKLLRPNHL 180
 WGYYLEPDCYNHHYKKPGYNGSC~~F~~NVEIKRND~~D~~LSWL~~N~~ESTALYPSIYLNTQ~~Q~~SPVAAT 240
 LYVRNRVREAIRVSKI~~P~~DAK~~S~~PLPV~~F~~A~~Y~~TR~~I~~V~~F~~T~~D~~Q~~V~~LKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
 IVIWGTLSIMRSMKSC~~L~~LLDN~~Y~~METILN~~P~~YII~~N~~VT~~L~~A~~A~~K~~M~~C~~S~~Q~~V~~LC~~Q~~E~~Q~~G~~V~~CIRK~~N~~WNSS 360
 DYLHLLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPT~~L~~E~~D~~LEQ~~F~~SEK~~F~~YCSCYSTLSCKEKADVKD~~T~~DAV 420
~~D~~VCIADGVCID~~A~~FLK~~P~~PMETE~~P~~Q~~I~~FYN~~A~~SP~~S~~TL~~S~~AT~~M~~FIV~~S~~IL~~F~~LI~~I~~SSVASL 474

FIGURA 2A

```

SEQIDNO_3
chimp_SEQIDNO_10_
LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCGLGKFFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR 60
LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCGLGKFFDEPLDMSLFSFIGSPRINVTGQDVTIFYVDR 60
*****
LGYYPYIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDI TFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWA 120
LGYYPYIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDI TFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWA 120
*****
RNWPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLKLLRPNHL 180
RNWPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLKLLRPNHL 180
*****
WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDL SWLNWNESTALYPSIYLNTOQSPVAAT 240
WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDL SWLNWNESTALYPSIYLNTOQSPVAAT 240
*****
LYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLLKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
LYVRNRVQEAIRVSKIPDAKSPLPVFVYTRIVFTDQVLLKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
*****;*****
IWIWGTL SIMRSMKSCILLDN YMETIINPYIINVTI AAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSS 360
IWIWGTL SIMRSMKSCILLDN YMETIINPYIINVTI AAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSS 360
*****
DYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYCSTLSCKEKADVKD TDV 420
DYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYCSTLSCKEKADVKD TDV 420
*****
DVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQIFY----- 447
DVCIADGVCIDAFLKPPMETEESQIFYNASPTLSATMFIVSILFLIISSVASL 474
*****

```

FIGURA 2B

```

SEQIDNO_3
Rhesus_SEQIDNO_12_
LNFRAPPVIPNVPFLWANNAPSEFCGLGKFDPEPLDMSLFSFIGSPRINATQGGVTTFYVDR 60
LNFRAPPVIPNVPFLWANNAPSEFCGLGKFDPEPLDMSLFTILMGSPRINITQGGVTTFYVDR 60
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
LGYYPYIDSTTGTVTVNGGIPOKISLQDHLDDKAKKDIIFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWA 120
LGYYPYIDLTGTVTVHGGIPOKVSLQDHLDDKSKQDILFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWA 120
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
RNWPKPDVYKNRSIELVQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVEITIKLGLKLRPNHL 180
RNWPKPDVYKNRSIELVQQNVQLSLPQATDKAKQEFKAGKDFMLEITIKLGRSLRPNHL 180
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
WGYLLFPDCYNHHYKPGYNGSCFVEIKRNDLWLNWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
WGYLLFPDCYNHHYKPGYNGSCFVEIKRNDLWLNWNESTALYPSIYLNTQQSVVAT 240
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
LYVRNRVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRVFTDQVLKFLSQDELIVYTFGETVALGASG 300
LYVRNRVREAIRVSKI PDAKNPLPVFYARLVFTDQVLKFLSREELVSTLGETVALGASG 300
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
IVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPHYIINVTLLAAKMCQVLCQEQGVCIRKWNSS 360
IVIWGSLSITRSMKSCLLLDTYMETILNPHYIINVTLLAAKMCQVLCQEQGVCIRKWNSS 360
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
DYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLLEQFSEKFCYCYSTLSCKEKADVKDIDAV 420
DYLHLNPDNFDIRLEKGGKFTVHGKPTVDELEEFSEKFCYCYTNLSCKEKADVKDIDAV 420
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
DVCIADGVCIDAFLEKPPMETE-EPQIFY----- 447
DVCIADGVCIDASLPPVETEGSPPIFYNTSSSVSTIMFIWRLEWVDQGISRIGFF 477
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

FIGURA 2C

