

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 295**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2009 PCT/US2009/001670**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2009 WO09117085**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2009 E 09721669 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2271363**

54 Título: **Combinaciones y métodos para la administración subcutánea de inmunoglobulina e hialuronidasa**

30 Prioridad:

17.03.2008 US 69841 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.09.2017

73 Titular/es:

BAXALTA INCORPORATED (50.0%)
1200 Lakeside Drive
Bannockburn, IL 60015, US y
BAXALTA GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

SCHIFF, RICHARD;
LEIBL, HEINZ y
FROST, GREGORY, I.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 633 295 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**Combinaciones y métodos para la administración subcutánea de inmunoglobulina e hialuronidasa****5 Campo de la invención**

Se proporcionan combinaciones que contienen una composición de inmunoglobulina (IG) y una composición de hialuronidasa soluble formuladas para administración subcutánea. Tales productos son para uso en métodos de tratamiento de enfermedades o afecciones tratables con IG.

10

Antecedentes

La administración intravenosa (IV) de inmunoglobulina (IGIV) es el principal tratamiento de individuos con deficiencias inmunológicas. Aunque las preparaciones iniciales de IGIV causaban efectos secundarios graves, las preparaciones de IGIV disponibles en el momento presente son bien toleradas en la mayoría de pacientes con deficiencia inmunológica. Sin embargo, una pequeña proporción de pacientes continúa teniendo reacciones desagradables, incluso incapacitantes, tales como dolor de cabeza, fatiga y mialgia. La fiebre y los escalofríos siguen siendo un problema, especialmente cuando los pacientes tienen infecciones intercurrentes. Las reacciones a menudo persisten a pesar de probar otras preparaciones de IGIV o pre-medicar con acetamidofeno, difenhidramina, y corticosteroides. Adicionalmente, debido al requisito de administración IV, existen problemas con la conformidad del paciente.

La administración subcutánea (SC) de inmunoglobulina es una alternativa a la administración intravenosa. En comparación con las infusiones IV, la administración SC de inmunoglobulina tiene varias ventajas. Por ejemplo, se reduce la incidencia de reacciones sistémicas, no requiere el acceso IV a veces difícil, mejora los niveles valle, y proporciona a los pacientes una mayor independencia. Debido a la dificultad en la administración de grandes cantidades de fluido en un solo sitio, es necesario realizar infusiones SC una o dos veces a la semana, utilizando de dos a un máximo de 5 sitios a la vez. Por lo tanto, a diferencia de la IGIV, que se administra una vez al mes, la administración subcutánea realizar por lo general semanalmente. Por lo tanto, existe una necesidad de métodos alternativos para la administración de inmunoglobulina.

Melamed IR et al. (Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol 121, núm. 2, Supl 1, Febrero de 2008, página S83, y 64ª Reunión Anual de la Academia Americana de Alergias, Asma e Inmunología; Filadelfia, PA, EE.UU., 14 a 18 de marzo de 2008) describe la infusión subcutánea de Gammagard™ e hialuronidasa en sujetos inmunodeficientes.

Compendio

En la presente memoria se proporcionan combinaciones para la administración subcutánea de la inmunoglobulina y para uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones tratables con IG.

En particular, en la presente memoria se proporciona es una combinación de composiciones de inmunoglobulina (IG) y una hialuronidasa soluble para su uso para tratar una enfermedad o afección tratables con IG en un sujeto, en donde: la IG y la hialuronidasa soluble se formulan por separado para su administración subcutánea;

la IG y hialuronidasa soluble se formulan para la administración de dosificación única una vez al mes;
 la hialuronidasa soluble se administra por separado de la IG antes de la administración de la IG y en el mismo sitio que la IG;
 la concentración de IG es de 5 a 15% w/v y la cantidad de IG en la composición es de 0,5 gramos (g) a 70 g;
 la IG se formula en un volumen de líquido que es de 50 mL a 700 mL;
 la hialuronidasa soluble se formula para su administración como una razón de hialuronidasa a IG de 10 U/gramo (g) a 500 U/g de IG, con lo que la cantidad de hialuronidasa en la composición es suficiente para efectuar el aumento de la biodisponibilidad de la IG cuando se administra combinada con la IG hasta al menos 90% de la biodisponibilidad de la misma dosis única de IG administrada a través de administración intravenosa para el tratamiento de la misma enfermedad o afección tratable con IG;
 la hialuronidasa soluble se formula en un volumen de líquido que es de 5 a 30 mL; y
 la enfermedad o afección tratables con IG se seleccionan entre inmunodeficiencia; hipogammaglobulinemia adquirida secundaria a neoplasias hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC); Síndrome de Guillain-Barré; Púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; Miastenia Gravis; síndrome de Moersch-Woltmann; hipogammaglobulinemia secundaria, incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica; deficiencia de anticuerpos específicos; Encefalomielitis diseminada aguda; Vasculitis necrotizante sistémica positiva para ANCA; Anemia hemolítica autoinmunitaria; Penfigoide bulloso; Penfigoide cicatricial; síndrome de Evans, incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria con trombocitopenia inmunitaria;

60

trombocitopenia aloinmunitaria Feto-maternal/neonatal (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas de alto riesgo; neuropatía paraproteinéica de tipo IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; Síndrome opsoclono mioclono atáxico; Pénfigo foliáceo; Pénfigo vulgaris; Púrpura post-transfusión; necrólisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); Síndrome de choque tóxico; Enfermedad de Alzheimer; Lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; septicemia; tumores de células B; trauma; y una infección bacteriana, viral o fúngica.

También se describen métodos para tratar una enfermedad o afección tratables con IG en un sujeto mediante la administración al sujeto por vía subcutánea de hialuronidasa soluble y una inmunoglobulina (IG) para el tratamiento de la enfermedad o afección. La co-administración de IG e hialuronidasa aumenta la biodisponibilidad de administración subcutánea de IG para permitir la administración de IG subcutánea utilizando sustancialmente el mismo régimen de dosificación que la administración intravenosa IG (IGIV) para las enfermedades o afecciones concretas. La administración de la IG se efectúa de tal manera que la cantidad administrada y la frecuencia de administración son sustancialmente las mismas que para la administración IV (intravenosa) de la misma cantidad a través de IV para la misma enfermedad o afección. La cantidad administrada por vía IV se puede predeterminar o es conocida para las enfermedades o afecciones concretas. Típicamente, en presencia de una hialuronidasa soluble, para la administración subcutánea, la velocidad de administración puede ser mayor que para la administración IV. Por lo tanto, se puede reducir el tiempo para la administración de una dosis concreta. La velocidad de administración se puede controlar, por ejemplo mediante una bomba, o puede depender de la gravedad.

Así, entre los métodos descritos se encuentran los métodos para tratar una enfermedad o afección tratables con IG en un sujeto que necesite tal tratamiento administrando al sujeto por vía subcutánea una hialuronidasa soluble y una cantidad de la inmunoglobulina (IG) eficaces para el tratamiento de la enfermedad o afección. La administración se realiza con un régimen de dosificación en el que: (a) una cantidad de IG; y (b) una frecuencia de dosificación para las administraciones sucesivas de IG para el sujeto se seleccionan de tal manera que el efecto terapéutico de la administración IG subcutánea en sujeto es al menos sustancialmente equivalente a la administración intravenosa de la IG al sujeto utilizando el mismo régimen de dosificación.

En algunos ejemplos de los métodos descritos en la presente memoria, la biodisponibilidad de la administración subcutánea de IG es al menos aproximadamente 90% de la biodisponibilidad de la misma dosis administrada a través de la administración IV. La cantidad de hialuronidasa soluble administrada puede ser suficiente para efectuar la administración subcutánea de la IG a una dosis administrada no más de una vez al mes. En otros ejemplos, la administración de IG no es más de una vez al mes.

La hialuronidasa soluble utilizado en los métodos y usos descritos en la presente memoria puede ser PH20 o una forma truncada de la misma. Por ejemplo, la hialuronidasa soluble puede ser un PH20 ovina o bovina o humana truncada. En los casos en que se utiliza una PH20 humana truncada en los métodos y usos descritos en la presente memoria, la PH20 humana truncada puede ser seleccionada entre los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID NOS: 4-9, o variantes alélicas o otras variantes de los mismos. En un ejemplo, la hialuronidasa soluble es rHuPH20.

La IG administrada utilizando los métodos y usos en la presente memoria puede ser purificada a partir de plasma humano, tal como mediante fraccionamiento con alcohol. En algunos ejemplos, la IG se purifica adicionalmente por medio de uno cualquiera o más de una modificación química, incubación a pH 4,0 con o sin pepsina, precipitación con polietilenglicol (PEG), cromatografía de intercambio iónico, escisión enzimática, tratamiento con detergente solvente, diafiltración o ultrafiltración. Los métodos y usos descritos en la presente memoria pueden emplear IG que contiene IgG, IgA e IgM. En algunos ejemplos, la IG contiene más de 95% de IgG. Adicionalmente, la IgG puede ser monomérica. También pueden estar presentes en la IG excipientes estabilizadores de proteínas, tales como uno o más de glicina, maltosa, un poliol, albúmina sérica humana, manitol, y un detergente no iónico. En algunos ejemplos, el pH de la preparación IG está en o por encima de 4,2 a 5,4, 4,6 a 5,1 ó 4,8 a 5,0, y la concentración de proteína es o es de aproximadamente de 5 a 15% p/v, de 6 a 15% p/v, o de 8 a 12% p/v de la composición de IG. En un ejemplo, la concentración de proteína de la IG es de 10% p/v.

En la presente memoria se describen métodos y usos para el tratamiento de una enfermedad o afección tratable con IG, en la que se administran por vía subcutánea hialuronidasa soluble y una inmunoglobulina (IG) para el tratamiento de la enfermedad o afección, y la IG se infunde a una velocidad de 10 mL/hr a 300 mL/hr, por ejemplo a, o aproximadamente a 10 mL/h, 20 mL/hr, 30 mL/hr, 40 mL/hr, 50 mL/hr, 60 mL/hr, 70 mL/hr, 80 mL/hr, 90 mL/h, 100 mL/h, 150 mL/h, 200 mL/h, 250 mL/h y 300 mL/hr. La velocidad puede ser controlada por una bomba o por gravedad. En algunos ejemplos, la IG y la hialuronidasa se administran por separado, simultáneamente o de forma intermitente. Por ejemplo, la hialuronidasa se puede administrar antes de la administración de IG, por ejemplo 0,5 minutos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 20 minutos o 30 minutos antes de la administración de Ig. En otros ejemplos, la IG y la hialuronidasa están en una sola composición. En ejemplos adicionales, se administran aproximadamente o 5 gramos (g), 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g, 23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 33 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g o 40 g

de IG, y la hialuronidasa se administra a una razón (unidades de hialuronidasa/gramos de IG) en o aproximadamente 10 u/g (g), 20 u/g, 30 u/g, 35 u/g, 40 u/g, 50 u/g, 60 u/g, 70 u/g, 80 u/g, 90 u/g, 100 u/g, 150 u/g, o 300 u/g.

5 Se pueden administrar hialuronidasa soluble e IG utilizando los métodos y usos descritos en la presente memoria para tratar, por ejemplo, inmunodeficiencia; hipogammaglobulinemia adquirida secundaria a neoplasias hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC); Síndrome de Guillain-Barré; Púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; Miastenia Gravis; síndrome de Moersch-Woltmann; hipogammaglobulinemia
10 secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; Encefalomiелitis diseminada aguda; Vasculitis necrotizante sistémica positiva para ANCA; Anemia hemolítica autoinmunitaria; Penfigoide bulloso; Penfigoide cicatricial; Síndrome de Evans (incluyendo la anemia hemolítica autoinmunitaria con trombocitopenia inmunitaria); Trombocitopenia aloinmunitaria feto-maternal/neonatal (FMAIT/NAIT); Síndrome hemofagocítico; Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas de alto riesgo; Neuropatía paraproteínica de tipo IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; Síndrome opsoclon mioclono atáxico; Pénfigo foliáceo; Pénfigo vulgar; Púrpura post-transfusión; necrólisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); Síndrome de choque tóxico; Enfermedad de Alzheimer; Lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; septicemia; tumores de células B; trauma; y una infección bacteriana, viral o fúngica. En casos en que la IG y la hialuronidasa se administran para el tratamiento de una inmunodeficiencia, la inmunodeficiencia se puede
20 seleccionar entre inmunodeficiencia variable común (CVID), agammaglobulinemia congénita, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada grave (SCID), hipogammaglobulinemia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA), hipogammaglobulinemia de la infancia, y degeneración cerebelosa paraneoplásica sin anticuerpos.

25 En los casos en los que la enfermedad o afección tratable con IG es la hipogammaglobulinemia adquirida secundaria a neoplasias malignas hematológicas, el tumor maligno hematológico puede ser la leucemia linfocítica crónica (CLL), el mieloma múltiple (MM) o el linfoma de Hodgkiniano (NHL). En los casos en los que la enfermedad o afección tratable con IG es una miopatía inflamatoria, la miopatía inflamatoria puede ser polimiositis, dermatomiositis o miositis por cuerpos de inclusión.

30 En algunos ejemplos, se administran por vía subcutánea hialuronidasa soluble e IG para el tratamiento de una afección bacteriana, viral o fúngica, tal como, por ejemplo, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Pseudomonas aeruginosa* tipos A y B, *Staphylococcus aureus*, Streptococcus del grupo B, *Streptococcus pneumoniae* tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, y 23, Adenovirus de tipos 2 y 5, Citomegalovirus, Virus de Epstein Barr VCA, Virus de la hepatitis A, Virus de la hepatitis B, Virus del Herpes simple tipo 1, Virus del Herpes simple tipo 2, Influenza A, Sarampión, Parainfluenza tipos 1, 2 y 3, Polio, Virus de la Varicela zoster, *Apergillus* y *Candida albicans*.

35 En la presente memoria se proporcionan combinaciones de composiciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección tratable con IG en un sujeto, que contiene una primera composición que contiene IG formulada para la administración subcutánea de dosis única no más de una vez al mes, y una segunda composición que contiene una hialuronidasa soluble formulada para la administración de dosificación única no más de una vez al mes. Las composiciones pueden estar en un recipiente de doble cámara o en único recipiente separadas ente sí. En algunos ejemplos, la hialuronidasa se coloca en el recipiente que se va a administrar antes de la IG. El recipiente puede ser una jeringa, tubo o bote, y puede contener adicionalmente una aguja para inyección.

45 Las combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente memoria pueden contener PH20, o una forma truncada de la misma. Por ejemplo, se pueden incluir PH20 ovina, bovina o humana truncada, tal como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de los SEC ID NO: 4-9, o variantes alélicas u otras variantes de las mismas en las combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente memoria. En algunos ejemplos, la hialuronidasa soluble en la combinación es rHuPH20. Adicionalmente, la IG en las combinaciones de las composiciones se puede purificar a partir de plasma humano, y puede ser liofilizada o un líquido.

55 En algunos ejemplos, el volumen de líquido en las combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente memoria es, o es de aproximadamente, 100 mL, 150 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL o 700 mL. La IG en las combinaciones de las composiciones puede tener una concentración de proteína que es, o es aproximadamente, de 5 a 15% p/v, de 6 a 12% p/v, o de 8 a 12% p/v de la composición de IG, tal como, por ejemplo, 10% p/v. En algunos ejemplos, la IG en la composición es, o es aproximadamente, 5 gramos (g), 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g, 23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 33 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g o 40 g. La hialuronidasa puede ser un líquido. En algunos ejemplos, el volumen del líquido de hialuronidasa es, o es de
60 aproximadamente, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 20 mL o 30 mL, y la hialuronidasa es, o es aproximadamente de 10 Unidades a 500.000 Unidades, de 100 Unidades a 100.000 Unidades, de 500 Unidades a 50.000 Unidades, de 1.000 Unidades a 10.000 Unidades, de 5.000 Unidades a 7.500 Unidades, de 5.000 Unidades a 50.000 Unidades, o de 1.000 Unidades a 10.000 Unidades.

- 5 En la presente memoria se describen aquí composiciones que contienen inmunoglobulina (IG) y una hialuronidasa soluble formulada para la administración de dosificación única una vez al mes. La hialuronidasa soluble contenida en la composición puede ser PH20, o una forma truncada de la misma. Por ejemplo, se puede incluir PH20 ovina, bovina o humana truncada, tal como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de los SEC ID NO: 4-9, o variantes alélicas u otras variantes de la misma en las composiciones formuladas para la administración de dosificación única proporcionada en la presente memoria. En algunos ejemplos, la hialuronidasa soluble en la composición es rHuPH20. La IG en las composiciones puede ser purificada a partir de plasma humano, y puede ser un líquido.
- 10 En realizaciones ilustrativas, la IG en las composiciones formuladas para la administración de dosificación única proporcionada en la presente memoria tiene una concentración de proteína que es, o es aproximadamente, de 5 a 15% p/v, de 6 a 15% p/v, o de 8 a 12% p/v de composición de IG, tal como, por ejemplo, 10% p/v. La IG en la composición es, o es aproximadamente, 5 gramos (g), 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g, 23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 33 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g o 40 g, y la hialuronidasa es, o es aproximadamente, de 10 Unidades a 500.000 Unidades, de 100 Unidades a 100.000 Unidades, de 500 Unidades a 50.000 Unidades, de 1.000 Unidades a 10.000 Unidades, de 5.000 Unidades a 7.500 Unidades, de 5.000 Unidades a 50.000 Unidades, o de 1.000 Unidades a 10.000 Unidades. El volumen de líquido en la composición puede estar ser, o ser aproximadamente, de 100 mL, 150 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL o 700 mL.
- 15
- 20 En la presente memoria se describen kits que contienen combinaciones de composiciones, que contienen una primera composición que contiene IG formulada para la administración de dosificación única subcutánea no más de una vez por mes, y una segunda composición que contiene una hialuronidasa soluble formulada para la administración de dosificación única no más de una vez por mes. También se describen en la presente memoria composiciones que contienen la inmunoglobulina (IG) y una hialuronidasa soluble formulada para la administración de dosificación única una vez al mes. Opcionalmente, se pueden incluir instrucciones pueden en los kits.
- 25

Descripción detallada

Esbozo

- 30
- A. Definiciones**
 - B. Administración subcutánea de inmunoglobulina (IG)**
 - C. Inmunoglobulina**
 - D. Hialuronidasa**
- 35
- Hialuronidasa Soluble**
 - PH20 Humana Soluble**
 - PH20 Humana Recombinante Soluble (rHuPH20)**
- 40
- E. Métodos de producción de ácidos nucleicos que codifican una hialuronidasa soluble y polipéptidos de los mismos**
 - 1. Vectores y células**
 - 2. Expresión**
 - a. Células Procariotas**
 - b. Células de Levadura**
 - c. Células de Insecto**
 - d. Células de Mamífero**
 - e. Plantas**
 - 3. Técnicas de purificación**
- 45
- 50
- 55
- F. Preparación, Formulación y Administración de Polipéptidos de Inmunoglobulinas e Hialuronidasa Soluble**
 - 1. Formulaciones**
 - Polvos liofilizados**
 - 2. Dosis y Administración**
- 60
- G. Métodos de Evaluación de la Actividad, Biodisponibilidad y Farmacocinética**

1. Farmacocinética y Tolerabilidad
2. Actividad biológica

- a. Inmunoglobulina
- b. Hialuronidasa

H. Usos Terapéuticos

1. Inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos
2. Hipogammaglobulinemia adquirida secundaria a neoplasias hematológicas
3. Enfermedad de Kawasaki
4. Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica
5. Síndrome de Guillain-Barré
6. Púrpura trombocitopénica idiopática
7. Miopatías inflamatorias: polimiositis, dermatomiositis y miositis por cuerpos de inclusión
8. síndrome miasténico de Lambert-Eaton
9. Neuropatía motora multifocal
10. Miastenia gravis
11. Síndrome de Moersch-Woltmann
12. Enfermedad de Alzheimer
13. Otras enfermedades y afecciones

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

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. En caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos en la presente memoria, prevalecerán los de esta sección. Cuando se haga referencia a una URL u otro identificador o dirección, se entiende que tales identificadores pueden cambiar y que la información concreta en Internet puede aparecer y desaparecer, pero se puede encontrar buscando en Internet información equivalente. La referencia a la misma evidencia la disponibilidad y difusión pública de dicha información.

Según se utiliza en la presente memoria, "inmunoglobulina", "globulina inmune", "gamma globulina" se refieren a preparaciones de proteínas plasmáticas derivadas del plasma reunido de donantes adultos. Predominan los anticuerpos IgG; están presentes otras subclases de anticuerpos, tales como IgA e IgM. La inmunoglobulina terapéutica puede proporcionar inmunización pasiva mediante el aumento de los niveles séricos de anticuerpos circulantes de un receptor. Los anticuerpos IgG pueden, por ejemplo, unirse y neutralizar toxinas bacterianas; opsonizar patógenos; activar el complemento; y suprimir citoquinas patógenas y fagocitos a través de la interacción con citoquinas y receptores de las mismas, tales como CD5, interleuquina-1a (IL-1a), interleuquina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), y receptores de células T. La inmunoglobulina terapéutica puede inhibir la actividad de los autoanticuerpos. Las preparaciones de inmunoglobulina también incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulina intravenosa (IGIV), inmunoglobulina IV, inmunoglobulina terapéutica. La preparación de inmunoglobulina es bien conocida, e incluye nombres comerciales, tales como BayGam[®], Gamimune[®] N, Gammagard[®] S/D, Gammar[®]-P, Iveegam[®] EN, Panglobulin[®], Polygam[®] S/D, Sandoglobulina[®], Venoglobulin[®]-I, Venoglobulin[®]-S, WinRho[®] SDF y otros. Las preparaciones de inmunoglobulina se pueden obtener de plasma humano, o se producen de forma recombinante.

Según se utiliza en la presente memoria, las enfermedades o afecciones tratables con IG se refieren a cualquier enfermedad o afección para la que se utilizan las preparaciones de inmunoglobulina. Tales enfermedades y afecciones incluyen, pero no se limitan a, cualquier enfermedad en la que un aumento en los anticuerpos circulantes es paliativa, tal como, por ejemplo, inmunodeficiencia; hipogammaglobulinemia adquirida secundaria a neoplasias hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC); Síndrome de Guillain-Barré; Púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; Miastenia Gravis; síndrome Moersch-Woltmann; hipogammaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; Encefalomiелitis diseminada aguda; vasculitis necrotizante sistémica positiva para ANCA; Anemia hemolítica autoinmunitaria; Penfigoide bulloso; Penfigoide cicatricial; Síndrome de Evans (incluyendo la Anemia hemolítica autoinmunitaria con trombocitopenia inmunitaria); Trombocitopenia aloinmunitaria feto-maternal/neonatal (FMAIT/NAIT); Síndrome hemofagocítico; Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas de alto riesgo; neuropatía paraproteínica de tipo IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; Síndrome opsocloro mioclono atáxico; Pénfigo foliáceo; Pénfigo vulgar; Púrpura post-transfusión; necrólisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); Síndrome de choque

tóxico; Enfermedad de Alzheimer; Lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; septicemia; tumores de células B; trauma; y una infección bacteriana, viral o fúngica.

5 Según se utiliza en la presente memoria, régimen de dosificación se refiere a la cantidad de inmunoglobulina administrada y la frecuencia de administración. El régimen de dosificación es una función de la enfermedad o afección que debe ser tratada, y por lo tanto puede variar.

10 Según se utiliza en la presente memoria, "sustancialmente la misma que un régimen de dosificación de IG intravenosa (IGIV)" se refiere a un régimen en el que la dosis y/o frecuencia están dentro de una cantidad que es eficaz para tratar una enfermedad o afección concreta, típicamente es, o es aproximadamente, 10%, de la dosis IV o frecuencia. Las cantidades de IGIV que son eficaces para tratar una enfermedad o afección concretas son conocidas o pueden ser determinadas empíricamente por un experto en la técnica. Por ejemplo, como se ilustra a continuación, 300 mg/kg (es decir, 21 gramos suponiendo que el adulto medio pesa 70 kg) a 600 mg/kg (es decir, 42 gramos) es la dosis mensual típica de IGIV administrada a pacientes que tienen enfermedades de inmunodeficiencia primaria. Por lo tanto, la IG, cuando se administra combinada con hialuronidasa, se administra por vía subcutánea a dosis que son, o son aproximadamente, de 300 mg/kg a 600 mg/kg para el tratamiento de enfermedades de inmunodeficiencia primaria.

20 Según se utiliza en la presente memoria, la frecuencia de administración se refiere al tiempo entre dosis sucesivas de la inmunoglobulina. Por ejemplo, la frecuencia puede ser una, dos, tres, cuatro semanas, y es una función de las enfermedades o afecciones concretas tratadas. En general, la frecuencia es al menos cada dos o tres semanas, y típicamente no más de una vez al mes.

25 Según se utiliza en la presente memoria, la hialuronidasa se refiere a una enzima que degrada el ácido hialurónico. Las hialuronidasas incluyen hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.99.1), hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos (EC 3.2.1.36), e hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35). Las hialuronidasas también incluyen cualquiera de origen no humano, incluyendo, pero sin limitarse a, murino, canino, felino, leporino, aviar, bovino, ovino, porcino, equino, de peces, de ranas, bacteriano, y cualquiera de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas no humanas ilustrativas incluyen, hialuronidasas de vacas (SEQ ID NO: 10 y 11), avispa amarilla (SEQ ID NO: 12 y 13), abeja melífera (SEQ ID NO: 14), avispa de cara blanca (SEQ ID NO: 15), avispa de papel (SEQ ID NO: 16), ratón (SEQ ID NO: 17-19, 32), cerdo (SEQ ID NO: 20-21), rata (SEQ ID NO: 22-24, 31), conejo (SEQ ID NO: 25), oveja (SEQ ID NO: 26 y 27), orangután (SEQ ID NO: 28), mono cynomolgus (SEQ ID NO: 29), cobaya (SEQ ID NO: 30), *Staphylococcus aureus* (SEQ ID NO: 33), *Streptococcus pyogenes* (SEQ ID NO: 34), y *Clostridium perfringens* (SEQ ID NO: 35). Las hialuronidasas también incluyen las de origen humano. Las hialuronidasas humanas ilustrativas incluyen HYAL1 (SEQ ID NO: 36), HYAL2 (SEQ ID NO: 37), HYAL3 (SEQ ID NO: 38), HYAL4 (SEQ ID NO: 39) y PH20 (SEQ ID NO: 1). También se incluyen entre las hialuronidasas hialuronidasas solubles, que incluyen, PH20 ovina y bovina, PH20 humana soluble y rHuPH20 soluble.

40 La referencia a hialuronidasas incluyen polipéptidos de hialuronidasa precursores y polipéptidos de hialuronidasa maduros (tales como aquellos en los que se ha eliminado una secuencia señal), formas truncadas de los mismos que tienen actividad, e incluyen variantes y variantes de especie alélica, variantes codificadas por variantes de corte y empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia con los polipéptidos precursores expuestos en los SEQ ID NO: 1 y 10-39, o sus formas maduras. Por ejemplo, la referencia a hialuronidasa también incluye las variantes de polipéptidos precursores de PH20 humanos establecidos en los SEQ ID NO: 50-51. Las hialuronidasas también incluyen aquellas que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y aquellas que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, albuminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica.