```

SEQIDNO_3
Cyno_SEQIDNO_14_
L NFRAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFC L GKFDEPLDMSLFSF IGSPRINATGQGVTIFVDR 60
L NFRAPP IIPNVFPLWAWNAPSEFC L GKFNEPLDMSLFT LMGSPRINVTGQGV TIFVDR 60
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
SEQIDNO_3
Cyno_SEQIDNO_14_
L GYYPYIDSI TGVTVNGGIPQK I SLQDHLDKAKK DITFYMPVDNLGMAVIDWEERPTWA 120
L GYYPYID LITGVTVHGGIPQKV S LQDHLDKSKQD I LFYMPVDNLGMAVIDWEERPTWA 120
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
SEQIDNO_3
Cyno_SEQIDNO_14_
R NWKPKD VYKNRSIELVQQQNVQLS L TEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHL 180
R NWKPKD VYKNRSIELVQQQNVQLS L PQATDKAKQEF EKAGKDFMLETIKLG RSLRPNHL 180
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
SEQIDNO_3
Cyno_SEQIDNO_14_
W GYYLFPDCY NHHYKPGYNGSC FENVEIKRND DLSWLWNE STALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
W GYYLFPDCY NHHYKPGYNGSC FENVEIKRND DLSWLWNE STALYPSIYLNTQQSVVAT 240
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
SEQIDNO_3
Cyno_SEQIDNO_14_
L YVRRVREAI R VSKI PDAK S P L P V F A Y T R I V F T D Q V L K F L S Q D E L V Y T F G E T V A L G A S G 300
L YVRRVREAI R VSKI PDAK N P L P V F V Y A R I V F T D Q V L K F L S R E E L V S T L G E T V A L G A S G 300
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
SEQIDNO_3
Cyno_SEQIDNO_14_
I V I W G T L S I M R S M K S C L L L D N Y M E T I L N P Y I I N V T L A A K M C S Q V L C Q E Q G V C I R K N W N S S 360
I V I W G S L S I T R S M K S C L L L D T Y M E T I L N P Y I I N V T L A A K M C S Q V L C Q E Q G V C I R K D W N S S 360
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
SEQIDNO_3
Cyno_SEQIDNO_14_
D Y L H L N P D N F A I Q L E K G G K F T V R G K P T L E D L E Q F S E K F Y C S Y S T L S C K E K A D V K D T D A V 420
D Y L H L N P D N F D I R L E K G G K F T V H G K P T V E D L E E F S E K F Y C S Y S T L S C K E K A D V K D T D A V 420
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
SEQIDNO_3
Cyno_SEQIDNO_14_
D V C I A D G V C I D A F L K P P M E T E - E P Q I F Y ----- 447
D V C I A D G V C I D A S L K P P V E T E G S P P I F Y N T S S T V S T T M F I V N I L F L I I S S V A S L 475
*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