50 Según se utiliza en la presente memoria, una hialuronidasa soluble se refiere a un polipéptido caracterizado por su solubilidad en condiciones fisiológicas. Las hialuronidasas solubles se pueden distinguir, por ejemplo, por su reparto en la fase acuosa de una solución de Triton X-114 calentada a 37°C (Bordier et al., (1981) J. Biol Chem., 256:1604-7). Ancladas a la membrana, tales como las hialuronidasas ancladas a lípidos, se repartirán en la fase rica en detergente, pero se repartirán en la fase pobre en detergente o acuosa después del tratamiento con Fosfolipasa-C. Entre las hialuronidasas solubles están incluidas las hialuronidasas ancladas a la membrana en las que se han eliminado o modificado una o más regiones asociadas con el anclaje de la hialuronidasa a la membrana, en donde la forma soluble conserva la actividad hialuronidasa. Las hialuronidasas solubles incluyen hialuronidasas solubles recombinantes y las contenidas en o purificadas a partir de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, extractos de testículos de ovejas o vacas. Los ejemplos de tales hialuronidasas solubles son PH20 humana soluble. Otras hialuronidasas solubles incluyen PH20 ovina (SEQ ID NO: 27) y bovina (SEQ ID NO: 11).

Según se utiliza en la presente memoria, PH20 humana soluble o sHuPH20 incluyen polipéptidos maduros que carecen de toda o una porción de la sitio de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el externo C-terminal de

manera que tras la expresión, los polipéptidos son solubles. Los polipéptidos sHuPH20 ilustrativos incluyen polipéptidos maduros que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de los SEQ ID NO: 4-9 y 47-48. Los polipéptidos precursores para tales polipéptidos sHuPH20 ilustrativos incluyen una secuencia señal. Los ejemplos de los precursores son los establecidos en los SEQ ID NO: 3 y 40-46, cada uno de los cuales contiene una secuencia señal de 35 aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1-35. Los polipéptidos HuPH20 solubles también incluyen aquellos degradados durante o después de los métodos de producción y de purificación descritos en la presente memoria.

Según se utiliza en la presente memoria, PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20) se refiere a una forma soluble de PH20 humana que se expresa de forma recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO). La rHuPH20 soluble está codificada por el ácido nucleico que incluye la secuencia señal y se expone en el SEQ ID NO: 49. También se incluyen moléculas de ADN que son variantes alélicas de las mismas y otras variantes solubles. El ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble se expresa en células CHO que secretan el polipéptido maduro. Puesto que se produce en el medio de cultivo existe heterogeneidad en el extremo C-terminal de manera que el producto incluye una mezcla de especies que pueden incluir uno cualquiera o más de los SEC ID NO: 4-9 en diversa abundancia. También se incluyen las variantes alélicas correspondientes y otras variantes, incluyendo las correspondientes a los polipéptidos PH20 humanos precursores expuestos en los SEQ ID NO: 50-51. Otras variantes pueden tener 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con cualquiera de los SEQ ID NO: 4-9 y 47-48, siempre que conserven una actividad hialuronidasa y sean solubles.

Según se utiliza en la presente memoria, 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 no se limitan a, actividad biológica, actividad catalítica o enzimática, antigenicidad (capacidad para unirse o competir con un polipéptido por la unión a un anticuerpo anti-polipéptido), inmunogenicidad, capacidad para formar multímeros, y capacidad para unirse específicamente a un receptor o ligando para el polipéptido.

Según se utiliza en la presente memoria, la actividad hialuronidasa se refiere a la capacidad de la hialuronidasa para escindir el ácido hialurónico. Los análisis *in vitro* para determinar la actividad hialuronidasa de las hialuronidasas, tales como rHuPH20 soluble, son conocidos en la técnica y se describen en la presente memoria. Los análisis ilustrativos incluyen el análisis de microturbidez descrito a continuación (véase p.ej., el Ejemplo 3) que mide la escisión del ácido hialurónico por la hialuronidasa indirectamente mediante la detección del precipitado insoluble formado cuando el ácido hialurónico no escindido se une a la albúmina sérica.

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

Según se utiliza en la presente memoria, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo ácidos peptidonucleicos (PNA) y mezclas de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser de hebra sencilla o doble. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, que están opcionalmente marcado, tal como con un marcador detectable, tal como una marca fluorescente o una radiomarca, se contemplan moléculas monocatenarias. Dichas moléculas son típicamente de una longitud tal que su diana es estadísticamente única o de bajo número de copias (típicamente menor de 5, generalmente menor de 3) para sondear o cebar una biblioteca. Generalmente una sonda o cebador contienen al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de la secuencia complementaria o idéntica a un gen de interés. Las sondas y cebadores pueden ser de 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de longitud.

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

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

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

Según se utiliza en la presente memoria, "residuo de aminoácido" se refiere a un aminoácido formado tras la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Se supone que los residuos de

5 aminoácidos descritos en la presente memoria están en la forma isomérica "L". Los residuos en la forma isomérica "D", que son así designados, pueden ser sustituidos por cualquier residuo de L-aminoácido, siempre que la propiedad funcional deseada sea conservada por el polipéptido. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino terminal de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxilo terminal de un polipéptido. Manteniendo la nomenclatura convencional de polipéptidos descrita en J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968), y adoptada en el 37 CFR □§§ 1821-1822, las abreviaturas para residuos de aminoácidos se muestran en la Tabla 1:

10

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
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

Cabe señalar que todas las secuencias de residuos de aminoácidos representadas en la presente memoria

mediante fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional del extremo amino-terminal al extremo carboxilo-terminal. Además, la frase "residuo de aminoácido" se define ampliamente para incluir los aminoácidos enumerados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 1) y aminoácidos modificados e inusuales, tales como los mencionados en el 37 CFR §§ 1821-1822. Además, se debe observar que un guión al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácidos indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos, a un grupo amino-terminal tal como NH₂ o a un grupo carboxilo-terminal tal como COOH.

Según se utiliza en la presente memoria, "aminoácidos de origen natural" se refieren a los 20 L-aminoácidos que aparecen en los polipéptidos.

Según se utiliza en la presente memoria, "aminoácido no natural" se refiere a un compuesto orgánico que tiene una estructura similar a un aminoácido natural, pero que ha sido modificado estructuralmente para imitar la estructura y reactividad de un aminoácido natural. Los aminoácidos de origen no natural incluyen de este modo, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos de origen natural e incluyen, pero no se limitan a, los isostereómeros D de los aminoácidos. Los aminoácidos no naturales se describen ejemplos de la presente memoria y son conocidos por los expertos en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, un constructo de ADN es una molécula de ADN monocatenario o bicatenario, lineal o circular que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera no encontrada en la naturaleza. Existen constructos de ADN como resultado de la manipulación humana, e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.

Según se utiliza en la presente memoria, un segmento de ADN es una porción de una molécula de ADN más grande que tiene atributos especificados. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido especificado es una porción de una molécula de ADN más larga, tal como un plásmido o fragmento de plásmido, que, cuando se lee en dirección 5' a 3', codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificado.

Según se utiliza en la presente memoria, el término polinucleótido significa un polímero mono o bicatenario de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas del extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar de fuentes naturales, sintetizar *in vitro*, o preparar a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula de polinucleótido se proporciona en la presente memoria en términos de nucleótidos (abreviado "nt") o pares de bases (abreviado "pb"). El término nucleótidos se utiliza para las moléculas de cadena sencilla o doble, donde el contexto lo permita. Cuando el término se aplica a moléculas de cadena doble se utiliza para denotar la longitud total y se entenderá que es equivalente al término pares de bases. Los expertos en la técnica reconocerán que las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en longitud y que los extremos de las mismas pueden estar escalonados; así todos los nucleótidos dentro de una molécula de doble cadena de polinucleótidos pueden no estar emparejados. Tales extremos desemparejados tendrán, en general, una longitud no superior a 20 nucleótidos.

Según se utiliza en la presente memoria, "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud puede basarse en el grado de identidad y/u homología de las secuencias de residuos y de los residuos contenidos en las mismas. Los métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas o ácidos nucleicos son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en un método de evaluación de la similitud de secuencia, dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se alinean de una manera que produce un nivel máximo de identidad entre las secuencias. "Identidad" se refiere al grado al cual las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos son invariantes. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos, y hasta cierto punto de las secuencias de nucleótidos, también puede tomar en consideración las diferencias conservativas y/o las sustituciones frecuentes en los aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservativas son aquellas que preservan las propiedades físico-químicas de los residuos implicados. Los alineamientos pueden ser globales (alineamiento de las secuencias comparadas en toda la longitud de las secuencias y que incluye todos los residuos) o locales (alineamiento de una porción de las secuencias que incluye sólo la región o regiones más similares).

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

Según se utiliza en la presente memoria, homólogo (con respecto al ácido nucleico y/o a las secuencias de

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

Que dos moléculas cualesquiera tengan secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos que sean al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% "idénticas" u "homólogas" puede determinarse utilizando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa "FASTA", utilizando, por ejemplo, los parámetros por defecto como en Pearson et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (otros programas incluyen el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1):387)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., et al., *J. Molec. Biol.* 215:403 (1990)); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, y Carillo et al. (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). Por ejemplo, se puede utilizar la función BLAST de la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología para determinar la identidad. Otros programas disponibles comercialmente o públicamente incluyen, el programa DNASTar "MegAlign" (Madison, WI) y el programa "Gap" del Genetics Computer Group de la Universidad de Wisconsin (UWG) (Madison WI). El porcentaje de homología o identidad de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico se puede determinar, por ejemplo, comparando la información de secuencia utilizando un programa de ordenador GAP (p.ej., Needleman et al. (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, revisado por Smith y Waterman ((1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482). En resumen, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos), que son similares, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto para el programa GAP puede incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov et al. (1986) *Nucl. Acids. Res.* 14:6745, como describen Schwartz y Dayhoff, eds, *ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE*, National Biomedical Research Foundation, pág. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) ninguna penalización para los huecos en el extremo.

Por lo tanto, según se utiliza en la presente memoria, el término "identidad" u "homología" representa una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de ensayo y de referencia. Según se utiliza en la presente memoria, el término al menos "90% idéntica a" se refiere a porcentaje de identidades de 90 a 99,99 con respecto a la secuencia de ácido nucleico o aminoácidos de referencia del polipéptido. La identidad a un nivel de 90% o más es indicativa del hecho de que, se supone a título ilustrativo que se compara una longitud de polipéptido de ensayo y de referencia de 100 aminoácidos. No difiere más de 10% (es decir, 10 de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de ensayo con respecto al polipéptido de referencia. Se pueden llevar a cabo comparaciones similares entre polinucleótidos de ensayo y de referencia. Tales diferencias pueden ser representadas como mutaciones puntuales distribuidas al azar a lo largo de toda la longitud de un polipéptido o pueden ser agrupadas en una o más localizaciones de longitud variable hasta el máximo permisible, p.ej. diferencia de 10/100 aminoácidos (identidad de aproximadamente 90%). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácidos nucleicos o de aminoácidos. A nivel de homología o identidades por encima de aproximadamente 85-90%, el resultado debería ser independiente del programa y del ajuste de los parámetros de los huecos; dichos altos niveles de identidad pueden evaluarse fácilmente, a menudo mediante alineamiento manual sin depender del soporte lógico.

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

Según se utiliza en la presente memoria, "cebador" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ADN dirigida por molde en condiciones apropiadas (p.ej., en presencia de cuatro nucleósidos trifosfato diferentes y un agente de polimerización, tal como ADN polimerasa, ARN polimerasa

o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Se apreciará que ciertas moléculas de ácido nucleico pueden servir como una "sonda" y como un "cebador". Un cebador, sin embargo, tiene un grupo hidroxilo en 3' para la extensión. Se puede utilizar un cebador en una variedad de métodos, incluyendo, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con transcriptasa inversa (RT)-PCR, PCR de ARN, LCR, PCR multiplex, PCR angosta, PCR de captura, PCR de expresión, RACE 3' y 5', PCR in situ, PCR mediada por ligación y otros protocolos de amplificación.

Según se utiliza en la presente memoria, "par de cebadores" se refiere a un conjunto de cebadores que incluye un cebador (aguas arriba) que hibrida con el extremo 5' de una secuencia que va a amplificarse (p.ej., mediante PCR) y un cebador 3' (aguas abajo) que hibrida con el complemento del extremo 3' de la secuencia que va a amplificarse.

Según se utiliza en la presente memoria, "hibrida específicamente" se refiere a reasociación, por emparejamiento de bases complementarias, de una molécula de ácido nucleico (p.ej. un oligonucleótido) con una molécula de ácido nucleico diana. Los expertos en la técnica están familiarizados con los parámetros *in vitro* e *in vivo* que afectan a la hibridación específica, tales como la longitud y la composición de la molécula concreta. Los parámetros particularmente relevantes para hibridación *in vitro* incluyen además de la temperatura de reasociación y de lavado, la composición del tampón y la concentración de sal. Las condiciones de lavado ilustrativas para la eliminación de las moléculas de ácido nucleicos unidas de forma no específica con alta rigurosidad son 0,1 x SSPE, SDS al 0,1%, 65°C, y con rigurosidad media son 0,2 x SSPE, SDS al 0,1%, 50°C. Las condiciones de rigurosidad equivalentes son conocidas en la técnica. El experto puede ajustar fácilmente estos parámetros para conseguir la hibridación específica de una molécula de ácido nucleico a una molécula de ácido nucleico diana apropiada para una aplicación concreta. Complementarias, cuando se refiere a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de hibridar, típicamente con menos de 25%, 15% o 5% de emparejamientos erróneos entre nucleótidos opuestos. Si fuera necesario, se especificará el porcentaje de complementariedad. Típicamente las dos moléculas se seleccionan de modo que hibridarán en condiciones de alta rigurosidad.

Según se utiliza en la presente memoria, sustancialmente idéntico a un producto significa suficientemente similar de manera que la propiedad de interés es suficientemente inalterada de manera que el producto sustancialmente idéntico se puede utilizar en lugar del producto.

Según se utiliza en la presente memoria, también se entiende que los términos "sustancialmente idéntico" o "similar" varían con el contexto como entienden los expertos en la técnica relevante.

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

Según se utiliza en la presente memoria, "alelo", que se usa indistintamente en la presente memoria con "variante alélica" se refiere a formas alternativas de un gen o porciones del mismo. Los alelos ocupan el mismo locus o posición en cromosomas homólogos. Cuando un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es 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 sustituciones, deleciones e inserciones de nucleótidos. Un alelo de un gen también puede ser una forma de un gen que contiene una mutación.

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

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

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

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

15 Según se utiliza en la presente memoria, los polipéptidos o proteínas aislados o purificados o porciones biológicamente activas de los mismos está sustancialmente libres de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido del cual deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. Se puede determinar que las preparaciones están sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables según se determina por medio de métodos de análisis convencionales, tales como cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), utilizados por los expertos en la técnica para evaluar tal pureza, o suficientemente puras de tal manera que la purificación adicional no alteraría de forma detectable las propiedades físicas y químicas, tales como actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros son conocidos por los expertos en la técnica. Un compuesto sustancialmente químicamente puro, sin embargo, puede ser una mezcla de estereoisómeros. En tales casos, la purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

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

35 Según se utiliza en la presente memoria, el término sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos incluye preparaciones de proteínas enzimáticas en las que la proteína está separada de los precursores químicos u otros agentes químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. El término incluye preparaciones de proteínas enzimáticas tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco) 20%, 10%, 5% o menos de precursores químicos o agentes químicos o componentes no enzimáticos.

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

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

50 Según se utiliza en la presente memoria, vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se utilizan para introducir un ácido nucleico heterólogo en células para la expresión o replicación del mismo. Los vectores permanecen típicamente episomales, pero pueden diseñarse para efectuar la integración de un gen o porción del mismo en un cromosoma del genoma. También se contemplan vectores que son cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de mamíferos. La selección y el uso de tales vehículos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

55 Según se utiliza en la presente memoria, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que se conecta operativamente a secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de tales fragmentos de ADN. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y pueden opcionalmente incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un intensificador, una señal de poliadenilación, y similares. Los vectores de expresión se obtienen generalmente de ADN plásmido o vírico, o pueden contener elementos de ambos. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a un constructo ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, virus recombinante u otro vector que, tras la introducción en una célula anfitriona apropiada, da como resultado la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen los que son replicables en células eucariota y/o células procariotas y aquellos que permanecen episomales o aquellos que

se integran en el genoma de la célula anfitriona.

Según se utiliza en la presente memoria, vector también incluye "vectores de virus" o "vectores virales." Los vectores virales son virus modificados genéticamente que se conectan operativamente a genes exógenos para transferir (como vehículos o lanzaderas) los genes exógenos a las células.

Según se utiliza en la presente memoria, conectado operablemente u operativamente cuando se refiere a segmentos de ADN significa que los segmentos están dispuestos de modo que funcionan en concierto para sus objetivos previstos, p.ej., la transcripción se inicia en el promotor y avanza a través del segmento codificante hasta el terminador.

Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término evaluar incluya la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteasa, o un dominio de la misma, presente en la muestra, y también de obtener un índice, proporción, porcentaje, valor visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta y la especie química realmente detectado no tiene que ser, por supuesto, el propio producto de la proteólisis, sino puede ser por ejemplo un derivado del mismo o alguna sustancia adicional. Por ejemplo, la detección de un producto de escisión de una proteína del complemento, tal como por SDS-PAGE y tinción de proteínas con azul de Coomassie.

Según se utiliza en la presente memoria, la actividad biológica se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o respuestas fisiológicas que resultan tras la administración *in vivo* de un compuesto, composición u otra mezcla. La actividad biológica, por lo tanto, abarca los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de tales compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas pueden ser observadas en sistemas *in vitro* diseñados para someter a ensayo o utilizar tales actividades. Por lo tanto, para los propósitos en la presente memoria una actividad biológica de una proteasa es su actividad catalítica en la que se hidroliza un polipéptido.

Según se utiliza en la presente memoria equivalente, cuando se refiere a dos secuencias de ácidos nucleicos, significa que las dos secuencias en cuestión codifican la misma secuencia de aminoácidos o proteínas equivalentes. Cuando equivalente se utiliza en referencia a dos proteínas o péptidos, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos con sustituciones de aminoácidos únicas que no alteran sustancialmente la actividad o función de la proteína o péptido. Cuando equivalente se refiere a una propiedad, no se necesita que la propiedad esté presente en la misma medida (p.ej., dos péptidos pueden presentar velocidades diferentes del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades son habitualmente sustancialmente iguales.

Según se utiliza en la presente memoria, "modular" y "modulación" o "alterar" se refieren a un cambio de una actividad de una molécula, tal como una proteína. Las actividades ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, actividades biológicas, tales como la transducción de señales. La modulación puede incluir un aumento de la actividad (es decir, la regulación al alza o la actividad agonística) una disminución de la actividad (es decir, la regulación a la baja o la inhibición) o cualquier otra alteración de una actividad (tal como un cambio en la periodicidad, frecuencia, duración, cinética u otro parámetro). La modulación puede ser dependiente del contexto y típicamente la modulación se compara con un estado designado, por ejemplo, la proteína de tipo salvaje, la proteína en un estado constitutivo, o la proteína como se expresa en un tipo de célula o condición designadas.

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

Según se utiliza en la presente memoria, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o más de dos o más elementos. La combinación puede ser de dos o más elementos separados, tal como dos composiciones o dos colecciones, puede ser una mezcla de los mismos, tal como una única mezcla de los dos o más elementos, o cualquier variación de los mismos. Los elementos de una combinación están generalmente asociados o relacionados funcionalmente.

Según se utiliza en la presente memoria, un kit es una combinación empaquetada que incluye opcionalmente otros elementos, tales como reactivos e instrucciones adicionales para el uso de la combinación o elementos de los mismos.

Según se utiliza en la presente memoria, "enfermedad o trastorno" se refiere a una afección patológica en un organismo como resultado de la causa o afección incluyendo, pero sin limitarse a, infecciones, afecciones adquiridas, enfermedades genéticas, y caracterizada por síntomas identificables. Las enfermedades y trastornos de interés en la presente memoria son aquellos que son tratables por medio de inmunoglobulina.

Según se utiliza en la presente memoria, "tratar" un sujeto con una enfermedad o afección significa que los síntomas del sujeto se alivian parcialmente o totalmente, o permanecen estáticos después del tratamiento. Por lo tanto el tratamiento abarca la profilaxis, terapia y/o curación. Profilaxis se refiere a la prevención de una enfermedad

potencial y/o una prevención del empeoramiento de los síntomas o de la progresión de una enfermedad. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de una preparación de inmunoglobulina y composiciones proporcionadas en la presente memoria.

- 5 Según se utiliza en la presente memoria, un agente farmacéuticamente eficaz, incluye cualquier agente terapéutico o agentes bioactivos, incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, anestésicos, vasoconstrictores, agentes dispersantes, fármacos terapéuticos convencionales, incluyendo fármacos de molécula pequeña y proteínas terapéuticas.
- 10 Según se utiliza en la presente memoria, tratamiento significa cualquier manera en la que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad u otra indicación, se mejoran o alteran beneficiosamente de otra manera.
- Según se utiliza en la presente memoria efecto terapéutico significa un efecto que resulta 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.
- 15 Según se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a un animal, incluyendo un mamífero, tal como un ser humano.
- 20 Según se utiliza en la presente memoria, un paciente se refiere a un sujeto humano.
- Según se utiliza en la presente memoria, alivio de los síntomas de una enfermedad o trastorno concreto por medio de un tratamiento, tal como mediante la administración de una composición farmacéutica u otro agente terapéutico, se refiere a cualquier disminución, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria, de los síntomas que se pueden atribuir a o asociar con la administración de la composición o del agente terapéutico.
- 25 Según se utiliza en la presente memoria, la prevención o la profilaxis se refiere a métodos en los que se reduce el riesgo de desarrollar la enfermedad o afección.
- 30 Según se utiliza en la presente memoria, 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, mejorar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.
- 35 Según se utiliza en la presente memoria, forma de dosis unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y embaladas individualmente como se conoce en la técnica.
- 40 Según se utiliza en la presente memoria, una formulación de dosificación única se refiere a una formulación para administración directa.
- Según se utiliza en la presente memoria, un "artículo de fabricación" es un producto que se fabrica y se vende. Según se utiliza en toda esta solicitud, se pretende que el término englobe composiciones de IG e hialuronidasa contenidas en los artículos de embalaje.
- 45 Según se utiliza en la presente memoria, fluido se refiere a cualquier composición que puede fluir. Así, los fluidos abarcan composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones semejantes.
- 50 Según se utiliza en la presente memoria, un "kit" se refiere a una combinación de composiciones proporcionadas en la presente memoria y otro elemento para un propósito incluyendo, pero sin limitarse a, la activación, la administración, el diagnóstico y la evaluación de una actividad biológica o propiedad. Los kits incluyen opcionalmente instrucciones para su uso.
- 55 Según se utiliza en la presente memoria, un extracto celular o producto lisado se refiere a una preparación o fracción que se prepara a partir de una célula lisada o rota.
- 60 En la presente memoria, animal incluye cualquier animal, tal como, pero sin limitarse a primates incluyendo seres humanos, gorilas y monos; roedores, tales como ratones y ratas; aves de corral, tales como pollos; rumiantes, tales como cabras, vacas, ciervos, ovejas; ganado ovino, cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen los seres humanos como animal contemplado. Las enzimas proporcionadas en la presente memoria son de cualquier origen, animal, vegetal, procariótico y fúngico. La mayoría de las enzimas son de origen animal, incluyendo origen de mamífero.

Según se utiliza en la presente memoria, un control se refiere a una muestra que es sustancialmente idéntica a la muestra de ensayo, excepto que no se trata con un parámetro de ensayo, o, si se trata de una muestra de plasma, puede ser de un voluntario normal no afectado con la afección de interés. Un control puede ser también un control interno.

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

10 Según se utiliza en la presente memoria, los intervalos y cantidades pueden expresarse como "aproximadamente" un valor o intervalo concreto. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto "aproximadamente 5 bases" significa "aproximadamente 5 bases" y también "5 bases".

15 Según se utiliza en la presente memoria, "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente se produce o no se produce, y que la descripción incluye casos en los que dicho suceso o circunstancia ocurre y casos en los que no. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo no está sustituido o está sustituido.

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

B. Administración subcutánea de inmunoglobulina (IG)

25 En la presente memoria se describen métodos y usos para el tratamiento de enfermedades y afecciones tratables con IG mediante administración subcutánea de inmunoglobulina (IG) en combinación con una hialuronidasa soluble. Por lo tanto, también se proporcionan combinaciones de IG y una hialuronidasa soluble. En virtud de la capacidad de la hialuronidasa para romper el ácido hialurónico en la matriz extracelular, la hialuronidasa facilita infusiones subcutáneas de agentes terapéuticos. La inmunoglobulina es un agente terapéutico que se proporciona principalmente mediante administración intravenosa para el tratamiento de individuos con deficiencias inmunológicas, referido como terapia IGIV. La biodisponibilidad de IG en presencia de hialuronidasa es mayor que 30 90% de la biodisponibilidad de IG después del tratamiento IGIV. Por lo tanto, en los métodos y el uso descritos en la presente memoria, la terapia combinada de hialuronidasa e IG permite la administración subcutánea de la inmunoglobulina a dosificaciones y frecuencias que son similares al tratamiento IGIV. Así, por ejemplo, en los métodos y usos descritos en la presente memoria, la IG, cuando se administra por vía subcutánea en presencia de una hialuronidasa soluble, se puede administrar una vez al mes a dosis de IGIV prevalentes para la indicación concreta. Adicionalmente, debido a que la hialuronidasa actúa abriendo los canales de flujo en la piel ésta puede acelerar las tasas de infusión. Por lo tanto, los métodos de administración subcutánea IG co-formulada y/o co-administrada con hialuronidasa aumentan las tasas de infusión, y por lo tanto disminuyen el tiempo de suministro de la terapia de IG.

La formación de anticuerpos defectuosa es la anomalía más común en la mayoría de enfermedades de inmunodeficiencia primaria (PID); se refleja más a menudo por una disminución de las inmunoglobulinas séricas, que a su vez conduce a una mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas, especialmente del tracto sinopulmonar. 45 La disminución de los niveles de inmunoglobulina se encuentra en individuos que tienen defectos de anticuerpos tales como agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, delección de la cadena pesada de inmunoglobulina, deficiencia selectiva de la subclase de inmunoglobulina G (IgG), inmunodeficiencia variable común, o síndrome de hiperinmunoglobulina M ligado a X. La disminución de los niveles de inmunoglobulina también se encuentra en individuos que tienen inmunodeficiencias combinadas debidas a defectos en células T y B, tales como, pero sin limitarse a, inmunodeficiencia combinada grave o Síndrome de Wiskott-Aldrich (Comité Científico IUIS, 1999).

Los individuos con estas enfermedades requieren terapia de reemplazo con productos de inmunoglobulina para prevenir o reducir la gravedad de las infecciones. Inicialmente, la terapia de reemplazo de inmunoglobulina se administraba por vía intramuscular, pero a partir de 1981, la inmensa mayoría de los pacientes han sido tratados por 55 vía intravenosa (IV). Actualmente, la mayoría de los productos de inmunoglobulina en los Estados Unidos son para administración IV. Sin embargo, se han desarrollado más recientemente preparaciones de inmunoglobulina para administración subcutánea (Gardulf et al. (2006) Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 6: 434-42; Gardulf et al. (2006) J. Clin. Immunol., 26: 177-85; Ochs et al (2006) J. Clin. Immunol., 26:265-73). Al menos un producto, Vivaglobin[®], está aprobado para la administración subcutánea.

60 Todas las preparaciones de inmunoglobulina utilizadas en la actualidad se formulan al 16%, en comparación con las preparaciones de IGIV formuladas de 5 a 12%. La concentración más alta con respecto a las preparaciones IV permite volúmenes de infusión más pequeños; tales preparaciones no pueden ser infundidas por vía intravenosa. Se considera que tales métodos subcutáneos de terapia de reemplazo de inmunoglobulina son eficaces, seguros y

también muy apreciados por los pacientes, ya que tienen un bajo riesgo de reacciones adversas sistémicas y conducen a una mayores concentraciones séricas de IgG en comparación con las infusiones mensuales IV (Gardulf et al. (1995) J. Adv. Nurs., 21: 917-27 ; Gardulf et al. (1993) Clin Exp Immunol., 92: 200-4; Gardulf et al. (1991) Lancet, 338: 162-6).

5 La biodisponibilidad de la inmunoglobulina administrada por vía subcutánea en general es menor que la infusión por vía intravenosa. La inmunoglobulina está disponible inmediatamente en la sangre, y poco a poco se equilibra con el compartimento extra-vascular durante 3 a 5 días (Schiff et al (1986) J. Clin. Immunol., 6:256-64). Por vía subcutánea la inmunoglobulina administrada se absorbe lentamente del espacio subcutáneo a la sangre y al mismo tiempo se equilibra con el compartimento extra-vascular; no hay pico alto IV. La biodisponibilidad no se ha estudiado ampliamente, pero en una prueba reciente de la preparación de ZLB-Behring (es decir Vivaglobin[®]), se determinó midiendo el área bajo la curva (AUC) que sólo 67% de la inmunoglobulina era absorbida y por lo tanto, la dosis recomendada era 137% de la dosis IV (Ochs et al (2006) J. Clin. Immunol., 26:265-73). A pesar de las dificultades técnicas de la comparación de AUC para 2 rutas y frecuencias de administración diferentes, los estudios de administración por vía intradérmica de inmunoglobulina en conejos sugieren que hay una disminución de la biodisponibilidad a través de la vía subcutánea. Esto puede ser debido al modo de absorción de grandes moléculas de proteína, que no puede difundirse fácilmente a través de las paredes capilares y deben ser absorbidas a través de los vasos linfáticos (Supersaxo et al (1990) Pharm. Res., 7: 167-9).

20 Además de los problemas con la biodisponibilidad asociados con la administración subcutánea de IG, la principal desventaja de la administración subcutánea es que sólo se pueden infundir volúmenes pequeños en cada sitio, haciendo necesario el uso de múltiples sitios en una base semanal o quincenal (en semanas alternas). Generalmente, utilizando una solución al 16%, se pueden infundir aproximadamente 20 mL por sitio; y el paciente adulto que recibe 400 mg/kg de peso corporal (PC) requeriría de este modo al menos 3 sitios por semana o 12 sitios por mes. A pesar de que la administración semanal o quincenal tiene la ventaja añadida de mantener mejores niveles valle que las infusiones IV mensuales, el requisito de múltiples inserciones de la aguja ha sido un impedimento para muchos pacientes.

30 El espacio SC está formada por una red de colágeno cargado de una sustancia similar a un gel, ácido hialurónico. El ácido hialurónico se reemplaza con una vida media de aproximadamente 5 h, y es en gran parte responsable de la resistencia al flujo de fluido a través de los tejidos. La hialuronidasa digiere temporalmente el ácido hialurónico, facilitando de ese modo las infusiones en el espacio subcutáneo. El ácido hialurónico se restablece en el plazo de 24 horas, no dejando cambios observables. Por lo tanto, debido a la capacidad de la hialuronidasa para abrir canales en el espacio intersticial a través de la degradación de los glicosaminoglicanos, la administración de una hialuronidasa soluble permite la difusión de moléculas, lo que mejora la biodisponibilidad, la farmacocinética y/o las características farmacodinámicas de tales moléculas co-formuladas o co-administradas.

40 En algunos ejemplos, la biodisponibilidad de la IG co-administrada por vía subcutánea con hialuronidasa es de 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de la biodisponibilidad de la IGIV. Típicamente, la biodisponibilidad es mayor de 90%. Adicionalmente, la co-administración con una hialuronidasa soluble permite la infusión de grandes volúmenes en un solo sitio subcutáneo. Por ejemplo, se pueden administrar volúmenes de hasta 600 mL o mayores de IG en un solo sitio en una sola sesión, por ejemplo se pueden administrar 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL o más en un solo sitio en una única administración. Por lo tanto, se puede co-administrar por vía subcutánea una preparación de IG formulada a o entre 5 y 12% con una hialuronidasa soluble a dosificaciones equivalente a una dosis mensual de IGIV, por ejemplo, a o aproximadamente a 100 mg/kg, 200 mg/kg, 300 mg/kg, 400 mg/kg, 500 mg/kg, 600 mg/kg o más. Las dosificaciones se pueden administrar como una dosis única o se pueden dividir en múltiples dosis administradas a diario o semanalmente, tal como una vez a la semana o cada dos, tres o cuatro semanas o combinaciones de las mismas. Por lo tanto, mediante la administración de IG por vía subcutánea en presencia de una hialuronidasa soluble, se abordan una o todas las consideraciones y problemas asociados con la administración subcutánea de IG. Por lo tanto, en virtud de las propiedades de dispersión de la hialuronidasa, la administración subcutánea IG en presencia de una hialuronidasa soluble permite la administración de dosis de IGIV a frecuencias mensuales de IGIV, manteniendo al mismo tiempo la biodisponibilidad de IGIV.

55 Las siguientes secciones describen inmunoglobulinas ilustrativas e hialuronidasas solubles en las combinaciones de la presente memoria, sus métodos de preparación, y su uso para tratar enfermedades y afecciones tratables con IG.

C. Inmunoglobulina

60 En la presente memoria se proporcionan inmunoglobulinas (IG, también denominada gammaglobulina o IgG) que se puede utilizar para la administración subcutánea combinadas con una hialuronidasa soluble. La IG actúa reforzando el sistema inmunológico modulando la actividad del complemento, suprimiendo la producción de autoanticuerpos, saturando o bloqueando los receptores de Fc en macrófagos y linfocitos B, y suprimiendo la producción de mediadores inflamatorios, tales como citocinas, quimiocinas y metaloproteinasas.

La IG es una fracción proteica que se encuentra en el plasma de los animales superiores y contiene un gran número de anticuerpos que tienen diferentes especificidades. Generalmente, la IG contiene inmunoglobulinas séricas que pueden ser cualquier idiotipo, tales como IgG y diversas subclases, IgA, IgM, IgD, IgE. Las diversas inmunoglobulinas o subclases pueden estar presentes a diversas concentraciones y especificidades, que pueden diferir entre las preparaciones de inmunoglobulina en función, por ejemplo, de la exposición del plasma del donante a antígenos (p.ej., por medio de vacunaciones). A menudo, las inmunoglobulinas están presentes en cantidades que normalmente se encuentran en el suero (véase la Tabla 2), aunque se pueden emplear etapas de purificación para alterar las proporciones de la clase o las clases concretas de inmunoglobulina. Típicamente, las preparaciones de IG contienen 90% o más de IgG, tal como 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más IgG. Las inmunoglobulinas pueden ser policlonales o monoclonales. Típicamente, las preparaciones incluyen un alto porcentaje de IgG monomérica y un bajo contenido de IgA.

Clase de Ig	Nivel en Suero mg/ml (%)	Función
IgG	1200 (77)	Ig Principal en Seres Humanos
IgA	200 (13)	Proteje la Mucosa
IgM	150 (9)	Ig Principal para las respuestas inmunitarias primarias
IgD	2 (<1)	Regula las células B
IgE	<1 (traza)	Ig Principal en la Respuesta Alérgica

Las inmunoglobulinas se pueden aislar a partir de sangre humana o animal o se puede producir por otros medios, por ejemplo, mediante tecnología de ADN recombinante o tecnología de hibridoma. Por ejemplo, la inmunoglobulina se puede obtener a partir de tejidos, cultivos de hibridomas de linfocitos, plasma o suero sanguíneo, o cultivos de células recombinantes utilizando cualquier procedimiento de fraccionamiento adecuado, por ejemplo, precipitaciones con alcohol o separaciones de intercambio iónico. En general, la IG se prepara a partir de plasma sanguíneo por fraccionamiento con alcohol, tal como empleó originalmente Cohn y modificado por Oncley (el método de Cohn-Oncley, véanse, p.ej., Cohn et al. (1946) J. Am. Chem. Soc. 68: 459-475; Oncley et al. (1949) J. Am. Chem. Soc., 71: 541-550). El uso de alcohol en la purificación puede inactivar virus potencialmente contaminantes. El método de Cohn-Oncley puede dar lugar a proteínas desnaturalizadas y agregadas, que pueden dar lugar a formas de alto peso molecular que pueden actuar como complejos anticuerpo-antígeno que tienen la capacidad de fijar libremente el complemento.

Para evitar tales efectos no deseados, se han desarrollado métodos de Cohn-Oncley modificados para la preparación y purificación de IG. Algunos de tales procedimientos son conocidos y se pueden adaptar y modificar para uso de preparaciones de IG de la presente memoria. Está dentro del conocimiento práctico de la técnica elaborar las preparaciones de IG en vista de los métodos detallados conocidos y disponibles en la técnica. Típicamente, la IG se fabrica utilizando un fraccionamiento primario con etanol frío y un fraccionamiento secundario que puede incluir uno cualquiera o más de una modificación química, incubación a pH 4,0 con o sin pepsina, precipitación con PEG, cromatografía de intercambio iónico, escisión enzimática, tratamiento con detergente disolvente y diafiltración y ultrafiltración.

Por ejemplo, la separación de agregados de IG por técnicas convencionales, tales como ultra-centrifugación o cromatografía de exclusión, hace que sea posible obtener un producto que tiene una baja actividad anticomplementaria. Otros métodos de preparación de Ig incluyen, pero no se limitan a, un procedimiento para el fraccionamiento de plasma humano por medio de polímeros de etilenglicol (Polson et al. (1964) Biochim. Biophys. Acta., 82: 463-475); incorporación de un polietilenglicol (PEG) como agente de purificación a partir de un material separado del fraccionamiento de Cohn (fracción II o II + III, véanse, p.ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.093.606 y 4.165.370); y otros métodos similares de los procesos de purificación con polietilenglicol (documento EP 0246579). Además, se han descrito procedimientos para la obtención de IG que muestra una baja actividad anticomplemento mediante tratamiento con enzimas tales como pepsina, plasmina, tripsina inmovilizada, tratamiento a un pH ácido moderado, tratamiento con B-propiolactona, métodos de fraccionamiento que utilizan polietilenglicol como agente de precipitación, y otras técnicas descritas en las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.093.606, 4.126.605, 3.966.906 y 4.124.576. Otros procedimientos se basan en la modificación química y parcial de las moléculas de Ig por medio de tratamiento con agentes reductores, alcoholización, alquilación y sulfonación (véase, p.ej., la Patente de Estados Unidos 6.875.848). Se puede utilizar cromatografía de intercambio iónico para eliminar

los contaminantes no deseables de las sustancias de partida utilizadas para obtener las preparaciones de Ig (véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 3.869.436, EP 91300790 y el documento WO 94/29334). El documento EP0440483 describe una combinación de técnicas útiles para facilitar la preparación intravenosa del producto basadas en cromatografía de intercambio iónico y diafiltración a un pH ácido débil. Otros métodos también se describen en la técnica y son conocidos para un experto en la técnica (véase p.ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.177.194 y 6.875.848).

Las preparaciones de IG deben ser tratadas para eliminar la carga viral. Existen dos métodos de disminución de la carga viral: inactivación viral y división o eliminación viral. Los métodos de inactivación viral ilustrativos incluyen, pero no se limitan, fraccionamiento con etanol frío, calentamiento (pasteurización), ambiente disolvente/detergente y ácido (pH bajo). Por ejemplo, se ha demostrado que el procedimiento con disolvente/detergente tiene acción virucida contra VSV (virus de la estomatitis vesicular), virus Sindbis, VIH, VHB (virus de la hepatitis B, y VHC (virus de la hepatitis C). Los ejemplos de la división o eliminación viral incluyen, pero no se limitan a, fraccionamiento con etanol frío, reparto de fases o precipitación con PEG, cromatografía de afinidad, intercambio iónico o cromatografía de exclusión en gel y filtración.

La formulación final purificado también se debe preparar para evitar la agregación excesiva y para estabilizar la proteína. La agregación de la preparación de IG se puede minimizar elaborando preparaciones liofilizadas para mejorar la estabilidad durante el almacenamiento, para la reconstitución con un diluyente antes de su uso. Otra forma de aumentar la estabilidad de las preparaciones de IG que es bien conocida en la técnica es la adición de excipientes de estabilización de proteínas a la preparación de IG. Los excipientes conocidos incluyen, pero no se limitan a, azúcares, polioles, aminoácidos, aminos, sales, polímeros y tensioactivos. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 4.499.073 describe la estabilización a través de la selección de pH y fuerza iónica; la patente JP 54020124 describe la adición de un aminoácido a una preparación intramuscular para volverla estable y segura durante el almacenamiento; los documentos JP 57031623 y JP 57128635 describen el uso de arginina y/o lisina con NaCl en preparaciones de IG de 5 a 15% para lograr la estabilidad a largo plazo en una preparación intramuscular; el documento JP 4346934 describe el uso de baja conductividad (menos de mmho), pH 5,3 a 5,7 y opcionalmente uno o más estabilizadores incluyendo PEG, albúmina sérica humana y manitol; el documento U.S. 4.439.421 ilustra la adición de una macromolécula hidrófila, un poliol y otra proteína para estabilizar contra la generación de anti-complemento; el documento U.S. 5.945.098 describe la estabilización de soluciones isotónicas mediante la adición de aminoácidos (glicina de 0,1 a 0,3 M) y detergentes no iónicos (polisorbato y de PEG); el documento U.S. 4.186.192 describe diversos aditivos incluyendo aminoácidos; el documento WO 2005/049078 describe la estabilización con maltosa y adicionalmente glicina hasta 0,1 M; el documento U.S. 4.362.661 describe el uso de aminoácidos neutros y alcalinos para conferir estabilidad a una preparación de IG al 5%. También se pueden preparar formulaciones líquidas estables, que utilizan los hidratos de carbono en un medio acuoso que tiene una fuerza iónica muy baja y un pH de 4,25 (Patente de Estados Unidos Núm. 4.396.608) o un pH débilmente ácido de 5-6 (documento EP 0278422).

También se puede controlar la formación de dímeros de las preparaciones de IG. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5.871.736 describe preparaciones de IG, particularmente preparaciones líquidas, que contienen uno o más estabilizadores anfífilos con el fin de estabilizar contra la formación de dímero. Los estabilizadores anfífilos incluyen ácido nicotínico y sus derivados, en particular, nicotinamida, y principalmente junto con los ácidos anteriores, aminoácidos que tienen cadenas laterales lipófilas no cargadas, por ejemplo, fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina, prolina y valina.

Las preparaciones se pueden elaborar por medio de métodos conocidos en la técnica, tales como cualquiera de los descritos en la presente memoria. Generalmente, sin embargo, el pH de la preparación final se ajusta a un pH relativamente alto, pero ácido, es decir, en el intervalo de aproximadamente pH 4,2 a 5,4, tal como un intervalo de pH de 4,6 a 5,1. Se ha encontrado que este intervalo de pH es particularmente útil para mejorar el almacenamiento de las preparaciones de Ig.

Generalmente, las preparaciones de IG finales tienen una concentración de proteína de aproximadamente 5 a 25% p/v, generalmente de 6 a 15% p/v, 8 a 12% p/v, y típicamente 10% p/v. La concentración final de proteína dependerá de diversos factores, tales como la vía de administración del paciente que se vaya a tratar, y el tipo de afección que se vaya a tratar.

En la presente memoria se contempla que se pueda emplear cualquier preparación de IG utilizada para la administración IV en los procedimientos proporcionados en la presente memoria combinada con una hialuronidasa soluble para la administración subcutánea. Las preparaciones incluyen formulaciones liofilizadas y líquidas. La inmunoglobulina (IGIV) está disponible comercialmente como Carimune[®] NF, Flebogamma[®] al 5%, Gammagard[®] Líquida, Gammagard[®] S/D, Gamunex[®], Iveegam[®] EN, Octagam[®] y Polygam[®] S/D. Típicamente, tales preparaciones utilizan todas un método de fraccionamiento con alcohol frío, pero utilizan diferentes métodos para aislar y purificar la inmunoglobulina y diferentes métodos para reducir la contaminación potencial por virus. Adicionalmente, se pueden utilizar otras preparaciones formuladas actualmente para administración intramuscular o subcutánea en las

combinaciones y métodos proporcionados en la presente memoria.

Es ilustrativa de una preparación de IG Inmunoglobulina intravenosa (humana), 10% (IGIV, 10%, comercializada como Gammagard® líquida, Baxter Healthcare Corporation), que es una preparación de IgG sin modificar líquida con una distribución de subclases de IgG similar a la del plasma normal. La preparación contiene el fragmento cristalizante intacto (Fc) y las regiones Fab. La preparación contiene 100 mg/ml de proteínas, siendo al menos 98% IgG; la IgA está presente a una concentración de 37 µg/ml, y la IgM está presente únicamente en cantidades traza. Tiene una osmolalidad que es similar a la osmolalidad fisiológica y no contiene azúcares, sodio o conservantes. Se formula con glicina para la estabilización a un pH de 4,6 a 5,1. El procedimiento de fabricación emplea un procedimiento de fraccionamiento con alcohol frío de Cohn-Oncley modificado y purificaciones adicionales mediante un procedimiento continuo a través del uso de cromatografía de intercambio catiónico débil y cromatografía de intercambio aniónico débil. El procedimiento de fabricación también incluye 3 etapas de inactivación o eliminación viral independientes: tratamiento con disolvente/detergente (S/D), nanofiltración e incubación a un pH bajo y temperatura elevada.

D. Hialuronidasa

En la presente memoria se proporcionan combinaciones que contienen inmunoglobulina y una hialuronidasa soluble, y métodos de uso de tales combinaciones para la administración subcutánea para el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por IG. Las hialuronidasas son una familia de enzimas que degradan el ácido hialurónico, que es un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente principal de la barrera intersticial. Mediante la catálisis de la hidrólisis del ácido hialurónico, un constituyente principal de la barrera intersticial, la hialuronidasa reduce la viscosidad del ácido hialurónico, lo que aumenta la permeabilidad del tejido. Como tales, las hialuronidasas se han utilizado, por ejemplo, como un agente de propagación o dispersión junto con otros agentes, fármacos y proteínas para mejorar su dispersión y suministro. Son hialuronidasas ilustrativas en las combinaciones y métodos proporcionados en la presente memoria las hialuronidasas solubles.

Existen tres clases generales de hialuronidasas; hialuronidasa de mamífero, hialuronidasa bacteriana y hialuronidasa de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35) son *endo-β-N-acetil-hexosaminidasas* que hidrolizan el enlace glicosídico β1 → 4 del hialuronano para proporcionar varias longitudes de oligosacáridos tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. Tienen actividades tanto hidrolítica como transglicosidasa y pueden degradar hialuronano y sulfatos de condroitina (SC), generalmente C4-S y C6-S. Las hialuronidasas de este tipo incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas de vacas (bovina) (SEQ ID NO: 10 y 11), de ratón (SEQ ID NO: 17-19, 32), de cerdo (SEQ ID NO: 20-21), de rata (SEQ ID NO: 22-24, 31), de conejo (SEQ ID NO: 25), de oveja (ovina) (SEQ ID NO: 26 y 27), de orangután (SEC ID NO: 28), de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 29), de cobbya (SEQ ID NO: 30), e hialuronidasas humanas.

Las hialuronidasas de mamífero pueden subdividirse adicionalmente en las que son activa en condiciones neutras, encontradas predominantemente en extractos de testículos, y activa en condiciones ácidas, encontradas predominantemente en órganos tales como el hígado. Las hialuronidasas activa en condiciones neutras ilustrativas incluyen PH20, incluyendo, pero sin limitarse a, PH20 derivada de diferentes especies tales como ovina (SEQ ID NO: 27), bovina (SEQ ID NO: 11) y humana (SEQ ID NO: 1). La PH20 humana (también conocida como SPAM1 o proteína de la superficie de espermatozoides PH20), es generalmente bloqueada en la membrana plasmática a través de un anclaje de glicosilfosfatidil inositol (GPI). Está implicada de forma natural en la adhesión de espermátulo y coadyuva a la penetración por el espermatozoides de la capa de células del cúmulo por digestión de ácido hialurónico. El transcrito de ARNm de PH20 se traduce normalmente para generar un polipéptido precursor de 509 aminoácidos (SEQ ID NO: 1) que contiene una secuencia señal de 35 aminoácidos en el extremo N-terminal (posiciones de residuos de aminoácidos 1-35) y un ancla de GPI de 19 aminoácidos en el extremo C-terminal (posiciones de residuos de aminoácidos 491-509). La PH20 madura es, por lo tanto, un polipéptido de 474 aminoácidos expuesto en el SEQ ID NO: 2). La PH20 bovina es un polipéptido precursor de 553 aminoácidos (SEQ ID NO: 11). El alineamiento de la PH20 bovina con la PH20 humana muestra únicamente una débil homología, existiendo múltiples huecos desde el aminoácido 470 hasta el respectivo extremo carboxi terminal debido a la ausencia de un ancla de GPI en el polipéptido bovino (véase, p.ej., Frost GI (2007) Expert Opin. Drug. Deliv. 4: 427-440). De hecho, no se prevé ningún ancla de GPI clara en ninguna otra especie de PH20 aparte de la humana. Por lo tanto, los polipéptidos producidos a partir de PH20 ovina y bovina existen como formas solubles. Aunque existe PH20 bovina unida muy laxamente a la membrana plasmática, ésta no está anclada a través de un ancla sensible a fosfolipasa (Lalancette et al., Biol Reprod 2001 Agosto;65(2):628-36). Esta característica única de la hialuronidasa bovina ha permitido el uso de la enzima hialuronidasa soluble de testículos bovinos como un extracto para uso clínico (Wydase™, Hyalase™).

Además de PH20 humana (también denominada SPAM1), se han identificado cinco genes de tipo hialuronidasa en el genoma humano, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 e HYALP1. HYALP1 es un pseudogen, y no se ha demostrado que HYAL3 (SEQ ID NO: 38) posea actividad enzimática frente ningún sustrato conocido. HYAL4 (polipéptido precursor expuesto en el SEQ ID NO: 39) es una condroitinasa y exhibe poca actividad frente al hialuronano. HYAL1

(polipéptido precursor expuesto en el SEQ ID NO: 36) es la enzima prototípica activa en condiciones ácidas y PH20 (polipéptido precursor expuesto en el SEQ ID NO: 1) es la enzima prototípica activa en condiciones neutras. Las hialuronidasas activa en condiciones ácidas, tales como HYAL1 y HYAL2 (polipéptido precursor expuesto en el SEQ ID NO: 37) típicamente carecen de actividad catalítica a pH neutro (es decir, pH 7). Por ejemplo, HYAL1 tiene poca actividad catalítica *in vitro* por encima de pH 4,5 (Frost et al. (1997) Anal. Biochemistry, 251:263-269). HYAL2 es una enzima activa en condiciones ácidas con una actividad específica muy baja *in vitro*. Las enzimas de tipo hialuronidasa también se pueden caracterizar por las que generalmente se bloquea en la membrana plasmática a través de un ancla de glicosilfosfatidil inositol tales como HYAL2 humana y PH20 humana (Danilkovitch-Miagkova, et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(8): 4580-5), y las que son generalmente solubles, tales como HYAL1 humana (Frost et al., (1997) Biochem Biophys Res Commun. 236 (1):10-5).

La glicosilación, incluyendo N- y O-glicosilación, de algunas hialuronidasas puede ser muy importante para su actividad catalítica y estabilidad. Si bien la alteración del tipo de glicano que modifica una glicoproteína puede tener efectos drásticos sobre la antigenicidad, el plegamiento estructural, la solubilidad y la estabilidad de una proteína, no se cree que la mayoría de las enzimas requieran glicosilación para la actividad enzimática óptima. Tales hialuronidasas son únicas a este respecto, ya que la eliminación de la glicosilación ligada a N puede dar lugar a la inactivación casi completa de la actividad hialuronidasa. Para tales hialuronidasas, la presencia de glicanos ligados a N es crítica para generar una enzima activa.

Los oligosacáridos ligados a N se clasifican en varios tipos principales (oligomanosa, complejos, híbridos, sulfatados), todos los cuales tienen (Hombre) 3 núcleos de GlcNAc-GlcNAc anclados a través del nitrógeno amídico de residuos de Asn que entran dentro de las secuencias Asn-Xaa-Thr/Ser (donde Xaa no es Pro). Se ha mencionado la glicosilación en un sitio Asn-Xaa-Cys para proteína C de la coagulación. En algunos casos, la hialuronidasa puede contener conexiones tanto N-glucosídicas como O-glicosídicas. Por ejemplo, PH20 tiene oligosacáridos ligados a O, así como oligosacáridos ligados a N.

Existen siete sitios de glicosilación ligados a N potenciales en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de PH20 humana ilustrada en el SEQ ID NO: 1. Los enlaces disulfuro se forman entre los residuos de cisteína C60 y C351 y entre C224 y C238 para formar el dominio hialuronidasa central. Sin embargo, se requieren cisteínas adicionales en el extremo carboxi terminal para la actividad catalítica de la enzima en condiciones neutras de manera que los aminoácidos 36-464 del SEQ ID NO: 1 contienen el dominio de hialuronidasa PH20 humana mínimamente activo. Por lo tanto, no se requiere el sitio de glicosilación ligado a N N-490 para la actividad hialuronidasa adecuada.

Hialuronidasa soluble

En las combinaciones y métodos de la presente invención se proporcionan hialuronidasas solubles. Las hialuronidasas solubles incluyen cualquiera de las que existen en forma soluble, incluyendo, pero sin limitarse a, Hyall, PH20 bovina y PH20 ovina, variantes alélicas de las mismas y otras variantes. También se incluye entre las hialuronidasas soluble cualquier hialuronidasa que haya sido modificada para que sea soluble. Por ejemplo, PH20 humana, que normalmente está anclada a la membrana a través de un ancla de GPI, se puede volver soluble mediante truncamiento y eliminación de toda o una parte del ancla de GPI en el extremo C-terminal. Las hialuronidasas solubles también incluyen hialuronidasas activas en condiciones ácidas y activas en condiciones neutras, sin embargo, se contemplan hialuronidasas activas en condiciones neutras para su uso en la presente memoria para los fines de la administración subcutánea.

Por lo tanto, es ilustrativa de una hialuronidasa soluble PH20 de cualquier especie, tal como cualquiera mostrada en cualquiera de los SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27, 30 y 31, o formas truncadas de las mismas que carecen de toda o una parte del ancla de GPI C-terminal, siempre que la hialuronidasa sea soluble y conserve la actividad hialuronidasa. También se incluyen entre la hialuronidasas solubles las variantes alélicas u otras variantes de cualquiera de los SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27, 30 y 31, o formas truncadas de las mismas. Las variantes alélicas y otras variantes son conocidas para un experto en la técnica, e incluyen polipéptidos que tienen 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más identidad de secuencia con cualquiera de los SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27, 30 y 31, o formas truncadas de los mismos.

Típicamente, para su uso en los métodos de la presente memoria, se utiliza una PH20 humana soluble. Aunque se puede utilizar PH20 de otros animales, tales preparaciones son potencialmente inmunogénicas, ya que son proteínas de origen animal. Por ejemplo, una proporción significativa de pacientes demuestra sensibilización previa secundaria a alimentos ingeridos, y puesto que estas son proteínas animales, todos los pacientes tienen un riesgo de sensibilización posterior. Así, las preparaciones no humanas pueden no ser adecuadas para uso crónico. Si se desean preparaciones no humanas, en la presente memoria se contempla que tales polipéptidos puedan ser preparados para que tengan una inmunogenicidad reducida. Tales modificaciones están dentro del nivel de un experto en la técnica. Las hialuronidasas, incluyendo PH20, utilizadas en los métodos de la presente memoria pueden ser producidos de manera recombinante o pueden ser purificadas o purificadas parcialmente a partir de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, a partir de extractos testículos.