FIGURA 2D

```

SEQIDNO_3
bovino_SEQIDNO_16_
LNFRAPPVIPNVFPLWANNAPSEFCIG-KFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVITIFYVD 59
LDFRAPPLISNTSFLWANNAPVERCVNRRFQLPPDLRLFSVKGSPQKSATGQFITLIFYAD 60
*:*****:*. . . ***** * *: . *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: *
SEQIDNO_3
bovino_SEQIDNO_16_
RLGYYPYIDSIITGVTVNGGIPQKJISLQDHLDKAKKDIFFYMPVDNLGMAVIDWEWRPTW 119
RLGYYPHIDEKTKTGVFGGIPQLGNLKSHMEKAKNDIAYYIPNDSVGLAVIDWENWRPTW 120
*****:*. . . ***** * *: . *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: *
SEQIDNO_3
bovino_SEQIDNO_16_
ARNWPKDVYKNRSEIELVQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRPNH 179
ARNWPKDVYRDESVLVLQKNPQLSFPEASKIAKVDFFETAGKSFQETLKLGLLRPNH 180
*****:*. . . ***** * *: . *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: *
SEQIDNO_3
bovino_SEQIDNO_16_
LWGYLFPDCYNHNYKPGYNGSCFNVEIKRNDLDSLWLNWNESTALYPSIYLNT-QQSPVA 238
LWGYLFPDCYNHNNQPTYNGNCPDVEKRRNDLLEWLWKESTALFPPSVYLNIRLKSQTQN 240
*****:*. . . ***** * *: . *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: *
SEQIDNO_3
bovino_SEQIDNO_16_
ATLYVRNRVREAIRVSKI PDAKSPPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGA 298
AALYVRNRVQEAIRLSKIASVESPLPVFVYARVFTDGSSTYLSQGDVNSVGEIVSLGA 300
*:*****:*****:*****:*. . . ***** * *: * * * * * * * * * * * * * * *
SEQIDNO_3
bovino_SEQIDNO_16_
SGIVIWGTLIMRSMKSCLLLDNYMETILNPHYIINVTLLAAKMCQVLCQEQGVCIKKNWN 358
SGIIMWGSNLSLSMQSCMNLGTYLNTTLNPHYIINVTLLAAKMCQVLCQHNEGVCIRKHWN 360
*****:*. . . ***** * *: . *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: *
SEQIDNO_3
bovino_SEQIDNO_16_
SSDYHLNPNDFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLQEPSEKFCYCSYTLSCKEKADVKTDT 418
SSDYHLNPNMFAIQTEGGKYTVPGTVTLEDLQKFSDFYCSYANIHCKKRVDIKNVH 420
*****:*. . . ***** * *: . *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: *
SEQIDNO_3
bovino_SEQIDNO_16_
AVDVCIADGVCIDAFLLKP -----PMEETEPPQIFY 447
SVNVCMAEIDICIDSPVKL QPSDHSSEQEASTTFSSISPSTTTATVSPCTPEKHSPECLK 480
*:*****:*****: *
SEQIDNO_3
bovino_SEQIDNO_16_
-----PMEETEPPQIFY 447
VRCSEVIPNVTQACQSVKLNISYQSPIQNIKNQTTY 518
*:. . . * *

```

FIGURA 2E

SEQIDNO_3	LNFRAPPVIPNVFPLWANNAPSEFCGLGKDFEPLDMSLFSFIGSPRINATQGVTIFVYVDR	60
Ratón_SEQIDNO_20_	VDYRAAPILSNITFLWIWNVPTERCVGNVNDPIDLFFSLIGSPRKTATGQEVTLFVYVDR	60
	:::***::*...*** **:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *	
SEQIDNO_3	LGYYPIIDSIITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDIITFFYMPVDNLGMAVIDWEWRPTWA	120
Ratón_SEQIDNO_20_	LGLYPHIDANQAQAHY-GGIPQRGDYQAHLRKAKTDDIEHYIPDDKLGGLAIIIDWEWRPTWL	119
	** **:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *	
SEQIDNO_3	RNWKPKDYYKNRSIELVQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVEITIKGLLRPNHL	180
Ratón_SEQIDNO_20_	RNWKPKDNYRNKSIELVQSTNPGLSITEATQKAIQQFEEAGRKFMEGTLHLGKFLRPNQL	179
	***** *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *	
SEQIDNO_3	WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWSLWNESTALYPSIYLNTQQ-SPVAA	239
Ratón_SEQIDNO_20_	WGYLFPDCYNNKFPQPKYDGCBAVEKRRNDNLKWLWKAATGLYPSVYLKDLKSNRQA	239
	***** *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *	
SEQIDNO_3	TLYVRNRVREAIRVSKIPIPAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGAS	299
Ratón_SEQIDNO_20_	TLYVRVVEAIRVSKVGNASDPVPVIFVYIRIVFTDRHSEYLLLEDLVTI GEI VALGTS	299
	***** *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *	
SEQIDNO_3	GIVIWGTLSIMRSMKSCILLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCQVLCQEQGVCIRKNWNS	359
Ratón_SEQIDNO_20_	GIIWDAMSLAQRAGCPILHKYMQTTLNPYIVNVTLAAKMCQTLCKNEKGMCSRKKESS	359
	**:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *	
SEQIDNO_3	SDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYCSYTLSCKEKADVKDIDA	419
Ratón_SEQIDNO_20_	DVYLHLNPSHFDIMLTETGKYEVLGNPRVGDLEFSEHFKCSCFSRMTCKETSDVKNVQD	419
	. ***** *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *	
SEQIDNO_3	VQVCIADGVCIDAFKPP-----METEEPQIFY----- 447	
Ratón_SEQIDNO_20_	VNVCVGDNVCIKAKVEPNPAFYLLPGKSLLFMVTLGHVLYHLPQDIFVFPFRKTLVSTP	477
	::: * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *:::* * *	