PH20 Humana Soluble

Una hialuronidasa soluble ilustrativa es PH20 humana soluble. Se han producido formas solubles de PH20 humana recombinante y se pueden utilizar en los métodos descritos en la presente memoria para la co-administración o la co-formulación con inmunoglobulina para administración subcutánea para tratar enfermedades y afecciones tratables con IG. La producción de tales formas solubles de PH20 se describe en las Solicitudes Núm. 11/065.716 y 11/238.171, y en los Ejemplos 2-6, a continuación. Las formas solubles incluyen, pero no se limitan a, truncamientos cualesquiera que tengan C-terminal para generar polipéptidos que contienen del aminoácido 1 al aminoácido 347, 372, 394, 413, 430, 447, 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 de la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 1. Cuando se expresa en células de mamífero, se escinde la secuencia señal N-terminal de 35 aminoácidos durante el procesamiento, y se secreta la forma madura de la proteína. Así, los polipéptidos solubles maduros contienen los aminoácidos 36 a 347, 372, 394, 413, 430, 447, 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 del SEQ ID NO: 1. Los mutantes de delección que terminan en la posición de aminoácido 477 a 483 (correspondiente al polipéptido precursor expuesto en el SEQ ID NO: 1) exhiben mayor actividad hialuronidasa secretada que la forma anclada a GPI completa. Por lo tanto, las hialuronidasas solubles ilustrativas son aquellas que tienen 442, 443, 444, 445, 446 o 447 aminoácidos de longitud, como se establece en cualquiera de los SEC ID NO: 4-9, o variantes alélicas o de especie u otras variantes de las mismas. Generalmente las formas solubles de PH20 se producen utilizando sistemas de expresión de proteínas que facilitan la correcta N-glicosilación para garantizar que el polipéptido conserva la actividad, ya que la glicosilación es importante para la actividad catalítica y la estabilidad de las hialuronidasas. Tales células incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) (p.ej., células DG44 CHO).

PH20 Humana soluble recombinante (rHuPH20)

Se han generado formas solubles recombinantes de PH20 humana (rHuPH20 soluble) y se pueden producir y purificar utilizando los métodos descritos en la presente memoria. La generación de tales formas solubles de rHuPH20 se describen en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Núm. 11/065,716 y 11/238.171 (Publicadas como solicitudes de patente publicadas Núm. US20050260186 y US 20060104968) y, en los Ejemplos 2-6, a continuación. Ejemplos de tales polipéptidos son aquellos generados a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica los aminoácidos 1-482 expuesta en el SEQ ID NO: 3. El procesamiento post-traducciona elimina la secuencia señal de 35 aminoácidos, lo que da como resultado la secreción de una rHuPH20 soluble de 447 aminoácidos (SEQ ID NO: 4). La rHuPH20 purificada resultante puede ser heterogénea debido a las peptidasas presentes en el medio de cultivo tras la producción y purificación. Típicamente, rHuPH20 se produce en células que facilitan la correcta N-glicosilación para conservar la actividad, tales como células CHO (por ejemplo, células CHO DG44).

E. Métodos de producción de ácidos nucleicos que codifican una hialuronidasa soluble y polipéptidos de los mismos

Los polipéptidos de una hialuronidasa soluble expuestos en la presente memoria, se pueden obtener por métodos bien conocidos en la técnica para la purificación de proteínas y la expresión de proteínas recombinantes. Se puede utilizar cualquier método conocido por los expertos en la técnica para la identificación de ácidos nucleicos que codifican genes deseados. Se puede utilizar cualquier método disponible en la técnica para obtener un clon de ADNc o de ADN genómico completo (es decir, que abarca la región codificante completa) que codifica una hialuronidasa, por ejemplo de una fuente celular o tisular. Se pueden manipular genéticamente hialuronidasas solubles modificadas o variantes, a partir de un polipéptido de tipo salvaje, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida al sitio.

Los polipéptidos se pueden clonar o aislar utilizando cualquiera de los métodos disponibles conocidos en la técnica para la clonación y el aislamiento de moléculas de ácido nucleico. Tales métodos incluyen la amplificación mediante PCR de ácidos nucleicos y el escrutinio de bibliotecas, incluyendo el escrutinio mediante hibridación de ácidos nucleicos, la detección basada en anticuerpos y el escrutinio basado en la actividad.

Se pueden utilizar métodos para la 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). Se puede utilizar un material que contiene ácido nucleico como material de partida a partir del cual se puede aislar una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido deseado. Por ejemplo, se pueden utilizar preparaciones de ADN y de ARNm, extractos celulares, extractos de tejidos, muestras de fluido (p.ej., sangre, suero, saliva), muestras de sujetos sanos y/o enfermos en métodos de amplificación. Las bibliotecas de ácidos nucleicos también se pueden utilizar como una fuente de material de partida. Los cebadores se pueden diseñar para amplificar un polipéptido deseado. Por ejemplo, los cebadores se pueden diseñar basándose en secuencias expresadas a partir de las cuales se genera un polipéptido deseado. Los cebadores pueden diseñarse basándose en retro-traducción de una secuencia de aminoácidos del polipéptido. Las moléculas de ácido nucleico generadas por amplificación se pueden secuenciar y confirmar para codificar un polipéptido deseado.

Se pueden empalmar secuencias de nucleótidos adicionales a una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido, incluyendo secuencias conectoras que contienen sitios de endonucleasas de restricción con el fin de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de la proteína o un vector diseñado para la amplificación de la proteína núcleo que codifica las secuencias de ADN. Además, las secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcionales se pueden conectar operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido. Los ejemplos de tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión intracelular de proteínas, y secuencias de secreción, por ejemplo, secuencias señal heterólogas, diseñadas para facilitar la secreción de proteínas. Tales secuencias son conocidas para los expertos en la técnica. También se pueden conectar secuencias de residuos de nucleótidos adicionales tales como secuencias de bases que especifican regiones de unión a proteína a las moléculas de ácido nucleico que codifican la enzima. Tales regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias de residuos que facilitan o codifican proteínas que facilitan la captación de una enzima en las células diana específicas, o alteran de otra manera la farmacocinética de un producto de un gen sintético. Por ejemplo, las enzimas se pueden conectar a radicales de PEG.

Además, se pueden añadir etiquetas u otros radicales, por ejemplo, para ayudar en la detección o purificación por afinidad del polipéptido. Por ejemplo, también se pueden conectar secuencias de residuos de nucleótidos adicionales tales como secuencias de bases que especifican una etiqueta epitópica u otro marcador detectable a las moléculas de ácido nucleico que codifican la enzima. Los ejemplos de tales secuencias incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican una etiqueta de His (p.ej., 6xHis, HHHHHH; SEQ ID NO: 54) o la etiqueta FLAG (DYKDDDDK; SEC ID NO: 55).

Los ácidos nucleicos identificados y aislados se pueden insertar a continuación en un vector de clonación apropiado. Se puede utilizar un gran número de sistemas de vector-anfitrión conocidos en la técnica. Los posibles vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema vector debe ser compatible con la célula anfitriona utilizada. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como pCMV4, pBR322 o derivados del plásmido pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Otros vectores de expresión incluyen el vector de expresión HZ24 ilustrado en la presente memoria. La inserción en un vector de clonación puede, por ejemplo, llevarse a cabo ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tiene extremos cohesivos complementarios. La inserción se puede efectuar utilizando vectores de clonación TOPO (INVITROGEN, Carlsbad, CA). Si no están presentes en el vector de clonación los sitios de restricción complementarios utilizados para fragmentar el ADN, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente. Alternativamente, se puede producir cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (conectores) en los extremos del ADN; estos conectores ligados pueden contener oligonucleótidos específicos sintetizados químicamente que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen de la proteína se pueden modificar con colas homopoliméricas. Se pueden introducir moléculas recombinantes en las células anfitrionas a través de, por ejemplo, transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que se generen muchas copias de la secuencia del gen.

En ejemplos específicos, la transformación de células anfitrionas con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen aislado de la proteína, el ADNc, o la secuencia de ADN sintetizada permite la generación de múltiples copias del gen. Así, el gen se puede obtener en grandes cantidades cultivando los transformantes, aislando las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperando el gen insertado del ADN recombinante aislado.

1. Vectores y células

Para la expresión recombinante de una o más de las proteínas deseadas, tales como cualquiera de las descritas en la presente memoria, el ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína se puede insertar 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 la proteína insertada. También pueden suministrarse las señales de transcripción y traducción necesarias mediante el promotor nativo para genes de enzimas, y/o sus regiones limítrofes.

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

Se describen células procariotas y eucariotas, incluyendo células endoteliales, que contienen los vectores. Tales células incluyen células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, arqueobacterias, células vegetales, células de insectos y células animales. Las células se utilizan para producir una de sus proteínas mediante cultivo de las células descritas anteriormente en condiciones por medio de las cuales la proteína codificada es expresada por la célula, y recuperar la proteína expresada. Para los propósitos de la presente memoria, por ejemplo, la enzima puede

ser secretada al medio.

En la presente memoria se describen vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de hialuronidasa soluble acoplado a la secuencia señal nativa o heteróloga, así como múltiples copias de la misma. Los vectores pueden seleccionarse para la expresión de la proteína enzimática en la célula o de manera que la proteína enzimática se exprese como una proteína secretada.

Se puede utilizar una variedad de sistemas de anfitrión-vector para expresar la secuencia codificante de proteínas. Estos incluyen, pero no se limitan a sistemas de células de mamíferos infectadas con virus (p.ej., virus vaccinia, adenovirus y otros virus); sistemas celulares de insectos infectados con virus (p.ej. baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófago, ADN, ADN plasmídico, o ADN cosmídico. La fuerza y la especificidad de los elementos de expresión de vectores varían. Dependiendo del sistema anfitrión-vector utilizado, se puede utilizar cualquiera de diferentes elementos de transcripción y traducción adecuados.

Se pueden utilizar métodos cualesquiera conocidos para los expertos en la técnica 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 transcripción/traducción y secuencias codificantes de proteínas apropiadas. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante y sintéticas *in vitro* y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos, puede ser regulada por una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que los genes o fragmentos de los mismos se expresan en un anfitrión transformado con la molécula o las moléculas de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede controlarse mediante cualquier promotor/intensificador conocido en la técnica. En un ejemplo específico, el promotor no es nativo respecto a los genes para una proteína deseada. Los promotores que se pueden utilizar incluyen pero no se limitan al promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290:304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al. Cell 22:787-797 (1980)), el promotor de timidina quinasa de herpes (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster et al., Nature 296: 39-42(1982)); los vectores de expresión procarióticos tales como el promotor de la β -lactamasa (Jay et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5543) o el promotor *tac* (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)); véase también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": en Scientific American 242:79-94 (1980)); vectores de expresión de plantas que contienen el promotor de la nopalina sintetasa (Herrera-Estrella et al., Nature 303: 209-213 (1984)) o el promotor de ARN 35S del virus de mosaico de la coliflor (Gardner et al., Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bifosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., Nature 310:115-120 (1984)); elementos promotores de levaduras y otros hongos tales como el promotor Gal4, el promotor de la alcohol deshidrogenasa, el promotor de fosfoglicerol quinasa, el promotor de la fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control de la transcripción en animales que presentan especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de la elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., Cell. 38: 639-646 (1984); Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7:425-515 (1987)); región de control del gen de la insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan et al., Nature 315:115-122 (1985)), la región de control del gen de la inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., Cell. 38:647-658 (1984); Adams et al., Nature 318:533-538 (1985); Alexander et al., Mol Cell Biol 7: 1436-1444 (1987)), la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., Cell 45:485-495 (1986)), región de control del gen de la albúmina que es activa en el hígado (Pinckert et al., Genes and Devel. 1:268-276 (1987)), la región de control del gen de alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al., Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammer et al., Science 235:53-58 (1987)), la región de control del gen de la alfa-1 antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al., Genes and Devel. 1:161-171 (1987)), la región de control del gen de la beta globina que es activa en células mieloides (Magram et al., Nature. 315:338-340 (1985); Kollias et al., Cell 46:89-94 (1986)), región de control del gen de la proteína básica de mielina que es activa en células de oligodendrocitos del cerebro (Readhead et al., Cell. 48:703-712 (1987)), la región de control del gen de la cadena ligera de la miosina de tipo 2 que es activa en el músculo esquelético (Shani, Nature 314: 283-286 (1985)), y la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina que es activa en gonadotropos del hipotálamo (Mason et al., Science 234:1372-1378 (1986)).

En un ejemplo específico, se utiliza un vector que contiene un promotor conectado operablemente a ácidos nucleicos que codifican una proteína deseada, o uno de sus dominios, fragmentos, derivados u homólogos, uno o más orígenes de replicación, y opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (p.ej, un gen de resistencia a antibióticos). Los vectores plasmídicos ilustrativos para la transformación de células *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA; véase también la bibliografía publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor del fago T5 (reconocido por RNA polimerasa de *E. coli*) y un módulo de represión del operador lac doble para proporcionar la expresión estrechamente regulada, de alto nivel de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión al ribosoma sintético (RBS II) para la traducción eficaz, una secuencia codificante de la etiqueta 6XHis, y terminadores de la transcripción T1, origen de replicación

ColE1, y un gen de beta-lactamasa para conferir resistencia a la ampicilina. Los vectores pQE permiten la colocación de una etiqueta 6xHis en el extremo N o C-terminal de la proteína recombinante. Tales plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30, y pQE 31 que proporcionan sitios de clonación múltiple para los tres marcos de lectura y proporcionan la expresión de las proteínas etiquetados con 6xHis N-terminalmente. Otros vectores plasmídicos ilustrativos para la transformación de células *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, la Patente de Estados Unidos Núm. 4.952.496; disponible de Novagen, Madison, WI; véase, también la bibliografía publicada por Novagen describiendo el sistema). Tales plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor lac de T7, el terminador de T7, el operador lac inducible en *E. coli*, y el gen represor lac; pET 12a-c, que contiene el promotor de T7, el terminador de T7, y la señal de secreción de ompT de *E. coli*; y pET 15b y pET19b (Novagen, Madison, WI), que contienen una secuencia líder His-Tag™ para su uso en la purificación con una columna de His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión después de la purificación sobre la columna, la región del promotor T7-lac y el terminador de T7.

Un vector ilustrativo para la expresión de células de mamíferos es el vector de expresión HZ24. El vector de expresión HZ24 se obtuvo de la cadena principal del vector pCI (Promega). Contiene ADN que codifica el gen de resistencia a Beta-lactamasa (AmpR), un origen de replicación F1, una región del intensificador/promotor inmediato-temprano de citomegalovirus (CMV), y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El vector de expresión también tiene un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus ECMV (Clontech) y el gen de la dihidrofolato reductasa de ratón (DHFR).

2. Expresión

Los Polipéptidos hialuronidasa solubles se pueden producir por medio de cualquier método conocido por los expertos en la técnica incluyendo métodos *in vivo* e *in vitro*. Las proteínas deseadas se pueden expresar en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades y formas requeridas de las proteínas, por ejemplo, necesarios para la administración y el tratamiento. Los anfitriones de expresión incluyen organismos procarióticos y eucarióticos tales como *E. coli*, levadura, plantas, células de insectos, células de mamíferos, incluidas las líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los anfitriones de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas, así como en los tipos de modificaciones post-traduccionales que están presentes en las proteínas expresadas. La elección del anfitrión de expresión se puede hacer sobre la base de estos y otros factores, tales como consideraciones reguladoras y de seguridad, los costes de producción y la necesidad y los métodos para la purificación.

Muchos vectores de expresión están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica y se pueden utilizar para la expresión de proteínas. La elección del vector de expresión se verá influido por la elección del sistema de expresión del anfitrión. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores y opcionalmente potenciadores de la transcripción, señales de traducción, y señales de terminación de la transcripción y de la traducción. Los vectores de expresión que se utilizan para la transformación estable tienen típicamente un marcador seleccionable que permite la selección y mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, se puede utilizar un origen de replicación para amplificar el número de copias del vector.

También se pueden utilizar polipéptidos de hialuronidasa solubles o expresar como fusiones de proteínas. Por ejemplo, se puede generar una fusión de la enzima para añadir funcionalidad adicional a una enzima. Los ejemplos de proteínas de fusión de enzimas incluyen, pero no se limitan a, fusiones de una secuencia señal, una etiqueta tal como para la localización, p.ej. una etiqueta his₆ o una etiqueta myc o una etiqueta para la purificación, por ejemplo, una fusión GST, y una secuencia para dirigir la secreción de proteínas y/o la asociación a la membrana.

a. Células procariotas

Los procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema para producir grandes cantidades de proteínas. Transformación de *E. coli* es una técnica simple y rápida bien conocida para los expertos en la técnica. Los vectores de expresión para *E. coli* pueden contener promotores inducibles, tales promotores son útiles para inducir altos niveles de expresión de la proteína y para expresar proteínas que exhiben cierta toxicidad para las células anfitrionas. Los ejemplos de los promotores inducibles incluyen el promotor lac, el promotor trp, el promotor tac híbrido, los promotores de ARN de T7 y SP6 y el promotor λ pL regulado por temperatura.

Se pueden expresar proteínas, tales como cualquiera proporcionada en la presente memoria, en el entorno citoplásmico de *E. coli*. El citoplasma es un entorno reductor y para algunas moléculas, esto puede dar como resultado la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Se pueden utilizar agentes reductores tales como ditiotreitól y β -mercaptoetanol y desnaturizantes, tales como guanidina-HCl y urea para resolubilizar las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de las bacterias que proporciona un entorno oxidante e isomerasas de tipo chaperonina y disulfuro y puede conducir a la producción de proteína soluble. Típicamente, una secuencia líder se fusiona a la proteína que se debe expresar que dirige la proteína al periplasma. El líder se elimina a continuación mediante peptidasas señal dentro del periplasma. Los ejemplos de secuencias

líder de direccionamiento periplásmico incluyen el líder pelB del gen de la pectato liasa y el líder derivado del gen de la fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite fugas de la proteína expresada al medio de cultivo. La secreción de proteínas permite la purificación rápida y simple a partir del sobrenadante de cultivo. Las proteínas que no son secretadas se pueden obtener a partir del periplasma por lisis osmótica. De un modo similar a la expresión citoplásmica, en algunos casos las proteínas pueden convertirse en insolubles y desnaturalizantes y se pueden utilizar agentes reductores para facilitar la solubilización y repliegamiento. La temperatura de la inducción y el crecimiento también puede influir en los niveles de expresión y solubilidad, se utilizan típicamente temperaturas de entre 25°C y 37°C. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. Por lo tanto, si las proteínas requieren glicosilación para funcionar, la glicosilación se puede añadir *in vitro* después de la purificación a partir de las células anfitrionas.

b. Células de levadura

Levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son anfitriones de expresión de levadura bien conocidos que se pueden utilizar para la producción de proteínas, tales como cualquiera descrita en la presente memoria. La levadura puede ser transformada con vectores de replicación episómicos o mediante integración cromosómica estable por recombinación homóloga. Típicamente, se utilizan promotores inducibles para regular la expresión génica. Los ejemplos de tales promotores incluyen GAL1, GAL7 y GAL5 y promotores de metalotioneína, tales como CUP1, AOX1 u otro promotor de *Pichia* u otro de levadura. Los vectores de expresión a menudo incluyen un marcador seleccionable tal como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para la selección y el mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en levaduras son a menudo solubles. La co-expresión con chaperoninas tales como Bip y proteína disulfuro isomerasa puede mejorar los niveles de expresión y solubilidad. Además, las proteínas expresadas en levadura pueden ser dirigidas para la secreción utilizando fusiones de péptido señal de secreción tales como la señal de secreción del factor alfa de levadura de tipo de apareamiento de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de la superficie celular de levadura tales como el receptor de adhesión de apareamiento Aga2p o la glucoamilasa de *Arxula adeninivorans*. Se puede modificar genéticamente un sitio de escisión de proteasa tal como para la proteasa Kex-2, para eliminar las secuencias fusionadas de los polipéptidos expresados cuando salen de la vía de secreción. La levadura también es susceptible de glicosilación en motivos Asn-X-Ser/Thr.

C. Células de insecto

Las células de insecto, en particular utilizando expresión de baculovirus, son útiles para la expresión de polipéptidos tales como polipéptidos de hialuronidasa. Las células de insecto expresan altos niveles de proteína y son capaces de la mayor parte de las modificaciones post-traduccionales utilizadas por eucariotas superiores. Los baculovirus tienen una gama de anfitriones restrictiva que mejora la seguridad y reduce las preocupaciones reguladoras de la expresión eucariótica. Los vectores de expresión típicos utilizan un promotor para la expresión de alto nivel tal como el promotor de polihedrina de baculovirus. Los sistemas de baculovirus utilizados comúnmente incluyen baculovirus tales como el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), y el virus de la polihedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV) y una línea celular de insecto tal como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DPN1). Para la expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula que se expresa se fusiona inmediatamente aguas abajo del codón de iniciación del virus de la polihedrina. Las señales de secreción de mamífero se procesan con precisión en células de insecto y se pueden utilizar para secretar la proteína expresada al medio de cultivo. Además, las líneas celulares de *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (Dpn1) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a los sistemas de células de mamíferos.

Un sistema de expresión alternativo en células de insectos es el uso de células transformadas de manera estable. Se pueden utilizar para la expresión líneas celulares tales como la Schneider 2 (S2) y células Kc (*Drosophila melanogaster*) y células C7 (*Aedes albopictus*). Se puede utilizar promotor de la metalotioneína de *Drosophila* para inducir altos niveles de expresión en presencia de inducción de metales pesados con cadmio o cobre. Los vectores de expresión son típicamente mantenidos mediante el uso de marcadores de selección tales como neomicina e higromicina.

d. Células de mamífero

Se pueden utilizar sistemas de expresión de mamíferos para expresar proteínas que incluyen polipéptidos de hialuronidasa solubles. Los constructos de expresión pueden transferirse a células de mamífero por medio de una infección viral tal como adenovirus o por medio de transferencia directa de ADN por ejemplo mediante 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 protección terminal del ARNm, una caja TATA, una secuencia de iniciación de la traducción (secuencia consenso de Kozak) y elementos de poliadenilación. Se pueden añadir también elementos IRES para permitir la expresión bicistónica con otro gen, tal como un marcador seleccionable. Tales vectores incluyen a menudo promotores-intensificadores transcripcionales para la expresión de

alto nivel, por ejemplo, el promotor-intensificador de SV40, el promotor de citomegalovirus humano (CMV) y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores-intensificadores son activos en muchos tipos de células. También se pueden utilizar para la expresión regiones promotoras e intensificadoras de tipo tisular y celular. Las regiones promotoras/intensificadoras ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, aquellas de genes tales como la elastasa I, la insulina, la inmunoglobulina, el virus de tumor mamario de ratón, la albúmina, la alfa-fetoproteína, la alfa 1 antitripsina, la beta globina, la proteína básica de mielina, la cadena ligera de miosina de tipo 2, y la región de control del gen de la hormona de liberación de gonadotropina. Los marcadores seleccionables se pueden utilizar para seleccionar y mantener las células con el constructo de expresión. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, higromicina fosfotransferasa B, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, aminoglicósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa. Por ejemplo, la expresión puede llevarse a cabo en presencia de metotrexato para seleccionar sólo aquellas células que expresan el gen DHFR. La fusión con moléculas de señalización de la 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 mamífero incluyendo células de ratón, rata, ser humano, mono, pollo y hámster. Las líneas celulares ilustrativas incluyen, pero no se limitan a CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 (no secretoras) de ratón y otras líneas celulares de mieloma, hibridoma y líneas celulares de heterohibridomas, linfocitos, fibroblastos, células Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8 y HKB. Las líneas celulares también están disponibles adaptadas a medio libre de suero que facilita la purificación de proteínas secretadas a partir de los medios de cultivo celular. Los ejemplos incluyen células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, Núm. de cat. 11619-012) y la línea celular EBNA-1 libre de suero (Pham et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42). También están disponibles líneas celulares que están adaptadas para crecer en medios especiales optimizados para la expresión máxima. Por ejemplo, las células CHO DG44 están adaptadas para crecer en cultivo en suspensión en un medio definido químicamente, libre de producto animal.

e. Plantas

Se pueden utilizar células de plantas transgénicas y plantas para expresar proteínas tales como cualquiera descrita en la presente memoria. Los constructos de expresión se transfieren normalmente a plantas utilizando transferencia directa de ADN, tal como el bombardeo con microproyectiles y la transferencia mediada por PEG a protoplastos, y con transformación mediada por *Agrobacterium*. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias promotoras e intensificadoras, elementos de terminación de la transcripción y elementos de control de la traducción. Los vectores de expresión y las técnicas de transformación se dividen generalmente entre dicotiledóneas hospedadoras, tales como *Arabidopsis* y tabaco, y monocotiledóneas hospedadoras, tales como maíz y arroz. Los ejemplos de promotores de plantas utilizados para la expresión incluyen el promotor de virus mosaico de la coliflor, el promotor de la nopalina sintasa, el promotor de la ribosa bifosfato carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBQ3. Se utilizan a menudo marcadores seleccionables, tales como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa para facilitar la selección y mantenimiento de las células transformadas. Las células vegetales transformadas se pueden mantener en cultivo como células, agregados (tejido de callo) o regenerar para proporcionar plantas completas. Las células de plantas transgénicas pueden incluir también algas modificadas por ingeniería genética para producir polipéptidos de hialuronidasa. Debido a que las plantas tienen diferentes patrones de glicosilación que las células de mamíferos, esto puede influir en la elección de la proteína producida en estos anfitriones.

Técnicas de purificación

El método para la purificación de polipéptidos, incluyendo polipéptidos de hialuronidasa solubles u otras proteínas, a partir de células anfitrionas dependerá de las células anfitrionas y los sistemas de expresión escogidos. Para las moléculas secretadas, las proteínas se purifican generalmente a partir de los medios de cultivo después de la eliminación de las células. Para la expresión intracelular, las células pueden ser lisadas y las proteínas purificadas a partir del extracto. Cuando se utilizan organismos transgénicos tales como plantas y animales transgénicos para la expresión, se pueden utilizar tejidos u órganos como material de partida para preparar un extracto de células lisadas. Adicionalmente, la producción en animales transgénicos puede incluir la producción de polipéptidos en leche o huevos, que pueden ser recogidos, y si fuera necesario, las proteínas pueden ser extraídas y purificadas adicionalmente utilizando métodos convencionales en la técnica.

Las proteínas, tales como los polipéptidos de hialuronidasa solubles, se pueden purificar utilizando mecanismos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, SDS-PAGE, fraccionamiento por tamaño y cromatografía de exclusión por tamaño, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, tales como intercambio aniónico. También se pueden utilizar técnicas de purificación de afinidad para mejorar la eficacia y la pureza de las preparaciones. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos, receptores y otras moléculas que se unen a enzimas hialuronidasas en la purificación por afinidad. También se pueden modificar mediante ingeniería genética constructos de expresión para añadir una etiqueta de afinidad a una proteína tal como un epítipo myc, la fusión GST o His₆ y purificar por afinidad con el anticuerpo myc,

resina de glutatión y resina Ni, respectivamente. La pureza se puede evaluar por medio de cualquier método conocido en la técnica, incluyendo electroforesis en gel y tinción y técnicas espectrofotométricas.

Preparación, Formulación y Administración de Inmunoglobulinas y Polipéptidos de Hialuronidasa Solubles

En la presente memoria se proporcionan composiciones farmacéuticas de inmunoglobulinas e hialuronidasas solubles para su administración subcutánea. Las formulaciones de composiciones farmacéuticas de hialuronidasas solubles, por ejemplo, PH20, son conocidas en la técnica (véanse p.ej. las Solicitudes de Estados Unidos publicadas Núm. US20040268425, US20050260186 y US20060104968). Las hialuronidasas solubles se pueden co-formular o co-administrar con formulaciones farmacéuticas de inmunoglobulina para mejorar el suministro de inmunoglobulinas a los sitios deseados en el organismo mediante el aumento de la biodisponibilidad de las inmunoglobulinas. Por ejemplo, la co-administración o co-formulación de IG con una hialuronidasa pueden mejorar el alcance y/o la velocidad de absorción y por lo tanto la biodisponibilidad de un agente haciendo que más cantidad de la misma alcance el torrente sanguíneo y/o menos cantidad de la misma sea degradada después de la administración por medio de una penetración más rápida. El aumento de absorción y biodisponibilidad se puede conseguir, por ejemplo, acelerando el flujo intersticial y potencialmente el transporte conectivo después de la administración mediante la aplicación de presión hidrostática asociada con el volumen de inyección combinada con una reducción de la resistencia del flujo asociada con la degradación de hialuronano. Por lo tanto, las hialuronidasas solubles se pueden utilizar para conseguir concentraciones elevadas y/o alcanzadas más rápidamente de la inmunoglobulina tras la administración subcutánea en comparación con los métodos convencionales de administración subcutánea, para proporcionar, por ejemplo, una respuesta más potente y/o más rápida para una determinada dosis. Alternativamente, la hialuronidasa soluble se puede usar para permitir que se alcance una respuesta determinada con una dosis más baja de IG administrada. La capacidad de una hialuronidasa soluble para mejorar el flujo de fluido masivo en y cerca de un sitio de inyección o infusión también puede mejorar otros aspectos del suministro farmacológico asociado. Por ejemplo, el aumento del flujo de fluido masivo puede ayudar a permitir que el volumen de fluido inyectado se disperse más fácilmente desde el sitio de la inyección (reduciendo potencialmente las consecuencias adversas dolorosas u otras de la inyección). Esto es particularmente importante para las infusiones subcutáneas para permitir la administración de dosis más altas. Además del aumento de la biodisponibilidad, la co-administración o co-formulación de IG con hialuronidasa soluble proporciona una ruta más segura o más conveniente de administración en comparación con las vías intravenosas de administración convencionales.

Por lo tanto, en virtud de la mayor biodisponibilidad, las inmunoglobulinas se pueden administrar por vía subcutánea a dosis y frecuencias para las que se preparan y administran las actuales preparaciones intravenosas (IGIV). Las ventajas sobre las formulaciones subcutáneas de IG actuales es que la hialuronidasa/IG co-administrada o co-formulada puede dar como resultado regímenes de dosificación más favorables, por ejemplo, una dosificación menos frecuente. Mediante una dosificación menos frecuente o menor, se pueden reducir los efectos secundarios asociados con la toxicidad. Generalmente, se mejora la farmacocinética y/o la farmacodinámica de la terapia con IG subcutánea. Además, las administraciones subcutáneas de IG también tiene ventajas sobre las infusiones intravenosas actuales. Por ejemplo, la infusión subcutánea permite la infusión por el paciente o la familia en lugar de por una enfermera calificada; la infusión se puede lograr a tasas más altas de tal manera que IG se infunde en 1-3 horas en comparación con 5-10 horas para las terapias de IGIV convencionales; no hay ningún requisito de venas funcionales; no hay efectos secundarios relacionados con la infusión tales como trombosis, dolor de cabeza, tromboflebitis, y náuseas y menos probabilidad de eventos adversos; y la infusión se puede realizar en el domicilio o en cualquier lugar.

Las composiciones se pueden formular en forma liofilizada o líquida. Cuando las composiciones se proporcionan en forma liofilizada, éstas se pueden reconstituir inmediatamente antes de su uso mediante un tampón apropiado, por ejemplo, una solución salina estéril. Las composiciones pueden proporcionarse juntas o por separado. Para los fines de la presente memoria, tales composiciones se proporcionan típicamente por separado. La hialuronidasa soluble y la IG se pueden envasar como composiciones separadas para su administración juntas, secuencialmente o intermitentemente. Las combinaciones se pueden envasar en forma de un kit.

Formulaciones

Los compuestos se pueden formular en preparaciones farmacéuticas adecuadas cualesquiera para su administración subcutánea, tales como soluciones, suspensiones, polvos, o formulaciones de liberación sostenida. Típicamente, los compuestos se formulan en composiciones farmacéuticas utilizando mecanismos y procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ansel Introducción to Pharmaceutical Dosage Forms, Cuarta Edición, 1985, 126). Las composiciones farmacéuticamente aceptables se preparan habida cuenta de las aprobaciones de una agencia reguladora u otra agencia preparadas de acuerdo con la farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y en seres humanos. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores tales como un diluyente, coadyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra una hialuronidasa o IG. Los ejemplos de los portadores farmacéuticos adecuados

se describen en "Remington Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, en general, en forma purificada o en forma parcialmente purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, y aceite de sésamo. El agua es un portador típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones de dextrosa acuosa y de glicerol también se pueden emplear como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener, junto con un ingrediente activo: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico, o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales, tales como goma arábiga, gelatina, glucosa, melaza, polivinilpirrolidina, celulosas y derivados de los mismos, povidona, crospovidonas y otros de tales aglutinantes conocidos por los expertos en la técnica. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, y etanol. Una composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina, y otros de tales agentes.

Los compuestos terapéuticamente activos desde el punto de vista farmacéutico y derivados de los mismos se formulan y se administran típicamente en formas de dosificación unitarias o formas de dosificación múltiples. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada del compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, asociado con los portadores, vehículos o diluyentes farmacéuticos requeridos. Los ejemplos de las formas de dosificación unitarias incluyen ampollas y jeringas y comprimidos o cápsulas envasados individualmente. Las formas de dosificación unitarias se pueden administrar en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosificación múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitarias idénticas envasadas en un solo contenedor para administrarla en una forma de dosificación unitaria segregada. Los ejemplos de las formas de dosificación múltiples incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas o botellas de pintas o galones. Por lo tanto, la forma de dosificación múltiple es un múltiplo de dosis unitarias que no están segregadas en el embalaje. Generalmente, se pueden preparar formas de dosificación o composiciones que contienen ingrediente activo en el intervalo de 0,005% a 100% siendo el resto un portador no tóxico.

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria típicamente se formulan para administración por vía subcutánea, aunque se contemplan otras vías de administración, tales como cualquier vía conocida por los expertos en la técnica incluyendo intramuscular, intravenosa, intradérmica, intralesional, inyección intraperitoneal, epidural, nasal, oral, vaginal, rectal, tópica, local, ótica, por inhalación, bucal (p.ej. sublingual), y la administración transdérmica o cualquier vía. Las formulaciones adecuadas para tales rutas son conocidas para un experto en la técnica. La administración puede ser local, tópica o sistémica, dependiendo del lugar de tratamiento. La administración local a una zona que necesite tratamiento se puede conseguir mediante, por ejemplo, pero sin limitarse a, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, p.ej., junto con un apósito para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante. Las composiciones también se pueden administrar con otros agentes biológicamente activos, de forma secuencial, de forma intermitente o en la misma composición. La administración también puede incluir sistemas de liberación controlada, incluyendo formulaciones de liberación controlada y dispositivos de liberación controlada, tal como por medio de una bomba.

La vía más adecuada en cualquier caso dado depende de una variedad de factores, tales como la naturaleza de la enfermedad, el progreso de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la composición concreta que se utiliza. Para los propósitos de la presente memoria, se desea que las hialuronidasas se administren de modo que alcancen el intersticio de la piel o los tejidos, degradando de este modo el espacio intersticial para el suministro subsiguiente de inmunoglobulina. Así, se contempla la administración directa debajo de la piel, tal como mediante los métodos de administración subcutánea. Por lo tanto, en un ejemplo, la administración local se puede lograr mediante inyección, tal como desde una jeringa u otro artículo de fabricación que contenga un dispositivo de inyección tal como una aguja. En otro ejemplo, la administración local puede lograrse mediante infusión, que puede ser facilitada por el uso de una bomba u otro dispositivo similar. También se contemplan otros modos de administración. La composición farmacéutica puede formularse en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

En la presente memoria se contempla la administración subcutánea, generalmente caracterizada por inyección o infusión. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, bien como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para su disolución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Las composiciones farmacéuticas pueden contener otras cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, estabilizantes, intensificadores de la solubilidad, y otros agentes semejantes, tales como por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán,

oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. También se contempla en la presente memoria la implantación de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de manera que se mantenga un nivel constante de dosificación (véase, p.ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 3.710.795). El porcentaje de compuesto activo contenido en tales composiciones es altamente dependiente de la naturaleza específica del mismo, así como de la actividad del compuesto y de las necesidades del sujeto.

Los inyectables se diseñan para administración local y sistémica. Para los propósitos de la presente memoria, se desea la administración local para la administración directa al intersticio afectado. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para su inyección, productos solubles secos estériles, tales como polvos liofilizados, listos para ser combinados con un disolvente inmediatamente antes de su uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para su inyección, productos insolubles secos estériles listos para ser combinado con un vehículo inmediatamente antes de su uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas. Si se administran por vía intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS), y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol, y polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables utilizados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes suspensores y dispersantes, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de los vehículos acuosos incluyen Inyección de Cloruro Sódico, Inyección de Solución de Ringer, Inyección de Dextrosa Isotónica, Inyección de Agua Estéril, Inyección de Dextrosa y Solución de Ringer con Lactato Añadido. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijados de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Se pueden añadir agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a las preparaciones parenterales envasadas en recipientes de dosis múltiples, que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres metílicos y propílico ácido p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Los tampones incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen hidrocloreto de procaína. Los agentes suspensores y dispersantes incluyen carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropil metilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen Polisorbato 80 (TWEEN 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los portadores farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles con agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajuste del pH.

La concentración del compuesto farmacéuticamente activo se ajusta de modo que una inyección proporciona una cantidad eficaz para producir el efecto farmacológico deseado. La dosis exacta depende de la edad, peso y estado del paciente o animal como se conoce en la técnica. Las preparaciones parenterales de dosis unitaria se envasan en una ampolla, un vial o una jeringa con una aguja. El volumen de solución líquida o preparación en polvo reconstituida, que contiene el compuesto farmacéuticamente activo, está en función de la enfermedad que vaya a ser tratada y del artículo particular de fabricación elegido para el paquete. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles, como es conocido y puesto en práctica en la técnica.

En un ejemplo, la preparación farmacéutica puede estar en forma líquida, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones. Si se proporcionan en forma líquida, las preparaciones farmacéuticas se pueden proporcionar como una preparación concentrada que se diluye a una concentración terapéuticamente eficaz antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes suspensores (p.ej, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p.ej., lecitina o acacia.); vehículos no acuosos (p.ej., aceite de almendras, ésteres oleosos o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p.ej., p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). En otro ejemplo, las preparaciones farmacéuticas pueden presentarse en forma liofilizada para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso.

Los métodos de administración se pueden emplear para disminuir la exposición de los compuestos seleccionados a procesos de degradación, tales como la degradación proteolítica y la intervención inmunológica a través de respuestas antigénicas e inmunogénicas. Los ejemplos de tales métodos incluyen la administración local en el sitio de tratamiento. Se ha informado sobre la pegilación de agentes terapéuticos para aumentar la resistencia a la proteólisis, aumentar la vida media en plasma, y disminuir la antigenicidad y la inmunogenicidad. Los ejemplos de las metodologías de pegilación son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Lu y Felix, Int. J. Peptide Protein Res., 43: 127-138, 1994; Lu y Felix, Peptide Res., 6: 142-6, 1993; Felix et al., Int. J. Peptide Res., 46 : 253-64, 1995; Benhar et al., J. Biol. Chem., 269: 13398-404, 1994; Brumeau et al., J Immunol., 154: 3088-95, 1995; véanse también, Caliceti et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55(10):1261-77 y Molineux (2003) Pharmacotherapy 23 (8 Pt 2):3S-8S). La pegilación también se puede utilizar en el suministro de moléculas de ácido nucleico *in vivo*. Por ejemplo, la pegilación de adenovirus puede aumentar la estabilidad y la transferencia de genes (véase, por ejemplo,

Cheng et al (2003) Pharm Res 20(9): 1444-1451).

Polvos liofilizados

- 5 Son de interés en la presente memoria los polvos liofilizados, que pueden reconstituirse para su administración en forma de soluciones, emulsiones y otras mezclas. También pueden ser reconstituídos y formulados como sólidos o geles.

10 El polvo estéril, liofilizado se prepara disolviendo un compuesto activo en una solución tampón. La solución tampón puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituída, preparada a partir del polvo. La posterior filtración en condiciones estériles de la solución seguida por la liofilización bajo condiciones convencionales conocidas por los expertos en la técnica proporciona la formulación deseada. En resumen, el polvo liofilizado se prepara disolviendo un excipiente, tal como dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado, en un tampón adecuado, tal como

15 citrato, fosfato sódico o potásico u otro de tales tampones conocidos por los expertos en la técnica. A continuación, se añade una enzima seleccionada a la mezcla resultante, y se agita hasta que se disuelve. La mezcla resultante se esteriliza por filtración o se trata para eliminar las partículas y asegurar la esterilidad, y se reparte en viales para su liofilización. Cada vial contendrá una única dosis o múltiples dosis del compuesto. El polvo liofilizado puede almacenarse en condiciones apropiadas, tal como de aproximadamente 4°C a temperatura ambiente. La

20 reconstitución de este polvo liofilizado con una solución tampón proporciona una formulación para uso en la administración parenteral.

Dosificación y Administración

25 La hialuronidasa soluble proporcionada en la presente memoria se puede formular como composiciones farmacéuticas, típicamente para administración de dosificación individual, combinada con IG. La hialuronidasa soluble seleccionada está incluido en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil de la IG en ausencia de efectos secundarios no deseables sobre el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente sometido a ensayo los polipéptidos en conocidos sistemas in vitro e in vivo por

30 ejemplo mediante el uso de los análisis proporcionados en la presente memoria o conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Taliani et al. (1996) Anal. Biochem., 240: 60-67; Filocamo et al. (1997) J Virology, 71: 1417-1427; Sudo et al. (1996) Antiviral Res. 32: 9-18; Buffard et al. (1995) Virology, 209:52-59; Bianchi et al. (1996) Anal. Biochem., 237: 239-244; Hamatake et al. (1996) Intervirology 39:249-258; Steinkuhler et al. (1998) Biochem., 37:8899-8905; D'Souza et al. (1995) J Gen. Virol., 76:1729-1736; Takeshita et al. (1997) Anal. Biochem., 247:242-246; véanse también p.ej., Shimizu et al. (1994) J. Virol. 68:8406-8408; Mizutani et al. (1996) J. Virol. 70:7219-7223; Mizutani et al. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., 227:822-826; Lu et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci (USA), 93:1412-1417; Hahm et al., (1996) Virology, 226:318-326; Ito et al. (1996) J. Gen. Virol., 77:1043-1054; Mizutani et al. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun., 212:906-911; Cho et al. (1997) J. Virol. Meth. 65:201-207 y a continuación se extrapola de allí para dosificaciones para seres humanos.

40 Típicamente, una dosis terapéuticamente eficaz es, o es de aproximadamente 500 unidades a 100.000 unidades de una hialuronidasa soluble. Por ejemplo, la hialuronidasa soluble se puede administrar por vía subcutánea a, o aproximadamente a, 500 unidades, 1.000 Unidades, 2.000 Unidades, 5.000 unidades, 10.000 unidades, 30.000 unidades, 40.000 unidades,, 50.000 unidades, 60.000 unidades, 70.000 unidades, 80.000 unidades, 90.000

45 unidades, 100.000 unidades o más. En algunos ejemplos, las dosificaciones se pueden proporcionar como una razón de IG administrada. Por ejemplo, la hialuronidasa se puede administrar a 10 U/gramo a 500 U/g o más de IG, por ejemplo, a o aproximadamente a 10 U/g, 20 U/g, 30U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g, 200 U/g, 300 U/g, 400 U/g, 500 U/g o más. Típicamente, los volúmenes de las inyecciones o infusiones de hialuronidasa contempladas en la presente memoria son, o son de aproximadamente, 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4

50 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL o más. La hialuronidasa se puede proporcionar como una solución de reserva a, o aproximadamente a, 50 U/ml, 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 400 U/ml o 500 U/ml o se puede proporcionar en una forma más concentrada, por ejemplo a, o aproximadamente a, 1.000 U/ml, 1.500 Unidades/ml, 2.000 U/ml, 4.000 U/ml o 5.000 U/ml para su uso directamente o para la dilución de la concentración eficaz antes de su uso. La hialuronidasa soluble se puede proporcionar como una formulación

55 líquida o liofilizada. Las formulaciones liofilizadas son ideales para el almacenamiento de dosis de grandes Unidades de hialuronidasa soluble.

Las preparaciones de inmunoglobulina proporcionadas en la presente memoria pueden formularse como composiciones farmacéuticas para uso de dosis única o múltiple. Generalmente, las preparaciones de IG se

60 formulan en composiciones farmacéuticas para alcanzar los regímenes de dosificación (dosis y frecuencias) para los que se preparan y administran las preparaciones intravenosas (IGIV) actuales para enfermedades o afecciones tratables con IG concretas. Un experto en la técnica está familiarizado con los regímenes de dosificación para la administración de IGIV de enfermedades o afecciones particulares. Por ejemplo, la Sección H a continuación proporciona regímenes de dosificación ilustrativos (dosificaciones y frecuencias) de IG para las enfermedades y

afecciones concretas. Otros regímenes de dosificación son bien conocidos para los expertos en la técnica. En algunos ejemplos, la frecuencia de dosificación puede ser diaria durante un intervalo de tiempo determinado en días consecutivos o alternos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días. En otros ejemplos, el régimen de dosificación es semanal, por ejemplo, una vez cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada cinco semanas, cada seis semanas o más. Típicamente, las preparaciones de inmunoglobulina se formulan para administración de una sola dosis en una cantidad suficiente para proporcionar una dosis una vez al mes, pero se pueden proporcionar en cantidades menores para administraciones de dosificación múltiple. Por ejemplo, las dosis mensuales de preparaciones de IG se pueden administrar diariamente, semanalmente, cada dos semanas o una vez al mes. Los regímenes de dosificación se pueden continuar durante meses o años. Las preparaciones de IG se pueden proporcionar en forma liofilizada o líquida como se comentó en otra parte en la presente memoria.

La inmunoglobulina se proporciona en una dosis terapéuticamente eficaz. La concentración terapéuticamente eficaz se puede determinar empíricamente sometiendo a ensayo los compuestos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos, tales como los análisis proporcionados en la presente memoria. La concentración de una inmunoglobulina seleccionada en la composición depende de las tasas de absorción, inactivación y excreción del complejo, las características fisicoquímicas del complejo, la pauta de dosificación, y la cantidad administrada así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento está en función del tejido que está siendo tratado y pueden ser determinadas empíricamente utilizando protocolos de ensayo conocidos o mediante extrapolación a partir de los datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Cabe señalar que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la edad del individuo tratado. Se debe entender adicionalmente que para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración establecidos en la presente memoria son solamente ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la misma. La cantidad de una preparación de inmunoglobulina seleccionada que se va a administrar para el tratamiento de una enfermedad o afección, por ejemplo una enfermedad o afección tratable con IG, puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, se pueden emplear análisis *in vitro* y modelos animales para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos.

Por lo tanto, la dosificación precisa, que puede determinarse empíricamente, puede depender de la preparación de inmunoglobulina concreta, el régimen y el programa de dosificación con la hialuronidasa soluble, la vía de administración, el tipo de enfermedad que se vaya a tratar y la gravedad de la enfermedad. Generalmente, las preparaciones de IG tienen una concentración de proteína que es, o es aproximadamente, de 5 a 15% p/v, de 6 a 15% p/v, o de 8 a 12% p/v de la composición de IG, tal como, por ejemplo, 10% p/v. Por ejemplo, la IG se proporciona en una cantidad que permite la administración subcutánea de una dosis equivalente a una dosis IV una vez al mes para la indicación particular que está siendo tratada. La dosis IV mensual concreta está en función de la enfermedad que se vaya a tratar, y por lo tanto puede variar. Los intervalos de dosificación ilustrativos para la administración subcutánea de IG son de o aproximadamente 1 gramo (g), 5 g, 10 g, 20 g, 30 g, 40 g, 50 g, 60 g, 70 g, 80 g, 90 g, 100 g o 200 g. La dosificación concreta y su formulación, dependen de la indicación y del individuo. Por ejemplo, las dosificaciones se pueden administrar a 50 mg/kg de peso corporal (PC), 100 mg/kg PC, 200 mg/kg PC, 300 mg/kg PC, 400 mg/kg PC, 500 mg/kg PC, 600 mg/kg PC, o más. Si fuera necesario la dosis puede ser determinada empíricamente. Para lograr tales dosis, los volúmenes de las preparaciones de IG administrados por vía subcutánea pueden ser, o ser aproximadamente, de 50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL o más. Por ejemplo, una formulación líquida de IG al 10% (100 mg/mL) para las indicaciones descritas en la presente memoria se puede administrar en un volumen de 50 mL a 700 mL para lograr una dosificación de 0,5 g a 70 g de IG.

Cuando se administran grandes volúmenes, la administración es típicamente por infusión. A los sujetos se les pueden administrar dosis a tasas de infusión de, o aproximadamente de, 0,5 mL/kg/PC/h, 1 mL/kg/PC/h, 2 mL/kg/PC/h, 3 mL/kg/PC/h, 4 mL/kg/PC/h, o 5 mL/kg/PC/h. La tasa de infusión se puede determinar empíricamente, y típicamente está en función de la tolerancia del sujeto. Si se produce una reacción adversa durante la infusión, la tasa de infusión puede ser ralentizada a la tasa inmediatamente anterior a aquella a la que se produjo el evento adverso. Si el evento adverso se resuelve en respuesta a la reducción en la velocidad, la tasa de infusión se puede aumentar lentamente a la discreción del médico. La infusión de IG subcutánea puede facilitarse por gravedad, bomba de infusión o inyección de una dosis completa de 20-30 gramos. En general, para las infusiones se pueden emplear bombas de infusión intravenosa. La IG se puede infundir a tasas de, o de aproximadamente, 5 mL/h, 10 mL/h, 30 mL/h, 60 mL/h, 120 mL/h, 240 mL/h o 300 mL/h. Las tasas de infusión se puede incrementar durante el curso del tratamiento, siempre que la infusión sea tolerada por el paciente. Generalmente, el tiempo de administración de la infusión es, o es de aproximadamente 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 2,5 h, 3 h, 4 h o más. Debido a la alta tasa de infusión lograda mediante la administración subcutánea de IG co-formulada y/o co-administrada con hialuronidasa, el tiempo de infusión es significativamente menor que para las terapias de IGIV convencionales. Cuando el tiempo de infusión excede el límite deseado, se puede iniciar un segundo sitio de infusión a discreción del médico y del sujeto. El segundo sitio típicamente se inicia al menos a 10 cm del sitio inicial.

Las técnicas para la infusión son conocidas para un experto en la técnica, y están dentro del conocimiento práctico de un médico a cargo. Generalmente, la dosis apropiada de IG se puede agrupar en una bolsa IV convencional. Por ejemplo, se puede utilizar un equipo de infusión no ventilado que tiene un puerto Y cerca de su extremo. Se puede insertar una aguja de infusión subcutánea de calibre 24 en un sitio de preferencia del sujeto, pero se recomiendan el abdomen y en segundo lugar los muslos debido al volumen de solución que se debe infundir. La hialuronidasa y la IG se pueden proporcionar en el mismo aparato con puerto Y. También se pueden usar otros artículos de fabricación en la presente memoria para los fines de infusión por gravedad o una bomba, e incluyen, pero no se limitan a tubos, botellas, jeringas u otros recipientes.

La hialuronidasa soluble se puede administrar con posterioridad, de forma intermitente o de forma simultánea desde la preparación IG. Generalmente, la hialuronidasa se administra antes de la administración de la preparación de IG para permitir que la hialuronidasa degrade el ácido hialurónico en el espacio intersticial. Por ejemplo, la hialuronidasa soluble se puede administrar 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 20 minutos o 30 minutos antes de la administración de la preparación de IG. En algunos ejemplos, la hialuronidasa se administra junto con la preparación de inmunoglobulina. Como apreciarán los expertos en la técnica, la proximidad deseada de la co-administración depende en gran medida de las vidas medias efectivas de los agentes en el ajuste de tejido concreto, y la enfermedad particular que se vaya a tratar, y se puede optimizar fácilmente sometiendo a ensayo los efectos de la administración de los agentes a tiempo variables en modelos adecuados, tales como en modelos animales adecuados. En algunas situaciones, el momento óptimo de administración de la hialuronidasa excederá de 60 minutos.

Generalmente, antes de la infusión de IG, se inyecta una hialuronidasa soluble a una velocidad de o de aproximadamente 0,2 mL/min, 0,5 mL/min, 1 mL/min, 2 mL/min, 5 mL/min, 10 mL/min o más. Por ejemplo, la hialuronidasa soluble se puede inyectar a través del mismo puerto Y utilizado para la posterior infusión de IG. Como se señaló anteriormente, el volumen de hialuronidasa soluble administrada está en función de la dosis requerida, pero se puede variar dependiendo de la concentración de una provisión de partida de hialuronidasa soluble disponible. Por ejemplo, en la presente memoria se contempla que la hialuronidasa soluble no se administre a volúmenes mayores de aproximadamente 50 mL, y típicamente se administra a un volumen de 5-30 mL. Se puede utilizar una bomba de jeringa para los volúmenes más altos, a discreción del médico.

En caso de que no se tolere una infusión (p.ej., ésta causa reacciones locales de moderadas a graves), se puede iniciar un segundo sitio de la infusión de modo que el sujeto reciba la dosis completa.

Una preparación de IG se puede administrar de una vez, o puede dividirse en un número de dosis más pequeñas que se deben administrar a intervalos de tiempo. Las preparaciones de IG seleccionadas se pueden administrar en una o más dosis en el transcurso de un tiempo de tratamiento, por ejemplo, durante varias horas, días, semanas o meses. En algunos casos, es útil la administración continua. Se entiende que la dosificación precisa y el curso de administración depende de la indicación y la tolerabilidad de los pacientes.

También, se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento está en función de la enfermedad que se esté tratando y pueden determinarse empíricamente utilizando protocolos de ensayo conocidos o mediante extrapolación a partir de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Cabe señalar que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección que se deba aliviar. Se debe entender adicionalmente que para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración establecidos en la presente memoria son únicamente ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance o uso de las composiciones y combinaciones que las contienen. Las composiciones pueden administrarse cada hora, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o de una vez. En general, los regímenes de dosificación se seleccionan para limitar la toxicidad. Cabe señalar que el médico encargado sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia para disminuir la dosis debido a la toxicidad, o a disfunciones de la médula ósea, el hígado o el riñón u de otros tejidos. Por el contrario, el médico encargado también sabría cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no fuera la adecuada (excluyendo los efectos secundarios tóxicos).

Métodos de Evaluación de la Actividad, Biodisponibilidad y Farmacocinética

Se pueden utilizar análisis para evaluar las actividades *in vitro* e *in vivo* de la inmunoglobulina sola o combinada con una hialuronidasa soluble. Están incluidos entre tales análisis los que evalúan las propiedades farmacocinéticas de la inmunoglobulina administrada por vía subcutánea, incluyendo la biodisponibilidad, y la tolerabilidad. La actividad biológica de la inmunoglobulina y de la hialuronidasa también puede evaluarse utilizando análisis bien conocidos en la técnica. Tales análisis se pueden utilizar, por ejemplo, para determinar las dosis apropiadas de inmunoglobulina y de hialuronidasa, y la frecuencia de dosificación, para el tratamiento.