FIGURA 2H

```

SEQIDNO_3
  Cobaya_SEQIDNO_29_
LNFRAPPVIPNPVFLWAWNAPSEFCIGKDFEPLDMSLFSFIGSFRINATG 50
-DKRAPPLIPNPVLLWVWNAPEFCIGGIGNQPLDMSFFSIVGTPRKNITG 49
: *****:***:*****:***:*****:***:***:***:***:***:***
SEQIDNO_3
  Cobaya_SEQIDNO_29_
QGVTLFYVDRGLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDIIFYM 100
QSITLYYVDRGLGYYPYIDPHTGAIVHGGLPQLMNLQQHLRKSQRDILLFYM 99
*.:*****:*****:***. *:***:*** :.***:*** ***** **
FVDNLGMAVIDWEEWRFPTWARKPKDVYKNRSIELVQQNVQLSLTEAT 150
PTDSVGLAVIDWEEWRFPTWRNRPKDIYRNKSIELVKSOHPQYNHSYAV 149
*.:*****:*****:***:*****:***:*****:***: * . : * .
EKAQEFKAGKDFLVETIKLGLLRPNHLMWGYLFPDCYNHHYKPKPGYN 200
AVAKRDFERTGKAFMLETLKLGKSLRPSLWGYLFPDCYNHTFTKPNYD 199
*****:***:***:***** ***** *****:***:***:***:
GSCFNVEIKRNDLWLNWNESTALYPSIYLNNTQQ-SPVAATLYVRNRVRE 249
GHCPELQNRNDLQWLWNDSTALYPSVLTSRVRSQNGALYVRNRVHE 249
* * :*:***:***:*****:***:***: * . :.*****:***
AIRVSKIPDAKSPLPVFAVTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGAS 299
SIRVSKLMDDKNPLPIYVYIRLVFTDQTTFFLELDDLVHVSVEIVPLGVS 299
:*****: * .*****:..* * :*****. ** * :***:*** *****:
GIVIWGTLSIMRSMKSCULLDNVYMETILNPHYIINVTLAAKMCQVLCQEQ 349
GIILWGSLSLTRSLVSCIGLENYMKGTLPLPYLINVTLAAKMCQVLCCKNQ 349
**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:* * * :*****:*****:***:***:
GVCIRKNWNSDYLLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLELDLEQFSEKFY 399
GICIFRKDWNTYLLHLNATNFDIELQQNGKFFVHGKPSLEDLQEFFSKNFH 399
*:* * :***:.. *****. ** * :*:***:***:***:*****:***:***:
CSCYSTLSCKEKADVDTDAVDVCIADGVCIADAFI-----KPPMET 440
CSCYTNVACKDRDLVHNRVSNVCTANNICIDAVINFPSLDDDDDEPPIITD 449
*****:***: * :*:***:***:***:*****:***:
EEPO-----IFY----- 447
DTSQNDQDISDITSSAPSSHILPKDLSWCLFLLSIFSQHWKYL 494
: . *