1. Farmacocinética y tolerabilidad

Se pueden realizar estudios farmacocinéticos y de tolerabilidad, tales como los descritos en los Ejemplos 1, a continuación, utilizando modelos animales o pueden realizar durante los estudios clínicos con pacientes. Los modelos animales incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, perros, cobayas y modelos de primates no humanos, tales como monos cynomolgus o macacos rhesus. En algunos casos, los estudios de farmacocinética y tolerabilidad se realizan utilizando animales sanos. En otros ejemplos, los estudios se realizan utilizando modelos animales de una enfermedad para la que se considera la terapia con inmunoglobulina, tales como modelos animales de cualquiera de las enfermedades y afecciones descritas a continuación.

La farmacocinética de la administración subcutánea de la inmunoglobulina se puede evaluar mediante la medición de parámetros tales como la concentración de inmunoglobulina en plasma máxima (pico) (C_{max}), el tiempo de pico (es decir, cuando se produce la máxima concentración plasmática de inmunoglobulina; T_{max}), la concentración de inmunoglobulina en plasma mínima (es decir, la concentración mínima en plasma entre las dosis de inmunoglobulina; C_{min}), la semivida de eliminación ($T_{1/2}$) y el área bajo la curva (es decir, el área bajo la curva generada trazando el tiempo frente a la concentración de inmunoglobulina en plasma; AUC), después de la administración. La biodisponibilidad absoluta de la inmunoglobulina administrada por vía subcutánea se determina comparando el área bajo la curva de la inmunoglobulina después de la administración subcutánea (AUC_{sc}) con el AUC de la inmunoglobulina después de la administración intravenosa (AUC_{iv}). La biodisponibilidad absoluta (F), se puede calcular utilizando la fórmula: $F = ([AUC]_{sc} \times dosis_{sc}) / ([AUC]_{iv} \times dosis_{iv})$. La concentración de inmunoglobulina en el plasma después de la administración subcutánea se puede medir utilizando cualquier método conocido en la técnica adecuado para evaluar concentraciones de inmunoglobulina en muestras de sangre. Los métodos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ELISA y nefelometría.

Se pueden administrar un intervalo de dosis y frecuencia de dosificación diferente de la dosificación en los estudios farmacocinéticos para evaluar el efecto del aumento o la disminución de las concentraciones de inmunoglobulina y/o hialuronidasa en la dosis. También se pueden evaluar las propiedades farmacocinéticas de administración subcutánea de inmunoglobulina, tales como la biodisponibilidad, con o sin co-administración de hialuronidasa. Por ejemplo, los perros, tales como beagles, pueden recibir dosis por vía subcutánea de inmunoglobulina combinada con hialuronidasa, o solas. También se administran dosis intravenosas de inmunoglobulina a otro grupo de beagles. Las muestras de sangre se pueden tomar en distintos puntos horarios y se puede determinar la cantidad de inmunoglobulina en el plasma, por ejemplo mediante nefelometría. A continuación, se puede medir el AUC y se puede determinar la biodisponibilidad de la inmunoglobulina administrada por vía subcutánea administrada con o sin hialuronidasa. Tales estudios pueden llevarse a cabo para evaluar el efecto de la co-administración con hialuronidasa sobre las propiedades farmacocinéticas, por ejemplo sobre la biodisponibilidad, de la inmunoglobulina administrada por vía subcutánea.

Los estudios para evaluar la seguridad y tolerabilidad son también conocidos en la técnica y se pueden utilizar en la presente memoria. Después de la administración subcutánea de inmunoglobulina, con o sin co-administración de hialuronidasa, se puede verificar el desarrollo de las reacciones adversas. Las reacciones adversas pueden incluir, pero sin limitarse a, reacciones en el lugar de la inyección, tales como edema o hinchazón, dolor de cabeza, fiebre, fatiga, escalofríos, rubor, mareos, urticaria, sibilancias u opresión en el pecho, náuseas, vómitos, escalofríos, dolor de espalda, dolor de pecho, calambres musculares, convulsiones, cambios en la presión arterial y respuestas de hipersensibilidad anafilácticas o graves. Típicamente, se puede administrar un intervalo de dosis y diferentes frecuencias de dosificación en los estudios de seguridad y tolerabilidad para evaluar el efecto de aumento o disminución de las concentraciones de inmunoglobulina y/o hialuronidasa en la dosis.

2. Actividad biológica

a. Inmunoglobulina

La capacidad de la inmunoglobulina para actuar como un agente terapéutico se puede evaluar *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, se pueden realizar análisis *in vitro* para evaluar la capacidad de la inmunoglobulina para neutralizar la infectividad viral o bacteriana (Hiemstra et al., (1994) J Lab Clin Med 123:241-6). Se pueden utilizar otros análisis *in vitro* ensayos para evaluar otras actividades biológicas de la inmunoglobulina. Por ejemplo, se puede evaluar la capacidad de las preparaciones de inmunoglobulina para interactuar con y modular los productos activados por el complemento, anticuerpo idiotípico de unión, receptores de unión a Fc sobre los macrófagos, y suprimir diversos mediadores inflamatorios, incluyendo citocinas, quimiocinas, y metaloproteinasas, utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, ELISA, transferencia Western, transferencia Northern, y citometría de flujo para evaluar la expresión del marcador. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de la inmunoglobulina sobre la expresión de receptores de quimiocinas sobre las células mononucleares de sangre periférica utilizando citometría de flujo (Trebst et al., (2006) Eur J Neurología). En otro ejemplo, se puede evaluar el efecto de la inmunoglobulina sobre la expresión de metaloproteinasa en macrófagos utilizando análisis de transferencia Northern (Shapiro et al., (2002) Cancer 95:2032-2037).

También se puede realizar estudios *in vivo* que utilizan modelos animales para evaluar la actividad terapéutica de la

inmunoglobulina. La inmunoglobulina se puede administrar a modelos animales infectados con uno o más microorganismos y se puede evaluar el efecto sobre la progresión de la infección, por ejemplo midiendo el número de microorganismos o midiendo el peso como un marcador de morbilidad. También puede evaluarse el efecto terapéutico de la inmunoglobulina utilizando modelos animales de las enfermedades y afecciones para las que se considera la terapia que utiliza inmunoglobulina. Tales modelos animales se conocen en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, los modelos animales pequeños para la agammaglobulinemia ligada a X (XLA), SCID, síndrome de Wiskott-Aldrich, enfermedad de Kawasaki, síndrome de Guillain-Barré, PTI, polimiositis, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, miastenia grave y síndrome de Moersch-Woltmann (Czitrom et al (1985) J Immunol 134:2276-2280, Ellmeier et al., (2000) J Exp Med. 192: 1611-1624, Ohno (2006) Drug Discovery Today: Disease Models 3:83-89, Oyaizu et al (1988) J Exp Med 171:2017-2022, Hansen et al., (2002) Blood 100:2087-2093, Strongwater et al., (1984) Arthritis Rheum. 27:433-42, Kim et al. (1998) Annals NY Acad Sci 841:670-676, Christadoss et al. (2000) 94:75-87, Sommer et al., (2005) Lancet 365:1406-1411, Patente de Estados Unidos Núm.7309810)

b. Hialuronidasa

La actividad hialuronidasa se puede evaluar utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. En un ejemplo, la actividad se mide utilizando un análisis de microturbidez. Esto se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une a la albúmina sérica. La actividad se mide incubando la hialuronidasa con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) para un período de tiempo especificado (por ejemplo 10 minutos) y a continuación precipitando el hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina de suero acidulada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un período de desarrollo adicional. La disminución de la turbidez resultante de la actividad de la hialuronidasa sobre el sustrato de hialuronato sódico es una medida de la actividad enzimática de la hialuronidasa. En otro ejemplo, la actividad de la hialuronidasa se mide utilizando un análisis de microtitulación en el que se mide el ácido hialurónico biotinilado residual después de la incubación con hialuronidasa (véanse, p.ej. Frost y Stern (1997) Anal. Biochem. 251:263-269, la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 20050260186). Los grupos carboxilo libres en los residuos de ácido glucurónico del ácido hialurónico son biotinilados, y el sustrato de ácido hialurónico biotinilado es unido covalentemente a una placa de microtitulación. Después de la incubación con hialuronidasa, el sustrato de ácido hialurónico biotinilado residual se detecta utilizando una reacción de avidina-peroxidasa, y se compara con el obtenido después de la reacción con los patrones de hialuronidasa de actividad conocida. Otros análisis para medir la actividad hialuronidasa también son conocidos en la técnica y se puede utilizar en los métodos de la presente memoria (véase, p.ej. Delpech et al., (1995) Anal Biochem 229:35-41; Takahashi et al., (2003) Anal. Biochem. 322:257-263).

También se puede evaluar la capacidad de la hialuronidasa para actuar como un agente de propagación o difusión. Por ejemplo, se puede inyectar colorante azul de tripano por vía subcutánea con o sin hialuronidasa en la piel lateral a cada lado de ratones carentes de sistema inmune. A continuación se mide la zona teñida, por ejemplo con un microcalibre, para determinar la capacidad de hialuronidasa para actuar como un agente de propagación (Patente de Estados Unidos Núm. 20060104968).

Usos terapéuticos

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para el tratamiento de cualquier enfermedad para la que se emplea la inmunoglobulina. La inmunoglobulina (IG) se puede administrar por vía subcutánea, combinada con hialuronidasa, para tratar cualquier afección que sea modificable con el tratamiento con inmunoglobulina. Esta sección proporciona usos terapéuticos ilustrativos de la IG. Los usos terapéuticos descritos a continuación son ilustrativos y no limitan las aplicaciones de los métodos descritos en la presente memoria. Los usos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, terapia de reemplazo de inmunoglobulina y terapia de inmunomodulación para diversas enfermedades y afecciones inmunológicas, hematológicas, neurológicas, inflamatorias, dermatológicas y/o infecciosas. En algunos ejemplos, la inmunoglobulina se administra para aumentar la respuesta inmunitaria en pacientes sanos, por ejemplo después de la posible exposición a enfermedades infecciosas (p.ej., lesión por pinchazo de aguja accidental). Está dentro del conocimiento práctico de un médico a cargo del tratamiento la identificación de tales enfermedades o afecciones.

La inmunoglobulina se puede co-administrar con hialuronidasa por vía subcutánea, combinada con otros agentes utilizados en el tratamiento de estas enfermedades y afecciones. Por ejemplo, otros agentes que se pueden administrar incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, agentes quimioterapéuticos, esteroides antiinflamatorios, antiinflamatorios no esteroideos, y otros agentes inmunomoduladores tales como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento.

Si fuera necesario, se pueden determinar o extrapolar empíricamente una dosificación concreta y la duración y el protocolo de tratamiento. Por ejemplo, se pueden utilizar dosis ilustrativas de la inmunoglobulina administrada por vía intravenosa como punto de partida para determinar las dosificaciones apropiadas. Los niveles de dosificación pueden ser determinados basándose en una variedad de factores, tales como el peso corporal del individuo, la salud general, edad, la actividad del compuesto específico empleado, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la

velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad y curso de la enfermedad, y la disposición del paciente a la enfermedad y el criterio del médico a cargo. Generalmente, las dosis de inmunoglobulina son, o son aproximadamente, de 100 mg por kg de peso corporal (es decir, 100 mg/kg PC) a 2 g/kg PC, y las dosis de hialuronidasa son, o son aproximadamente, de 10 U/gramo a 500 U/g o más de inmunoglobulina, por ejemplo, son, o son aproximadamente, de 10 U/g, 20 U/g, 30 U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g, 200 U/g, 300 U/g, 400 U/g, 500 U/g o más. Se entiende que la cantidad que se debe administrar estará en función de la indicación tratada, y posiblemente de los efectos secundarios que serán tolerados. Las dosificaciones se pueden ser determinar empíricamente utilizando modelos reconocidos para cada trastorno.

Tras la mejora de la afección de un paciente, se puede administrar por vía subcutánea una dosis de mantenimiento de inmunoglobulina combinada con hialuronidasa, si fuera necesario, y se pueden modificar la dosis, la forma de dosificación, o la frecuencia de administración, o una combinación de las mismas. En algunos casos, un sujeto puede requerir un tratamiento intermitente en una base a largo plazo tras cualquier reaparición de los síntomas de la enfermedad.

1. Inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos

La inmunoglobulina se puede utilizar para tratar la inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos. La inmunodeficiencia primaria abarca muchos trastornos que se caracterizan por una deficiencia de una o más proteínas del sistema inmunológico. Típicamente, las inmunodeficiencias primarias son trastornos hereditarios, y muchos se manifiestan por la insuficiencia de producción de anticuerpos protectores. Por lo tanto, la inmunoglobulina se puede administrar como terapia de reemplazo de inmunoglobulina a los pacientes que presentan este tipo de enfermedades. Los ejemplos de inmunodeficiencias primarias incluyen, pero no se limitan a, inmunodeficiencia variable común (CVID), agammaglobulinemia congénita, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada severa (SCID), hipogammaglobulinemia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA), hipogammaglobulinemia de la infancia, y degeneración cerebelosa paraneoplásica sin anticuerpos. La inmunoglobulina se puede administrar por vía subcutánea, combinada con hialuronidasa, a pacientes con inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos a dosis similares a las dosis utilizadas para la administración intravenosa de inmunoglobulina. Las dosis ilustrativas incluyen, por ejemplo, entre 100 mg/kg PC y 800 mg/kg PC de inmunoglobulina, a intervalos de cuatro semanas. La dosis se puede aumentar o disminuir, al igual que la frecuencia de las dosis, dependiendo de la respuesta clínica.

2. Hipogammaglobulinemia adquirida secundaria a neoplasias hematológicas

Los pacientes con hipogammaglobulinemia adquirida secundaria a tumores malignos hematológicos, tales como leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM), linfoma no Hodgkiniano (LNH) y otros tumores malignos relevantes y trasplante post-hematopoyético de células madre, son susceptibles a infecciones bacterianas debido a. La hipogammaglobulinemia es causada por una carencia de linfocitos B y un bajo nivel resultante de anticuerpos en la sangre, y puede aparecer en pacientes con LLC, MM, NHL y como resultado tanto de la disfunción inmunológica relacionada con la leucemia y de la inmunosupresión relacionada con el tratamiento. La deficiencia de inmunidad humoral es en gran parte responsable del aumento del riesgo de morbilidad relacionada con la infección y la mortalidad en estos pacientes, especialmente por microorganismos encapsulados. Por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, y *Staphylococcus aureus*, así como Legionella y Nocardia spp. son patógenos bacterianos frecuentes que causan neumonía en pacientes con LLC. También se han observado infecciones oportunistas tales como *Pneumocystis carinii*, hongos, virus, y micobacterias. El número y la gravedad de las infecciones en estos pacientes pueden reducirse significativamente mediante la administración de inmunoglobulina (Griffiths et al., (1989) Blood 73:366-368, Chapel et al. (1994) Lancet 343:1059-1063). A estos pacientes, se les puede administrar por lo tanto, inmunoglobulina por vía subcutánea combinada con hialuronidasa utilizando los métodos descritos en la presente memoria para prevenir las infecciones recurrentes. Las dosis ilustrativas incluyen las utilizadas para la administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con hipogammaglobulinemia adquirida secundaria a neoplasias hematológicas. Por ejemplo, se pueden administrar aproximadamente 400 mg/kg PC de inmunoglobulina, combinada hialuronidasa, por vía subcutánea cada 3 a 4 semanas. En otro ejemplo, se puede administrar una dosis adicional de 400 mg/kg de peso corporal el primer mes de terapia cuando la IgG en suero del paciente es menor que 4 g/L. La cantidad de inmunoglobulina administrada, y la frecuencia de las dosis, se pueden aumentar o disminuir según sea apropiado.

3. Enfermedad de Kawasaki

La enfermedad de Kawasaki es un enfermedad aguda, febril, multi-sistémica de los niños y los bebés pequeños que a menudo implica las arterias coronarias. También se conoce como síndrome del nódulo linfático, enfermedad nodomucocutánea, poliarteritis infantil y el síndrome de Kawasaki, y es una vasculitis autolimitada escasamente entendida que afecta a muchos órganos, incluyendo la piel y las membranas mucosas, los ganglios linfáticos, las paredes de los vasos sanguíneos, y el corazón. Pueden aparecer aneurismas de la arteria coronaria a partir de la

segunda semana de la enfermedad durante el período de convalecencia. Aunque la causa de la enfermedad es desconocida, hay pruebas de que la vasculitis característica resulta de una reacción inmunológica caracterizada por activación de las células T y de macrófagos frente a un antígeno desconocido, secreción de citocinas, hiperactividad de células B policlonales, y formación de autoanticuerpos contra células endoteliales y células musculares lisas. En individuos genéticamente susceptibles, uno o más agentes infecciosos comunes no caracterizados, posiblemente con actividad superantigénica, pueden desencadenar la enfermedad. La inmunoglobulina administrada temprano en la enfermedad de Kawasaki puede prevenir la patología de la arteria coronaria. La administración subcutánea de la inmunoglobulina combinada con hialuronidasa a los pacientes con inflamación en curso asociada con la enfermedad de Kawasaki puede mejorar los síntomas. Las dosis ilustrativas incluyen las utilizados para la administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con la enfermedad de Kawasaki. Por ejemplo, a un paciente con la enfermedad de Kawasaki se le pueden administrar aproximadamente 1-2 g por kg de peso corporal del paciente de inmunoglobulina. Esta se puede administrar, por ejemplo, en cuatro dosis de 400 mg/kg PC durante cuatro días consecutivos. En otro ejemplo, se administra 1 g/kg PC de inmunoglobulina como una dosis única a lo largo de un periodo de 10 horas. La cantidad de inmunoglobulina administrada se puede aumentar o disminuir según sea apropiado.

4. Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica

Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC) es un trastorno neurológico caracterizado por una debilidad progresiva y deterioro de la función sensorial en las piernas y los brazos. El trastorno, que a veces denomina polineuropatía crónica recidivante, es causada por daños en la vaina de mielina de los nervios periféricos. Aunque puede ocurrir a cualquier edad y en ambos sexos, la PDIC es más común en adultos jóvenes y en los hombres más aún que en las mujeres. A menudo se presenta con síntomas que incluyen entumecimiento u hormigueo (comenzando en los dedos de los pies y los dedos), debilidad de los brazos y las piernas, pérdida de los reflejos tendinosos profundos (arreflexia), fatiga y sensaciones anormales. La PDIC está estrechamente relacionada con el síndrome de Guillain-Barre y se considera la contraparte crónica de esa enfermedad aguda. No existe una prueba de diagnóstico específica pero hallazgos clínicos y de laboratorio característicos ayudan a distinguir este trastorno de otros síndromes neuropáticos mediados por el sistema inmunitario. Los estudios indican que el tratamiento con inmunoglobulina reduce los síntomas (van Schaik et al., (2002) Lancet Neurol 1:497-498). Por lo tanto, la inmunoglobulina puede ser co-administrada con hialuronidasa subcutáneamente a los pacientes que se presentan con PDIC utilizando los métodos descritos en la presente memoria. Las dosis ilustrativas incluyen las utilizadas para la administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con PDIC. En un ejemplo, a un paciente con PDIC se le administran aproximadamente 2 g/kg de peso corporal por vía subcutánea de la inmunoglobulina, combinada con hialuronidasa. Ésta se puede administrar, por ejemplo, en cinco dosis de 400 mg/kg de peso corporal durante cinco días consecutivos. La cantidad de inmunoglobulina administrada se puede aumentar o disminuir según sea apropiado.

5. Síndrome de Guillain-Barré

El síndrome de Guillain-Barré es un trastorno autoinmunitario neurológico que implica la desmielinización inflamatoria de los nervios periféricos. Los primeros síntomas incluyen distintos grados de debilidad o sensaciones de hormigueo en las piernas, que puede extenderse a los brazos y el cuerpo superior. Estos síntomas pueden aumentar en intensidad hasta que los músculos no pueden utilizarse en absoluto y el paciente está casi totalmente paralizado, lo que da como resultado un trastorno potencialmente mortal. Aunque la recuperación es generalmente buena o completa en la mayoría de los pacientes, se ha informado de discapacidad persistente que se produce en aproximadamente 20% y de muerte en 4 a 15% de los pacientes. El síndrome de Guillain-Barré puede aparecer unos pocos días o semanas después de los síntomas de una infección viral respiratoria o gastrointestinal. En algunos casos, la cirugía o vacunas pueden desencadenar el síndrome. El trastorno puede desarrollarse durante el curso de horas o días, o puede tomar hasta 3 a 4 semanas. Una prueba de velocidad de conducción nerviosa (NCV) puede dar pistas al médico para ayudar al diagnóstico. En algunos casos, se puede utilizar una punción lumbar en el diagnóstico puesto que el fluido cerebrospinal en pacientes con síndrome de Guillain-Barre contiene típicamente más proteína que los sujetos normales.

Aunque no existe una cura conocida para el síndrome de Guillain-Barre, el tratamiento con inmunoglobulina puede disminuir la gravedad de la enfermedad y acelerar la recuperación. La inmunoglobulina se puede administrar por vía subcutánea a pacientes combinada con hialuronidasa a una dosis apropiada, tal como, por ejemplo, una dosis similar a la dosis utilizada para administrar la inmunoglobulina por vía intravenosa a pacientes con síndrome de Guillain-Barre. Por ejemplo, a un paciente con síndrome de Guillain-Barre se le pueden administrar aproximadamente 2 g/kg PC de inmunoglobulina, combinada con hialuronidasa, por vía subcutánea. Ésta se puede administrar, por ejemplo, en cinco dosis de 400 mg/kg PC durante cinco días consecutivos. La cantidad de inmunoglobulina administrada se puede aumentar o disminuir dependiendo de, por ejemplo, la gravedad de la enfermedad y la respuesta clínica a la terapia, que puede ser evaluada fácilmente por un experto en la técnica.

6. Púrpura trombocitopénica idiopática

La púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), también conocida como púrpura trombocitopénica inmunológica primaria y púrpura trombocitopénica autoinmune, es una reducción del recuento de plaquetas (trombocitopenia) como resultado del acortamiento de la supervivencia de las plaquetas debido a los anticuerpos anti-plaquetarios. Cuando los recuentos de plaquetas son muy bajos (por ejemplo, $<30 \times 10^9/L$), puede aparecer sangrado en la piel (púrpura) y de las membranas mucosas. La producción de plaquetas en la médula ósea (megacariopoyesis) en pacientes con PTI es morfológicamente normal. En algunos casos, existe un deterioro adicional de la función plaquetaria relacionado con la unión de anticuerpos a las glicoproteínas en la superficie de las plaquetas. La PTI se puede presentar como formas crónicas y agudas. Aproximadamente el 80% de los adultos con PTI tienen la forma crónica de la enfermedad. La mayor incidencia de PTI crónica es en mujeres de 15-50 años, aunque algunos informes sugieren una incidencia creciente con la edad. La PTI es relativamente común en pacientes con VIH. Si bien la PTI se puede encontrar en cualquier etapa de la infección, su prevalencia aumenta a medida que avanza la enfermedad del VIH.

Los estudios han demostrado que se puede utilizar inmunoglobulina para tratar a pacientes con PTI (Godeau et al. (1993) Blood 82(5): 1415-1421., Godeau et al. (1999) Br J Haematol 1999;107(4):716-9). La inmunoglobulina se puede administrar por vía subcutánea a pacientes combinada con hialuronidasa a una dosis similar a la dosis utilizada para administrar la inmunoglobulina por vía intravenosa, para tratar pacientes con PTI. Por ejemplo, a un paciente con PTI se le pueden administrar aproximadamente 1 a 2 g/kg de inmunoglobulina, combinada con hialuronidasa, por vía subcutánea. Ésta puede ser administrada durante varios días, o se puede administrar en una dosis. En algunos ejemplos, se administran cinco dosis de 400 mg/kg PC de inmunoglobulina en días consecutivos. En otro ejemplo, se administra 1 g/kg PC durante 1-2 días consecutivos, en función de recuento de plaquetas y la respuesta clínica. La cantidad de inmunoglobulina administrada, y la frecuencia de las dosis, se pueden aumentar o disminuir dependiendo, por ejemplo, del recuento de plaquetas y de la respuesta clínica a la terapia, que puede ser evaluada fácilmente por un experto en la técnica.

7. Miopatías inflamatorias: polimiositis, dermatomiositis y miositis por cuerpos de inclusión

Las miopatías inflamatorias son un grupo de enfermedades musculares que implican la inflamación y la degeneración de los tejidos del músculo esquelético. Estos trastornos son adquiridos y todos se presentan con debilidad muscular significativa y la presencia de una respuesta inflamatoria dentro del músculo. La dermatomiositis (DM) es la más fácil de reconocer de las miopatías inflamatorias debido a su erupción característica, que se produce como una erupción irregular, oscura, rojiza o lila en los párpados, las mejillas y el puente de la nariz y en la espalda o parte superior del pecho, los codos, las rodillas y los nudillos. En algunos pacientes, se desarrollan bajo la piel nódulos calcificados o protuberancias endurecidas. La erupción a menudo precede a la debilidad muscular, que normalmente se desarrolla durante un período de semanas, pero puede desarrollarse durante meses o incluso días. La dermatomiositis puede aparecer a cualquier edad, desde la infancia a la edad adulta y es más común en mujeres que en hombres. Aproximadamente un tercio de los pacientes con DM informan de dificultad para tragar. El dolor muscular y la sensibilidad se producen generalmente en menos de 25% de los adultos con DM, pero más de 50% de los niños con DM se quejan de dolor muscular y sensibilidad.

La polimiositis (PM) no tiene la erupción característica de la dermatomiositis, y la aparición de debilidad muscular típicamente avanza más lenta que en la DM. Muchos pacientes con PM presentes tienen dificultad para tragar. En algunos casos, los pacientes también tienen dificultad para respirar debido al fallo muscular. Se cree que una tercera parte de los pacientes de PM tiene dolor muscular. PM. La enfermedad afecta a más mujeres que a hombres, y rara vez afecta a personas menores de 20 años, aunque se ha informado sobre casos de polimiositis en niños y en lactantes.

La miositis por cuerpos de inclusión (MCI) es muy similar a la polimiositis. El inicio de la debilidad muscular en la MCI suele ser muy gradual, teniendo lugar durante meses o años. Es diferente de la PM ya que se ven afectados los músculos tanto proximales como distales, mientras que generalmente sólo se ven afectados en la PM los músculos proximales. Los hallazgos típicos incluyen debilidad de los flexores de la muñeca y flexores de los dedos. La atrofia de los antebrazos es característica de la enfermedad, y es común la atrofia del músculo cuádriceps con diversos grados de debilidad en otros músculos. Aproximadamente la mitad de los pacientes que sufren de MCI tiene dificultad para tragar. Los síntomas de MCI generalmente comienzan después de los 50 años, aunque no se excluye ningún grupo de edad. La MCI se produce con mayor frecuencia en hombres que en mujeres. Aproximadamente uno de cada diez casos de MCI pueden ser hereditarios.

Los estudios indican que la administración de inmunoglobulina puede beneficiar a los pacientes con estas miopatías inflamatorias. La inmunoglobulina puede mejorar la fuerza muscular, reducir la inflamación y reducir la progresión y la gravedad de la enfermedad (Dalakas et al. (1993) N Engl J Med 329(27):1993-2000; Dalakas et al. (2001) Neurology 56(3):323-7, Dalakas (2004) Pharmacol Ther 102(3):177-93, Walter et al. (2000) J Neurol 247(1):22-8). La inmunoglobulina se puede administrar por vía subcutánea a pacientes con DM, PM o MCI combinada con hialuronidasa a una dosis similar a la dosis utilizada para administrar la inmunoglobulina por vía intravenosa. Por ejemplo, se pueden administrar 2 g/kg de peso corporal de inmunoglobulina, típicamente durante varios días, tal

como, por ejemplo, cinco dosis de 400 mg/kg PC en días consecutivos.

8. Síndrome miasténico de Lambert-Eaton

5 El síndrome miasténico de Lambert-Eaton (SMLE) es un trastorno autoinmunitario raro de la transmisión neuromuscular reconocido clínicamente por primera vez asociado con el cáncer de pulmón y, posteriormente, en casos en los que no se detectaba neoplasia. Los pacientes con SMLE tienen un defecto de la unión neuromuscular presináptica. La enfermedad se caracteriza clínicamente por debilidad de la musculatura proximal con aumento de la fuerza después del ejercicio, signos oculomotores suaves, reflejos tendinosos profundos deprimidos y disfunción autónoma (boca seca, estreñimiento, insuficiencia eréctil). La administración subcutánea de inmunoglobulina combinada con hialuronidasa a los pacientes con SMLE puede mejorar los síntomas. Las dosis ilustrativas incluyen las utilizadas para la administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con SMLE. Por ejemplo, a un paciente con SMLE se le pueden administrar 2 g por kg de peso corporal del paciente de inmunoglobulina a lo largo de varias dosis. Por ejemplo, se pueden administrar cinco dosis de 400 mg/kg PC de inmunoglobulina en cinco días consecutivos. La cantidad de inmunoglobulina administrada se puede ser aumentar o disminuir según sea apropiado.

9. Neuropatía motora multifocal

20 La neuropatía motora multifocal (NMM) con bloqueo de la conducción es una neuropatía desmielinizante mediada por el sistema inmunitario adquirida con debilidad lentamente progresiva, fasciculaciones y calambres, sin participación sensorial significativa. La duración de la enfermedad antes del diagnóstico varía desde varios meses a más de 15 años. La causa precisa de la NMM es desconocida. Estudios histopatológicos y de electrodiagnóstico demuestran la presencia de lesión tanto desmielinizante como axonal. Los nervios motores son los más afectados, aunque también se ha demostrado leve desmielinización en los nervios sensoriales. La eficacia del tratamiento inmunomodulador e inmunosupresor apoya adicionalmente la naturaleza inmunológica de la NMM. Los títulos de anticuerpos anti-GM1 son elevados en más de la mitad de los pacientes con NMM. Aunque el papel de los anticuerpos anti-GM1 en la enfermedad es desconocido, su presencia puede ser utilizada como un marcador de diagnóstico para la NMM.

30 La administración subcutánea de la inmunoglobulina combinada con hialuronidasa a los pacientes con NMM puede mejorar los síntomas. Las dosis ilustrativas incluyen las utilizadas para la administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con NMM. Por ejemplo, a un paciente con NMM se le pueden administrar 2 g por kg de peso corporal del paciente de inmunoglobulina a lo largo de varias dosis. Por ejemplo, se puede administrar cinco dosis de 400 mg/kg PC de inmunoglobulina en cinco días consecutivos. En otro ejemplo, se puede administrar 1 g/kg PC en 2 días consecutivos. Algunos pacientes pueden recibir terapia de mantenimiento, que puede incluir, por ejemplo, dosis de 400 mg/kg PC a 2 g/kg PC, dada cada 2-6 semanas. La cantidad de inmunoglobulina administrada se puede aumentar o disminuir según sea apropiado, teniendo en cuenta la respuesta de los pacientes.

40 10. Miastenia grave

La miastenia grave (MG) es una enfermedad neuromuscular autoinmunitaria crónica caracterizada por diversos grados de debilidad de los músculos esqueléticos del cuerpo. Se asocia con la presencia de anticuerpos contra receptores de acetilcolina (AChR) o contra tirosina quinasa específica de músculo (MuSK) en la conexión neuromuscular, aunque algunos pacientes son negativos en las pruebas para esos anticuerpos. Las características clínicas de la MG incluyen debilidad fluctuante y fatiga de los músculos voluntarios, particularmente de los músculos elevador palpebral, extraocular, bulbar, de las extremidades y respiratorios. Los pacientes generalmente presentan caída unilateral o bilateral de los párpados (ptosis), visión doble (diplopía), dificultad para tragar (disfagia) y debilidad muscular proximal. La debilidad de los músculos respiratorios puede dar como resultado insuficiencia respiratoria en casos graves o en exacerbaciones agudas graves (crisis miasténica). La miastenia grave se produce en todos los grupos étnicos y de ambos sexos. Afecta con mayor frecuencia a las mujeres adultas jóvenes menores de 40 años o a los hombres mayores de 60 años, pero puede ocurrir a cualquier edad. En algunos casos, se realiza la timectomía para reducir los síntomas.

55 La inmunoglobulina se puede utilizar, por ejemplo, como terapia de mantenimiento para los pacientes con MG moderada a severa, típicamente cuando otros tratamientos han sido ineficaces o causado efectos secundarios graves, y también se pueden administrar antes de la timectomía o durante una exacerbación aguda de la enfermedad (crisis miasténica). La inmunoglobulina se puede administrar por vía subcutánea, combinada con hialuronidasa, a los pacientes con miastenia grave utilizando los métodos descritos en la presente memoria. Las dosis ilustrativas incluyen las utilizadas para la administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con MG. Por ejemplo, a un paciente con MG se le pueden administrar dosis de 400 mg/kg PC a 2 g/kg PC cada 4-6 semanas para la terapia de mantenimiento. Antes de la timectomía o durante la crisis miasténica, se pueden administrar 1-2 g/kg PC durante varias dosis, tal como, por ejemplo, cinco dosis de 400 mg/kg PC en cinco días consecutivos. En otro ejemplo, se puede administrar 1 g/kg de peso corporal en 2 días consecutivos.

11. Síndrome Moersch-Woltmann

El síndrome Moersch-Woltmann, también conocido como síndrome de la persona rígido o síndrome del hombre rígido, es un trastorno neurológico poco frecuente, con las características de una enfermedad autoinmunitaria. Los pacientes presentan síntomas relacionados con la rigidez muscular y espasmos episódicos superpuestos. La rigidez muscular se extiende implicando músculos axiales, principalmente abdominales y toracolumbares, así como los músculos proximales de las extremidades. Por lo general, la contracción simultánea de los músculos agonistas y antagonistas del tronco conduce a una apariencia de tipo tabla con hiperlordosis. Con menor frecuencia, la participación de los músculos respiratorios conduce a la dificultad para respirar y la implicación de los músculos faciales a una cara de tipo máscara. El tratamiento con inmunoglobulina puede causar disminución de la rigidez y aumentar las puntuaciones de sensibilidad en pacientes con síndrome Moersch-Woltmann (Dalakas et al. (2001) N Engl J Med 345 (26):1870-6). La inmunoglobulina se puede administrar por vía subcutánea, combinada con hialuronidasa, a los pacientes con síndrome de Moersch-Woltmann utilizando los métodos descritos en la presente memoria. Las dosis ilustrativas incluyen las utilizadas para la administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con síndrome de Moersch-Woltmann. Por ejemplo, la inmunoglobulina se puede administrar a dosis de 400 mg/kg PC durante cinco días consecutivos. Algunos pacientes pueden recibir terapia de mantenimiento, que puede incluir, por ejemplo, 1-2 g/kg PC de inmunoglobulina cada 4-6 semanas. La cantidad de inmunoglobulina administrada se puede aumentar o disminuir según sea apropiado.

12. Enfermedad de Alzheimer

El tratamiento para la enfermedad de Alzheimer incluye el tratamiento con inmunoglobulina intravenosa (véase, p.ej. Dodel et al. (2004) J Neurol Neurosurg. Psychiatry, 75:1472-4; Solomon et al (2007) Curr Opin Mol Ther, 9:79-85; Relkin et al (2008) Neurobiol Aging). IG contiene anticuerpos que se unen al beta amiloide (AB), que es un componente central de la placa en los cerebros de pacientes de Alzheimer. Por lo tanto, la IG puede ayudar a promover el aclaramiento de AB del cerebro y a bloquear los efectos tóxicos de AB en las células cerebrales. Por lo tanto, la inmunoglobulina se puede administrar por vía subcutánea, combinada con hialuronidasa, a los pacientes con enfermedad de Alzheimer utilizando los métodos descritos en la presente memoria. Los sujetos que deben ser tratados incluyen pacientes con enfermedad de Alzheimer leve, moderada o avanzada. Está dentro del conocimiento práctico de un médico a cargo del tratamiento identificar pacientes para el tratamiento. La inmunoglobulina combinada con hialuronidasa se puede administrar cada semana, cada dos semanas o una vez al mes. El tratamiento puede continuar a lo largo de meses o años. La IG se puede administrar a dosis de o entre 200 mg/kg PC a 2 g/kg PC cada semana o cada dos semanas, y generalmente de al menos 200 mg/kg a 2 g/kg PC al menos una vez al mes. El tratamiento con inmunoglobulina puede lograr un aumento en los niveles de anticuerpos anti-beta amiloide de los pacientes en comparación con los niveles antes del tratamiento.

13. Otras enfermedades y afecciones

Los datos clínicos indican que la inmunoglobulina se puede utilizar en el tratamiento de muchas afecciones. En algunos casos, la inmunoglobulina se puede utilizar como el tratamiento primario, mientras que en otros casos, se administra como terapia de segunda línea cuando las terapias convencionales han demostrado ser ineficaces, se han convertido en intolerables, o están contraindicadas. Está dentro del conocimiento práctico de un médico a cargo del tratamiento identificar tales enfermedades o afecciones. Las ilustrativas de éstas incluyen, pero no se limitan a, hipogammaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomiелitis diseminada aguda; vasculitis necrotizante sistémica positiva para ANCA; Anemia hemolítica autoinmunitaria; Penfigoide buloso; Penfigoide cicatricial; Síndrome de Evans (incluyendo Anemia hemolítica autoinmunitaria con trombocitopenia inmunitaria); Trombocitopenia aloinmunitaria feto-maternal/neonatal (FMAIT/NAIT); Enfermedad de Alzheimer, Síndrome hemofagocítico; Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas de alto riesgo; neuropatía paraproteínica de tipo IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; Síndrome opsoclonio mioclonos atáxico; Pénfigo foliáceo; Pénfigo vulgar; Púrpura post-transfusión; Necrólisis epidérmica tóxica/Síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); Síndrome de choque tóxico; Lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; septicemia; trasplante de médula ósea, tumores de células B; y trauma.

También se ha demostrado que la inmunoglobulina tiene actividad antimicrobiana frente a una serie de infecciones bacterianas, víricas y fúngicas, incluyendo, pero sin limitarse a, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Pseudomonas aeruginosa* tipos A y B, *Staphylococcus aureus*, Streptococcus del grupo B, *Streptococcus pneumoniae* tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, y 23, adenovirus de tipos 2 y 5, citomegalovirus, virus de Epstein Barr VCA, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, Virus del herpes simple tipo 1, Virus del herpes simple tipo 2, Influenza A, Sarampión, Parainfluenza tipos 1, 2 y 3, Polio, Virus de la varicela zoster, *Apergillus* y *Candida albicans*. Por lo tanto, la inmunoglobulina se puede administrar por vía subcutánea combinada con hialuronidasa a pacientes con infecciones bacterianas, víricas y fúngicas para potenciar el sistema inmunitario del paciente y tratar la enfermedad. En algunos ejemplos, también se administran antibióticos u otros agentes antimicrobianos.

I. Artículos de fabricación y kits

Las composiciones farmacéuticas de inmunoglobulina e hialuronidasa soluble, proporcionadas juntas o por separado, pueden envasarse como artículos de fabricación que contienen material de envasado, una composición farmacéutica que es eficaz para tratar una enfermedad o afección tratable con IG, y una etiqueta que indica que la composición y las combinaciones se van a utilizar para el tratamiento de una enfermedad o afección tratable con IG.

5 Los ejemplos de los artículos de fabricación son contenedores incluyendo contenedores de una sola cámara y de doble cámara. Los recipientes incluyen, pero no se limitan a, tubos, botellas y jeringas. Los recipientes pueden incluir adicionalmente una aguja para administración subcutánea.

10 Los artículos de fabricación proporcionados en la presente memoria contienen materiales de envasado. Los materiales de envasado para su uso en el envasado de productos farmacéuticos son bien conocidos para los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patente de Estados Unidos Núm. 5.323.907, 5033252 y 5.052.558. Los ejemplos de materiales de envasado farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, envases de tipo burbuja, frascos, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, contenedores, jeringas, botellas y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y modo de administración y tratamiento pretendido.

15 Se contempla una amplia gama de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionados en la presente memoria como una variedad de tratamientos para cualquier enfermedad o afección tratable con IG.

20 Las composiciones de inmunoglobulina y una hialuronidasa soluble, proporcionadas juntas o por separado, también se pueden proporcionar en forma de kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente memoria y un artículo para su administración. Por ejemplo las composiciones pueden suministrarse con un dispositivo para su administración, tal como una jeringa, un inhalador, una taza de dosificación, un cuentagotas, o un aplicador. El kit puede incluir, opcionalmente, instrucciones para la aplicación incluyendo dosificaciones, regímenes de dosificación e instrucciones para los modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente memoria y un artículo para el diagnóstico. Por ejemplo, dichos kits pueden

25 incluir un elemento para medir la concentración, cantidad o actividad de IG.

J. Ejemplos

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

Ejemplo 1.

35 **PH20 Recombinante Humana Soluble (rHuPH20) Facilita la Administración Subcutánea de Inmunoglobulina (IG) y la Biodisponibilidad**

La administración subcutánea (SC) de inmunoglobulina (IG) da como resultado la reducción de la biodisponibilidad en comparación con la administración intravenosa (IV). Un estudio informó de 63% de biodisponibilidad en comparación con la administración IV, lo que requiere la utilización de una dosis SC de 137% de la IV para lograr una biodisponibilidad equivalente, es decir el área bajo la curva de tiempo-concentración (AUC) (Ochs et al. (2006) J Clin. Immunol., 26:265-273). Por lo tanto, se realizaron experimentos para determinar si la administración subcutánea de IG (GAMMAGARD LIQUID (GGL), Baxter Biosciences) en presencia de PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20) aumentaba la biodisponibilidad de IG tras la administración SC, obviando la necesidad de aumentar las dosis. El estudio experimental se diseñó para evaluar 1) la capacidad de los sujetos para tolerar una

40 dosis mensual de GGL en un solo sitio por vía subcutánea (SC); 2) la dosis de rHuPH20 por gramo de GGL requerida para tolerar una dosis mensual de GGL con no más de reacciones adversas locales leves; 3) el tiempo requerido para la administración SC; y 3) una comparación de la biodisponibilidad medida mediante el área bajo la curva (AUC) de GGL IV frente a SC.

50 En resumen, se inscribieron en el estudio once pacientes adultos inmunodeficientes que estaban en dosis estables de gammaglobulina intravenosa (IGIV). Todos los pacientes se mantuvieron con las mismas dosis de IGIV mensuales que recibían antes del estudio. Para la administración subcutánea, los pacientes que estaban recibiendo hasta 600 mg/kg de peso corporal de GGL cada cuatro semanas IV, recibieron infusiones SC en un solo sitio que comenzando a una dosis que era $\frac{1}{4}$ de la dosis IV de 4 semanas, es decir, un 1 dosis de una semana, para

55 determinar la dosis de rHuPH20 necesaria para tolerar la dosis de 1 semana. Posteriormente, las dosis de rHuPH20 se redujeron y los pacientes recibieron 2, 3, y finalmente una dosis de cuatro semanas completa de GGL para determinar la rHuPH20 mínima requerida para tolerar una infusión mensual de GGL SC.

60 Se realizaron infusiones iniciales utilizando 150 U de rHuPH20 por gramo de GGL. La rHuPH20 se administró a través de una aguja SC de calibre 24 a una concentración de 150 U/ml o 1500 U/ml a una velocidad de 1-2 mL/min., antes de la infusión de la GGL. Si se utilizaban 1500 U/ml de rHuPH20, está diluída de la siguiente manera: a) si el volumen necesario de la solución de rHuPH20 concentrada (1500 U/mL) era de 1,5 mL o inferior, se diluía 1:10 utilizando solución salina normal para inyectable; b) si el volumen necesario de la rHuPH20 concentrada (1500 U/mL) estaba por encima de 1,5 mL pero por debajo de 15 mL, se diluía 15:1 mL con solución salina normal para

inyectable; c) si el volumen de la solución de rHuPH20 concentrada (1500 U/mL) necesaria era de 15 mL o superior, ésta se utilizó sin diluir.

5 Inmediatamente después de la infusión de rHuPH20 (y en el plazo de 5 minutos), la GGL se infundió a través de la misma aguja SC de calibre 24 partiendo de una dosis que era $\frac{1}{4}$ de la dosis de 4 semanas (es decir, dosis de 1 semana) para determinar la cantidad de rHuPH20 necesaria para proporcionar una cuarta parte de la dosis de 4 semanas en un solo sitio. Cada paciente se evaluó para determinar si la infusión era tolerada; se consideró que la infusión no era tolerada si había reacciones locales moderadas o graves que requirieran más de un sitio de administración o una incapacidad para completar la infusión en menos de 3 horas. Si se toleraba la dosis semanal de GGL, se administró media dosis (dosis de dos semanas) utilizando rHuPH20 a 100 U/g de GGL, y la dosis de rHuPH20 se redujo adicionalmente a 66 U/g de GGL, a continuación, 50 U/g de GGL. Se repitió la dosis de rHuPH20, sobre una base de GGL por gramo, con mayores cantidades de GGL hasta que se toleró una dosis de 4 semanas completa de GGL en un solo sitio. Si la cantidad de rHuPH20 no era tolerada en cualquier punto, esa dosis semanal de GGL se repitió en el siguiente intervalo y la cantidad de rHuPH20 se incrementó hasta que se toleraba la dosis. Si un sujeto no toleraba una dosis durante 2 incrementos sucesivos de dosis de rHuPH20 (es decir, 3 intentos a una dosis distinta de GGL), se determinó que la dosis previamente tolerada era la dosis máxima tolerada.

20 Los primeros 4 pacientes fueron evaluados para determinar únicamente la tolerabilidad; los últimos 7 pacientes tenían una infusión IV, seguido de un estudio farmacocinético (FC) para comparar la infusión IV con las infusiones SC posteriores. Para las infusiones SC, después de que se completó una administración de una dosis mensual de GGL, se repitió la misma dosis mensual y se realizó un estudio FC para evaluar el T1/2, Tmax, y AUC. Si AUC (SC) no estaba dentro de 90% del AUC (IV), la dosis de rHuPH20 se aumentó de 4 veces en la siguiente infusión, y se repitió la evaluación de FC.

25 Diez de los 11 pacientes alcanzaron dosis mensuales de 25,5 a 61,2 gramos de GGL (255 a 612 mL) en un solo sitio SC, a velocidades de 120 a 300 mL/hora. El undécimo paciente se retiró después de la infusión de 1 semana alegando molestias locales. Para el primer paciente (39001), las infusiones iniciales se realizaron por gravedad, sin embargo, las tasas no fueron aceptables a pesar de aumentar la dosis de rHuPH20 de 150 a 300 U/g de GGL. Por lo tanto, todas las infusiones posteriores se realizaron utilizando una bomba IV peristáltica. Los 9 pacientes restantes alcanzaron la dosis mensual de GGL sin la necesidad de repetir las dosis o aumentar la concentración de rHuPH20. Por lo tanto, los 9 pacientes en los que se realizó un intento de reducir la dosis de rHuPH20 completaron el estudio y fueron capaces de tolerar las infusiones utilizando 50 U/g de GGL. Para determinar si 50 U/g de GGL fue la rHuPH20 mínima que se podría administrar, se intentó una dosis de 25 U/g GGL en dos pacientes sin éxito: uno tuvo molestias y el otro redujo la tolerabilidad y requirió las administración en dos sitios. Por lo tanto, la cantidad mínima de rHuPH20 que permitía una administración de una dosis mensual de GGL SC fue de 50 U/g de GGL. Los resultados se resumen en la Tabla 3 a continuación. Los resultados muestran que todos menos los dos primeros pacientes se sometieron a infusión a velocidades de hasta 300 mL/h con tiempos de infusión de 1,64 h (270 mL) a 3,55 h (537 mL). La tasa de administración era limitada principalmente por el tipo de bomba utilizada. A tasas de infusión rápida saltaba con frecuencia la alarma de la bomba IV. Una infusión se ralentizó y uno fue interrumpida debido a un leve dolor de perfusión in situ. Ambas infusiones se reanudaron y se completaron.

Tabla 3: Parámetros de Infusión para Pacientes que Completan Satisfactoriamente las Infusiones SC Mensuales

Sujetos (N=10)	Número de infusiones de dosis mensual	Dosis de IgG (g) infundida (media)	Volumen (mL) de IgG infundida (media)	Conc. final de rHuPH20 (U/g)	Tasa de infusión max (ml/hr)	Tiempo (hrs) de infusión (media)
390001	1	25,5	255	305,9	175	2,13
390003	1	30,1	301	46,9	200	2,38
400001	1	44,5	445	49,8	300	3,05
340001	3	30,3	303	52,5	300	3,02
340002	4	39,9	399	50,0	300	3,20
390004	4	29,3	293	50,8	300	1,92
390005	3	27,2	272	50,6	300	1,64
390006	3	61,4	614	50,0	300	2,75

Tabla 3: Parámetros de Infusión para Pacientes que Completan Satisfactoriamente las Infusiones SC Mensuales

Sujetos (N=10)	Número de infusiones de dosis mensual	Dosis de IgG (g) infundida (media)	Volumen (mL) de IgG infundida (media)	Conc. final de rHuPH20 (U/g)	Tasa de infusión max (ml/hr)	Tiempo (hrs) de infusión (media)
400002	3	53,7	537	51,5	300	3,55
400003	3	42,1	421	48,8	300	2,29

1. Evaluación de la tolerabilidad

- 5 Los sujetos fueron evaluados para determinar su tolerabilidad a las infusiones SC. La mayoría de las infusiones se asociaron con reacciones leves relacionadas con la infusión (Tabla 4). Las reacciones leves más comunes fueron eritema, dolor, hinchazón, calor y prurito en el sitio de infusión. Las reacciones moderadas en el sitio de infusión incluyeron tres casos de dolor, y un caso de cada uno de prurito, hinchazón y calor. No se informó sobre reacciones graves. Hubo quejas de intenso ardor pasajero durante la infusión de la rHuPH20 en 10 de las infusiones, ocurriendo 10 cinco en un paciente.

Eventos adversos, independientemente de la causalidad, por períodos correspondientes a las categorías de dosis

Clase de Órgano del Sistema MeDRA	¼ dosis SC	½ dosis SC	¾ dosis SC	dosis SC completa
Trastornos del oído y del laberinto	0	0	0	1
Trastornos del ojo	0	1	0	3
Trastornos gastrointestinales	0	1	0	2
Trastornos generales y afecciones en el sitio de administración	26	15	20	29
Trastornos del sistema inmunitario	0	0	0	1
Infecciones e infestaciones	1	1	1	3
Trastornos del tejido musculoesquelético y conectivo	1	1	1	0
Trastornos del sistema nervioso	2	1	0	0
Trastornos respiratorios, torácicos e mediastinales	0	0	0	4
Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo	0	0	3	1
Total	30	20	25	44

- 15 Los eventos adversos sistémicos considerados posiblemente o probablemente relacionadas con las infusiones se enumeran en la Tabla 5. Tres fueron moderados y ninguno fue grave. Únicamente el episodio de dolor torácico leve se asoció con la interrupción de la infusión, pero la infusión se completó y las infusiones subsiguientes fueron bien toleradas. La Tabla 6 representa la proporción de infusiones subcutáneas que se completaron sin interrupción durante un evento adverso.

- 20 Un evento adverso grave, una reacción anafiláctica, se produjo en un paciente, sin relación con la terapia en estudio. El paciente, que tenía un historial de reacciones alérgicas previas a los antibióticos, recibió un antibiótico al día siguiente de su infusión con GGL/rHuPH20 y desarrolló anafilaxia posteriormente. Este paciente se recuperó por completo y fue capaz de completar con éxito el estudio.

No hubo infecciones bacterianas documentadas durante esta prueba de pacientes con PDI. Se informó sobre 9

casos de infecciones virales, considerados todos no relacionados con el estudio de terapia: 2 casos de gastroenteritis viral, 1 caso de queratitis herpética, 2 casos de sinusitis, 1 caso de conjuntivitis, y 3 casos (en un paciente) de enfermedad de tipo influenza.

Tabla 5: Eventos adversos sistémicos no graves, relacionados				
Eventos adversos en términos MEDRA	Leves	Mod	Graves	Total
Ojo seco	1	0	0	1
Sudores nocturnos	1	0	0	1
Malestar muculoesquelético	0	1	0	1
Cefalea	1	2	0	3
Letargo	1	0	0	1
Dolor de pecho	1	0	0	1
Edema periférico	1	0	0	1
Dolor	1	0	0	1
Dolor dorsolumbar	2	0	0	2
Eventos adversos relacionados totales	9	3	0	12

Tabla 6: Proporción de infusiones SC completadas sin interrupción para un efecto adverso						
Paciente	Sin interrupción	Porcentaje (%)	Interrumpido	Detenido	Porcentaje %	Infusiones totales
390001	4	80	1*	0	20	5
390002	2	100	0	0	0	2
390003	4	100	0	0	0	4
400001	4	100	0	0	0	4
340001	6	100	0	0	0	6
340002	6	86	1†	0	14	7
390004	7	100	0	0	0	7
390005	7	100.	0	0	0	7
390006	6	100.	0	0	0	6
400002	6	100.	0	0	0	6
400003	7	100.	0	0	0	7
Total	59	N/A	2	0	N/A	61

* interrumpida debido a dolor leve en el sitio de infusión
 † interrumpida debido a leve dolor transitorio de pecho

2. Evaluación farmacocinética

Se realizó el análisis farmacocinético (FC) sobre los niveles de IgG en suero. Los 7 pacientes que participaron en la fase de evaluación FC de este estudio alcanzaron dosis mensuales de 27 a 61 gramos de GGL en un solo sitio utilizando 50 U de rHuPH20 por gramo de GGL (véase la Tabla 3). El estudio FC se llevó a cabo después de recibir una segunda infusión de dosis mensual de GGL. Las muestras de suero se recogieron antes de la infusión, 1 h después de la infusión y los días 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14, 21 y 28 (si hubiera programa de 28 días) después de la infusión. Los parámetros farmacocinéticos de los 7 pacientes se representan en la Tabla 7. La razón de AUC (SC) a AUC (IV) para los 7 pacientes se muestra en la Tabla 8. Los resultados muestran que cinco de los 7 pacientes tenían AUC (SC) dentro de 90% de AUC (IV). El aumento de la dosis o rHuPH20 de cuatro veces en los 2 sujetos con una proporción inferior al 90% no mejoró adicionalmente la biodisponibilidad.

Tabla 7: Parámetros farmacocinéticos de los sujetos individuales

Pacientes	AUC (días-g/L)	T _½ (días)	T _{max} (días)	C _{min} (g/L)
34001	461,2	61,3	3,0	12,9
34002*	387,1	114,1	4,9	11,3
	356,7	43,9	4,0	11,3
39004*	256,9	113,8	5,0	7,9
	264,2	44,3	6,9	7,7
39005	369,6	59,3	3,1	10,9
39006	368,9	40,3	4,8	10,8
40002	375,2	33,7	6,8	10,6
40003	356,2	37,9	4,9	9,7
Median	368,9	43,93	4,8	10,8

* Pacientes con evaluaciones FC repetidas después de la administración de una dosis creciente de rHuPH20.