```


FIGURA 2J

```

SEQIDNO_3
GIBÓN_SEQIDNO_857
LNFRAPPVIPNVVFFLWAWNAPSEFCLGKFKDFEPLDMSLFSFSGSPRINATGQGVTFIFYVDR 60
LNFRAPPVIPNVVFFLWAWNAPSEFCLGKFKDFEPLDMSLFSLTSRINVTGQGVTFIFYVDR 60
*****:*****
LGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDIFFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWA 120
LGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKQDITFFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWA 120
*****:*****
RNWPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVLVETIKLGLLRPNHL 180
RNWPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLAEATEKAKQEFKAGKDFMVFETIKLGLLRPNHL 180
*****:*****
WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLDSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLDSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
*****:*****
LYVRNRVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAVTRIVFTDQVLLKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
LYVRNRVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAVTRIVFTDQVLLKFLSRDELVYTLGETVALGASG 300
*****:*****
IIVIGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPIIINVTLAAKMSQVLCQEQGVCIRKWNSS 360
IIVIGTLSIVRSMKSCLLLDNYMETILNPIIINVTLAAKMSQVLCQEQGVCIRKWNSS 360
*****:*****
DYLHLNPDNFALQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKDIDAV 420
DYLHLNPDNFALQLEKGGKFTVRGKPTPELLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKDIDAV 420
*****:*****
DVCIADGVCIDAFLLKPPMETEEPQIFY----- 447
DVCIADGVCIDAFLLKPPKETEESQIFYNASPTLSATMFIVSILFLIISSVSL 474
*****:*****

```

FIGURA 2K

```

SEQIDNO 3
TITI_SEQIDNO_859
LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKGFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFIFYVDR 60
LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKGFDEPLDMSLFSFIGSPRINVTGQGVTFIFYVDR 60
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
LGYYPIIDSIITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDIIFYMPVDNLGMAVIDWEWRPTWA 120
LGYYPIIDPTTGAVVNGGIPQKIALQDHLDKVRKDIIFYMPVDNLGMSGVIDWEWRPTWA 120
*****. **.*****:*****:*****:*****:*****:*****
RNWKPVDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVEIKLGLLRPNHL 180
RNWKPDIYKNKSIEMVQQQRNVQLNLTAQTDIAKQEFKAAKDFMLETIKLGKALRPNHL 180
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
WGYLFPDCYNHHYKPKPGYNGSCFNVEIKRNDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
WGYLFPDCYNHHYKPKPDYNGSCFNIEIKRNDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSAVAA 240
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
LYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRVFTDQVLRKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
LYVRNRVQEAIRVSKTPNANSPLPVFVYARLVFTDQVLRFLSQDELVYTLGETVALGASG 300
*****:***** *:***** *:***** *:*****:*****:*****
IWIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPIYIINTTLAAKMCQVLCQEQGVCIRKNWNSS 360
IWIWGSLSIMRSMKSCLLLDTYMETVNLNPIYIINTTLAAKMCQVLCQEQGVCIRKDWNSS 360
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
DYLHLNPDNFAIQLEKGGFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKDQDAV 420
DYLHLNPDNFAIETEKGGFTVRGKPTYEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKVKADVKDQDAV 420
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
DVCIADGVCIDAFKPPMETEEP-QIFY----- 447
DVCIADGVCIDASLKPPEKETEESQIFYNPPSSSTPSAAIFIVAILFFISCVVSL 474
*****:*****:*****:*****:*****

```

FIGURA 2L

```

SEQIDNO_3
ORANGUTÁN_SEQIDNO_861
LNFRAPPVIPNVFFLWAWNAPSEFFCLGKFDPEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFIFYVDR 60
LNFRAPPVIPNVFFLWAWNAPSEFFCLGKFDPEPLDMSLFSFIGSPRINVTGQAVTIFYVDR 60
*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
LGYYPYIDSIITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDIIFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWA 120
LGYYPYIDSIITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDIIFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWA 120
*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
RNWPKPDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHL 180
RNWPKPDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFMVFETIKLGKLLRPNHL 180
*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
WGYLFPDCCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWLNWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
WGYLFPDCCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWLNWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
LYVNRVREAIRVSKIIPDAKSPVPVAFYTRIVFTDQVLLKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
LYVNRVREAIRVSKIIPDAKSPVPVAFYTRIVFTDQVLLKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
IWIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPHYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSS 360
IWIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPHYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKDNWSS 360
*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
DYLHLNPDNFVAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAV 420
DYLHLNPDNFVAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAV 420
*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
DVCIADGVCIDAFLEKPPMETEERQIFY----- 447
DVCIADGVCIDAFLEKPPMETEERQIFYNASPSTLSATMFIWRLEVWDQGISRMGFF 476
*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```