Tabla 8: Razón de AUC_(SQ) a AUC_(IV) (%)

Paciente	Concentración de rHuPH20	
	50 U/g	200 U/g
34001	101,0	N/A
34002	86,5	79,6
39004	75,8	77,8
39005	102,7	N/A
39006	94,7	N/A
40002	97,3	N/A
40003	90,5	N/A
Mean	92,6	N/A

3. Compendio de resultados

El uso de rHuPH20 mediante inyección antes de la infusión con GGL hizo posible infundir tanto como 600 mL de GGL en un sitio subcutáneo único a tasas de infusión de hasta 300 mL por hora en este estudio. La tasa estuvo limitada principalmente por las bombas IV que fueron utilizadas, que están diseñadas para que salte la alarma y se corte cuando los infiltrados IV y la presión aumente. A pesar de que el corte de la bomba no se produjo hasta que las tasas se acercaron a los 300 mL/h, la necesidad de reiniciar la bomba hizo aumentar el tiempo de infusión. Puesto que no hay necesidad de alarmas de presión para la administración subcutánea, el problema del corte debe ser eliminado por el cambio a bombas capaces de generar más presión sin que salte la alarma.

Aunque la mayoría de las infusiones se asociaron con cierta hinchazón, enrojecimiento, o ocasionalmente dolor o picazón, todos excepto unos pocos fueron leves. Dos de las seis reacciones moderadas se produjeron en infusiones en las que la rHuPH20 se redujo en un esfuerzo para encontrar la dosis eficaz mínima; la dosis rHuPH20 de 50 U/g GGL fue tolerada por 10 de los 11 sujetos. Uno de los sujetos, que no habían experimentado previamente infusiones subcutáneas, se retiró después de la primera dosis de la semana citando molestias en el lugar de la parte inferior del abdomen. Todas las demás infusiones se completaron a pesar de las reacciones leves, completándose 97% de las infusiones sin interrupción. La mayoría de las reacciones fueron tratadas con compresas de hielo y sólo unas pocas requirieron acetaminofeno o difenhidramina.

La biodisponibilidad media de GGL después de la administración por vía subcutánea combinada con rHuPH20 fue 92% de la biodisponibilidad de GGL después de la administración IV. Este estudio sugiere que el aumento de la difusión proporcionada por rHuPH20 mejoró la absorción de GGL. Adicionalmente, los niveles valle logrados por la administración subcutánea mensual de GGL en este estudio son idénticos a los logrados por la administración IV. Por lo tanto, no existe la necesidad de aumentar la frecuencia de administración de GGL mediante dosificación subcutánea frente a dosificación IV; la administración subcutánea de GGL combinada con rHuPH20 requiere únicamente un único sitio de SC y se puede lograr a tasas de infusión de hasta 300 mL/h.

En conclusión, rHuPH20 facilitó administración de una dosis mensual total de GGL en un solo sitio a velocidades de hasta 300 mL/h en un grupo de sujetos inmunodeficientes adultos. La biodisponibilidad de la combinación fue de 92% de la biodisponibilidad IV, basada en el AUC del tiempo frente a la curva de concentración de IgG. Esto sugiere que rHuPH20 mejora la absorción de GGL administrada por vía subcutánea. La mayoría de los efectos secundarios locales fueron leves y no dieron como resultado en el retraso o la interrupción de las infusiones.

Ejemplo 2. Generación de una línea celular que expresa rHuPH20 soluble

El plásmido HZ24 (expuesto en el SEQ ID NO: 52) se utilizó para transfectar ovario de hámster chino (células CHO) (véase, por ejemplo las solicitudes Núm. 10795095, 11/065.716 y 11/238.171). El vector plasmídico HZ24 para la expresión de rHuPH20 soluble contiene una cadena principal del vector pCI (Promega), que codifica los aminoácidos 1-482 del ADN de hialuronidasa PH20 humana (SEQ ID NO: 49), un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus ECMV (Clontech), y el gen de la dihidrofolato reductasa de ratón (DHFR). La cadena principal del vector pCI también incluye ADN que codifica el gen de resistencia a Beta-lactamasa (AmpR), un origen f1 de replicación, una región intensificadora/promotora del promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El ADN que codifica el constructo de rHuPH20 soluble contiene un sitio Nhel y una secuencia consenso Kozak antes del ADN que codifica la metionina en la posición del aminoácido 1 de la secuencia señal de 35 aminoácidos nativa de PH20 humana, y un codón de parada tras el ADN que codifica la tirosina correspondiente a la posición de aminoácido 482 de la hialuronidasa PH20 humana expuesta en el SEC ID NO: 1), seguido de un sitio de restricción BamHI. El constructo pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pA (HZ24), por lo tanto, da como resultados una sola especie de ARNm dirigida por el promotor de CMV que codifica los aminoácidos 1 a 482 de PH20 humana (expuesta en el SEQ ID NO: 3) y los aminoácidos 1-186 de la dihidrofolato reductasa de ratón (expuesta en el SEQ ID NO: 53), separados por el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

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

Se sedimentaron sesenta millones de células viables del cultivo de células CHO DG44 no transfectadas y se resuspendieron a una densidad de 2×10^7 células en 0,7 mL de tampón de transfección 2x (2x HeBS: Hepes 40 mM, pH 7,0, NaCl 274 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 1,4 mM, dextrosa 12 mM). A cada alícuota de células resuspendidas, se añadieron 0,09 mL (250 g) del plásmido HZ24 lineal (linealizado mediante digestión durante la noche con Cla I (New England Biolabs), y las soluciones de células/ADN se transfirieron a cubetas de electroporación BTX (Gentronics) con ranura de 0,4 cm a temperatura ambiente. Se realizó una electroporación de control negativo sin mezclar ADN plasmídico con las células. Las mezclas de células/plásmido se sometieron a electroporación con una

descarga de condensador de 330 V y 960 mF o a 350 V y 960 mF.

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

10 Dos días después de la electroporación, se retiraron de cada pocillo 0,5 mL de medio de cultivo de tejido y se sometieron a ensayo para determinar la presencia de actividad hialuronidasa, utilizando el análisis de microturbidez descrito en el Ejemplo 3.

Tabla 9: Actividad Hialuronidasa Inicial de células CHO DG44 Transfectadas con HZ24 40 horas después de la transfección

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

15 Las células de la Transfección 2 (350V) se recogieron del pocillo de cultivo de tejidos, se contaron y se diluyeron a 1×10^4 - 2×10^4 células viables por mL. Se transfirió una alícuota de 0,1 mL de la suspensión celular a cada pocillo de cinco placas de cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron 100 microlitros de medio CD-CHO (GIBCO) que contenía suplemento de GlutaMAX™-1 4 mM (Gibco™, Invitrogen Corporation) y sin suplementos de hipoxantina y timidina a los pocillos que contenían las células (volumen final de 0,2 mL).

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

Tabla 10. Actividad hialuronidasa de los clones identificados

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

25 Seis clones HZ24 se expandieron en cultivo y se transfirieron a matraces oscilantes en forma de suspensiones de células individuales. Los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2d9, 1E11 y 4D10 se sembraron en placas de cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 pocillos utilizando una estrategia de dilución infinita bidimensional en el que las células se diluyeron 1:2 hacia la parte inferior de la placa, y 1:3 a través de la placa, partiendo de 5000 células en el pocillo de la parte superior izquierda. Los clones diluidas se cultivaron en un fondo de 500 células CHO DG44 no transfectadas por pocillo, para proporcionar los factores de crecimiento necesarios para los días iniciales en cultivo. Se prepararon diez placas por subclón, con 5 placas que contenían metotrexato 50 nM y 5 placas sin metotrexato.

30

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

Ejemplo 3.

Determinación de la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble

La actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble en muestras tales como cultivos celulares, fracciones de purificación y soluciones purificadas se determinó utilizando un análisis turbidimétrico, que se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une a la albúmina sérica. La actividad se mide incubando rHuPH20 soluble con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un período determinado de tiempo (10 minutos) y a continuación precipitando el hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina de suero acidulada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un período de desarrollo de 30 minutos. La disminución de la turbidez resultante de la actividad de la enzima sobre el sustrato de hialuronato sódico es una medida de la actividad de la hialuronidasa rHuPH20 soluble. El método se realiza utilizando una curva de calibración generada con diluciones de un patrón de referencia de trabajo para análisis de rHuPH20 soluble, y se llevan a cabo mediciones de la actividad de la muestra con respecto a esta curva de calibración.

Se prepararon diluciones de la muestra en Soluciones Diluyentes de Enzimas. La Solución Diluyente de Enzimas se preparó disolviendo $33,0 \pm 0,05$ mg de gelatina hidrolizada en 25,0 mL de tampón de reacción PIPES 50 mM (NaCl 140 mM, PIPES 50 mM, pH 5,5) y 25,0 mL de SWFI, y diluyendo 0,2 mL de solución de buminato al 25% en la mezcla y agitando con Vórtex durante 30 segundos. Esto se realizó en el plazo de 2 horas de uso y se almacenó en hielo hasta que se necesitó. Las muestras se diluyeron a 1-2 U/ml estimadas. Generalmente, la dilución máxima por etapa no excedió de 1:100 y el tamaño de la muestra inicial para la primera dilución no fue menor de 20 μ L. Los volúmenes de muestra mínimos necesarios para realizar el análisis fueron: Muestras en proceso, fracciones FPLC: 80 μ L; Sobrenadantes de Cultivo de Tejidos: 1 mL; Material Concentrado 80 μ L; Material Purificado de la Etapa Final: 80 μ L. Las diluciones se realizaron por triplicado en una placa de 96 pocillos de Baja Unión a Proteína, y se transfirieron 30 μ L de cada dilución a placas de fondo negro/transparente Optilux (BD Biosciences).

Se prepararon diluciones de rHuPH20 soluble conocida con una concentración de 2,5 U/mL en Solución Diluyente de Enzimas para generar una curva patrón y se añadieron a la placa Optilux por triplicado. Las diluciones incluyeron 0 U/ml, 0,25 U/ml, 0,5 U/ml, 1,0 U/ml, 1,5 U/ml, 2,0 U/ml, y 2,5 U/mL. Se incluyeron en la placa pocillos de "Reactivo para blanco" que contenían 60 μ L de Solución Diluyente de Enzimas como control negativo. A continuación, la placa se cubrió y se calentó en un bloque de calor durante 5 minutos a 37°C. La cubierta se retiró y la placa se sacudió durante 10 segundos. Después de agitar, la placa se devolvió a la placa para el bloque de calor y el Dispositivo de Manipulación de Líquido MULTIDROP 384 se cebó con la solución de hialuronato de sodio de 0,25 mg/ml templada (preparada disolviendo 100 mg de hialuronato de sodio (Lifecore Biomedical) en 20,0 mL de SWFI. Esto se mezcló suavemente mediante rotación y/o balanceo a 2-8°C durante 2-4 horas, o hasta que se disolvió completamente). La placa de reacción se transfirió al MULTIDROP 384 y la reacción se inició pulsando la tecla de inicio para dispensar 30 μ L de hialuronato de sodio a cada pocillo. La placa se retiró del MULTIDROP 384 y se agitó durante 10 segundos antes de transferirla a un bloque de calor con la cubierta de la placa reemplazada. La placa se incubó a 37°C durante 10 minutos.

El MULTIDROP 384 se preparó para detener la reacción cebando de la máquina con Solución de Trabajo de Suero y cambiando el ajuste de volumen a 240 μ L. (25 mL de Solución de Partida de Suero [1 volumen de Suero de Caballo (Sigma) se diluyeron con 9 volúmenes de Solución Tampón de Acetato 500 mM y el pH se ajustó a 3,1 con ácido clorhídrico] en 75 mL de Solución de Tampón de Acetato 500 mM). La placa se retiró del bloque de calor y se colocó sobre el MULTIDROP 384 y se dispensaron a los pocillos 240 μ L de las Soluciones de Trabajo en suero. La placa se retiró y se sacudió en un lector de placas durante 10 segundos. Después de otros 15 minutos, se midió la turbidez de las muestras a 640 nm y se determinó la actividad de la hialuronidasa (en U/mL) de cada muestra mediante el ajuste a la curva patrón.

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

Ejemplo 4

Producción y purificación de Gen1 de sPH20 Humana

A. Procedimiento en Bioreactor de 5 L

Un vial de 3D35M se descongeló y se expandió a partir de matraces oscilantes a través de 1 L de matraces de agitación en medios CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad Calif.) con un suplemento de metotrexato 100 nM y GlutaMAX™ -1 (Invitrogen). Las células se transfirieron de los matraces de agitación a un biorreactor de 5 L (Braun) a una densidad de inoculación de 4×10^5 células viables por mL. Los parámetros fueron un valor de referencia de temperatura de 37°C, pH 7,2 (Valor nominal de partida), con un Valor nominal de Oxígeno Disuelto de 25% y una superposición de aire de 0-100 cc/min. A la 168 horas, se añadieron 250 mL de Medio de Alimentación Núm. 1 (CD CHO con 50 g/L de Glucosa). A la 216 horas, se añadieron 250 mL de Medio de Alimentación Núm. 2 (CD CHO con 50 g/L de glucosa y butirato de sodio 10 mM), y a las 264 horas se añadieron 250 mL de Medio de Alimentación Núm. 2. Este procedimiento dio como resultado una productividad final de 1600 Unidades por mL con una densidad celular máxima de 6×10^6 células/mL. La adición de butirato de sodio fue para mejorar drásticamente la producción de rHuPH20 soluble en las etapas finales de la producción.

El medio acondicionado del clon 3D35M se clarificó mediante filtración en profundidad y diafiltración de flujo tangencial en Hepes 10 mM de pH 7,0. La rHuPH20 soluble se purificó a continuación mediante cromatografía secuencial de intercambio iónico en Q Sefarosa (Pharmacia), cromatografía de interacción hidrófoba en fenil Sefarosa (Pharmacia), boronato de fenilo (Prometics) y Cromatografía con Hidroxiapatita (Biorad, Richmond, CA).

La rHuPH20 soluble se unió a Q Sefarosa y se eluyó a NaCl 400 mM en el mismo tampón. El producto eluido se diluyó con sulfato de amonio 2 M a una concentración final de sulfato de amonio 500 mM y se hizo pasar a través de una columna de Fenil Sefarosa (baja sust.), seguido de la unión en las mismas condiciones a una resina de boronato de fenilo. La rHuPH20 soluble se eluyó de la resina de fenil sefarosa en Hepes de pH 6,9 después de lavar a pH 9,0 en bicina 50 mM sin sulfato de amonio. El producto eluido se cargó en una resina de hidroxiapatita cerámica a pH 6,9 en fosfato de potasio 5 mM y CaCl_2 1 mM y se eluyó con fosfato de potasio 80 mM, pH 7,4 con CaCl_2 0,1 mM.

La rHuPH20 soluble purificada resultante poseía una actividad específica en exceso de 65.000 Unidades USP/mg de proteína por medio del análisis ensayo de microturbidez (Ejemplo 16) utilizando el patrón de referencia USP. La sPH20 purificada eluyó como un solo pico de 24 a 26 minutos de una columna de estireno-divinilbenceno Pharmacia 5RPC con un gradiente entre TFA al 0,1%/H₂O y TFA al 0,1%/acetonitrilo al 90%/H₂O 10% y se resolvió como una sola banda amplia de 61 kDa mediante electroforesis en SDS que se redujo a una banda aguda de 51 kDa tras el tratamiento con PNGASA-F. La secuenciación de aminoácidos N-terminal reveló que el péptido líder se había eliminado eficazmente.

B. Procedimiento de Expansión del Cultivo Celular Aguas Arriba a Cultivo Celular en Biorreactor de 100 L

Se utilizó un procedimiento a mayor escala para purificar por separado rHuPH20 soluble de cuatro diferentes viales de células 3D35M para producir 4 lotes separados de sHuPH20; HUA0406C, HUA0410C, HUA0415C y HUA0420C. Cada vial se expandió por separado y se cultivó mediante un biorreactor 125 L, después se purificó utilizando cromatografía en columna. Se tomaron muestras durante el procedimiento para evaluar parámetros tales como el rendimiento enzimático. La descripción del procedimiento proporcionado a continuación expone especificaciones representativas para cuestiones tales como el biorreactor de partida y los volúmenes de medios de alimentación, las densidades celulares de transferencia, y los volúmenes de elución. Los números exactos varían ligeramente con cada lote, y se detallan en las Tablas 11 a 18.

Se descongelaron 4 viales de células 3D35M en un baño de agua a 37°C, se añadieron CD CHO que contenía metotrexato 100 nM y 40 mL/L GlutaMAX y las células se centrifugaron. Las células se resuspendieron en un matraz de agitación de 125 mL con 20 mL de medio de nueva aportación y se colocaron en un incubador a 37°C, 7% de CO₂. Las células se expandieron hasta 40 mL en el matraz oscilante de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanzó de 1,5 a $2,5 \times 10^6$ células/ml, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 125 en un volumen de cultivo de 100 mL. El matraz se incubó a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó de 1,5 a $2,5 \times 10^6$ células/ml, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 250 mL en 200 mL de volumen de cultivo, y el matraz se incubó a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó de 1,5 a $2,5 \times 10^6$ células/ml, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 1 L en 800 mL de volumen de cultivo y se incubaron a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó de 1,5 a $2,5 \times 10^6$ células/ml, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 6 L en un volumen de cultivo 5 L y se incubó a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó de 1,5 a $2,5 \times 10^6$ células/ml, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 36 L en un volumen de cultivo 20 L y se incubó a 37°C, 7% de CO₂.

Un reactor de 125 L se esterilizó con vapor de agua a 121°C, 1,38 bares y se añadieron 65 L de medio de CD CHO. Antes de su uso, se comprobó la contaminación del reactor. Cuando la densidad celular en los matraces de agitación de 36 L alcanzó $1,8-2,5 \times 10^5$ células/ml, se transfirieron 20 L de cultivo celular de los matraces de agitación de 36 L al biorreactor (Braun) de 125 L, dando como resultado un volumen final de 85 L y una densidad de siembra de aproximadamente 4×10^5 células/mL. Los parámetros fueron un valor de referencia de temperatura, 37°C; pH: 7,2; Oxígeno disuelto: 25% \pm 10%; Velocidad del impulsor 50 rpm; Presión del recipiente 0,21 bares;

- Pulverización de aire 1 L/min.; Superposición de aire: 1 L/min. Se tomaron muestras del reactor diariamente para determinar los recuentos de células, la verificación de pH, los análisis de los medios, la producción de proteínas y la retención. Se introdujeron alimentaciones de nutrientes durante la ronda. El día 6, se añadieron 3,4 L de Medio de Alimentación Núm. 1 (CD CHO + 50 g/L de glucosa + 40 mL/L GlutaMAX™-1), y la temperatura de cultivo se cambió a 36,5°C. El día 9, se añadieron 3,5 L de Medio de Alimentación Núm. 2 (CD CHO + 50 g/L de glucosa + 40 mL/L de GlutaMAX™-1 + 1,1 g/L de butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambió a 36°C. El día 11, se añadieron 3,7 L de Medio de Alimentación Núm. 3 (CD CHO + 50 g/L de glucosa + 40 mL/L de GlutaMAX™-1 + 1,1 g/L de butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambió a 35,5°C. El reactor fue cosechado a los 14 días o cuando la viabilidad de las células se redujo por debajo de 50%. El procedimiento dio como resultado la producción de rHuPH20 soluble con una actividad enzimática de 1600 unidades/ml con una densidad celular máxima de 8 millones de células/mL. En la cosecha, se tomaron muestras del cultivo para determinar los micoplasmas, la carga biológica, las endotoxinas, y los virus *in vitro* e *in vivo*, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las partículas virales, y la actividad enzimática.
- La cosecha del cultivo celular del biorreactor de cien litros se filtró a través de una serie de filtros de cápsula desechables que tenían un medio de polietersulfona (Sartorius): primero a través de una cápsula de 8,0 µm de profundidad, una cápsula de 0,65 µm de profundidad, una cápsula de 0,22 µm, y finalmente a través de un filtro de 2000 cm² Sartopore de 0,22 µm y en una bolsa de almacenamiento estéril de 100 L. El cultivo se concentró 10 veces utilizando dos filtros TFF de MWCO a 30 kDa de polietersulfona espirales (Millipore), seguido de cambio de tampón 6 veces con HEPES 10 mM, Na₂SO₄ 25 mM, pH 7,0 en un filtro final de 0,22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. La Tabla 11 proporciona los datos de seguimiento relacionados con las etapas de cultivo celular, recolección, concentración e cambio de tampón.

Tabla de datos 11. Datos de seguimiento para las etapas de cultivo celular, recolección, concentración y cambio de tampón.

Parámetro	HUA0406C	HUA04010C	HUA0415C	HUA0420C
Tiempo desde descongelación para inocular un biorreactor de 100 L (días)	21	19	17	18
Densidad de inoculación de 100 L (×10 ⁶ células/mL)	0,45	0,33	0,44	0,46
Tiempo de duplicación del crecimiento logarítmico (hr)	29,8	27,3	29,2	23,5
Densidad Max. de células (x10 ⁶ células/mL)	5,65	8,70	6,07	9,70
Viabilidad de la recolección (%)	41	48	41	41
Título de la recolección (U/mL)	1964	1670	991	1319
Tiempo en el biorreactor de 100 L (días)	13	13	12	13
Volumen de recolección aclarada (mL)	81800	93300	91800	89100
Análisis enzimático de la recolección aclarada (U/mL)	2385	1768	1039	1425
Análisis enzimático del producto concentrado (U/mL)	22954	17091	8561	17785
Análisis enzimático del producto concentrado con cambio de tampón (U/mL)	15829	11649	9915	8679
Análisis enzimático del producto concentrado con cambio de tampón filtrado (U/mL)	21550	10882	9471	8527
Volumen de producto concentrado con cambio de tampón (mL)	10699	13578	12727	20500
Razón de concentración de unidades enzimáticas/recolección	0,87	0,96	1,32	1,4

- Se preparó una columna de intercambio iónico Q Sefarosa (Pharmacia) (3 L de resina de, Altura = 20 cm, Diámetro = 14 cm). Se recogieron muestras del lavado para una determinación del pH, la conductividad y el análisis de endotoxinas (LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5. La recolección, concentrada sometida a diafiltración se cargó en la columna Q a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 y HEPES 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. La proteína se eluyó con Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0 y se filtró a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril.
- A continuación se realizó la cromatografía de interacción hidrófoba en Fenil-Sefarosa (Pharmacia). Se preparó una columna de Fenil-Sefarosa (PS) (9,1 L de resina de, altura = 29 cm, Diámetro = 20 cm). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, CaCl₂ 0,1 mM, de pH 7,0. Al producto

5 eluido de la proteína anterior se le añadió un suplemento de soluciones de partida de sulfato de amonio 2 M, fosfato de potasio 1 M y CaCl_2 1 M a concentraciones finales de 5 mM, 0,5 M y 0,1 mM, respectivamente. La proteína se cargó en la columna PS a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se añadieron fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl_2 0,1 mM a pH 7,0 a 100 cm/hr. El flujo continuo se pasó a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril.

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

15 Una columna de hidroxiapatita (HAP) (BioRad) (1,6 L de resina, Altura = 10 cm, Diámetro = 14 cm) se equilibró con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 0,1 mM a pH 7,0. Se recogieron muestras de lavado y se sometieron a ensayo para determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (ensayo LAL). A la proteína purificada con boronato de aminofenilo se le añadió un suplemento de fosfato de potasio y CaCl_2 para producir concentraciones finales de fosfato de potasio 5 mM y CaCl_2 0,1 mM y se cargó en la columna de HAP a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM de pH 7,0, NaCl 100 mM, CaCl_2 0,1 mM, a continuación, fosfato de potasio 10 mM de pH 7,0, NaCl 100 mM, CaCl_2 0,1 mM pH. La proteína se eluyó con fosfato de potasio 70 mM de pH 7,0 y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm a una bolsa de almacenamiento de estéril 5 L. El producto eluido se sometió a ensayo para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

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

Las Tablas 12 a 18 proporcionan datos de seguimiento relacionados con cada una de las etapas de purificación descritas anteriormente, para cada lote de células 3D35M.

45 **Tabla 12. Datos de columna de sefarosa Q**

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de carga (mL)	10647	13524	12852	20418
Razón de Volumen de Carga/Volumen de Resina	3,1	4,9	4,5	7,3
Volumen de la Columna (mL)	2770	3840	2850	2880
Volumen del Producto Eluido (mL)	6108	5923	5759	6284
Conc. de Proteína del Producto Eluido (mg/mL)	2,8	3,05	2,80	2,86
Análisis Enzimático del Producto Eluido (U/mL)	24493	26683	18321	21052
Rendimiento Enzimático (%)	65	107	87	76

Tabla 13. Datos de la Columna de Fenil Sefarosa

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen Antes de la Adición de la Solución de Partida (mL)	5670	5015	5694	6251

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de Carga (mL)	7599	6693	7631	8360
Volumen de la Columna (mL)	9106	9420	9340	9420
Razón Volumen de Carga/Volumen de Resina	0,8	0,71	0,82	0,89
Volumen de Producto Eluido (mL)	16144	18010	16960	17328
Conc. de Proteína del Producto Eluido (mg/mL)	0,4	0,33	0,33	0,38
Análisis Enzimático del Producto Eluido (U/mL)	8806	6585	4472	7509
Rendimiento de proteína (%)	41	40	36	37
Rendimiento Enzimático (%)	102	88	82	96

Tabla 14. Datos de la Columna de Boronato de Aminofenilo

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de Carga (mL)	16136	17958	16931	17884
Razón Volumen de carga/Volumen de Resina	2,99	3,15	3,08	2,98
Volumen de la Columna (mL)	5400	5700	5500	5300
Volumen de Producto Eluido (mL)	17595	22084	20686	19145
Conc. de Proteína del Producto Eluido (mg/mL)	0,0	0,03	0,03	0,04
Conc. de Proteína del Producto Eluido Filtrado (mg/mL)	no sometido a ensayo	0,03	0,00	0,04
Análisis Enzimático del Producto Eluido (U/mL)	4050	2410	1523	4721
Rendimiento de proteína (%)	0	11	11	12
Rendimiento Enzimático (%)	no determinado	41	40	69

Tabla 15. Datos de la columna de hidroxapatita

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen Antes de la Adición de la Solución de Partida (mL)	16345	20799	20640	19103
Razón Volumen de Carga/Volumen de Resina	10,95	13,58	14,19	12,81
Volumen de la Columna (mL)	1500	1540	1462	1500
Volumen de carga (mL)	16429	20917	20746	19213
Volumen del Producto Eluido (mL)	4100	2415	1936	2419
Conc. de Proteína del Producto Eluido (mg/mL)	No sometido a ensayo	0,24	0,17	0,23
Conc. de Proteína del Producto Eluido Filtrado (mg/mL)	N/A	N/A	0,17	N/A
Análisis enzimático del Producto Eluido (U/mL)	14051	29089	20424	29826
Rendimiento de proteína (%)	No sometido a ensayo	93	53	73
Rendimiento Enzimático (%)	87	118	140	104

5

Tabla 16. Datos de filtración con DV20

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de Inicio (mL)	4077	2233	1917	2419
Volumen Filtrado (mL)	4602	3334	2963	3504
Conc. de Proteína del Producto Filtrado (mg/mL)	0,1	N/A	0,09	N/A

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Conc. de Proteína del Producto Eluido Filtrado (mg/mL)	N/A	0,15	0,09	0,16
Rendimiento de Proteína (%)	No sometido a ensayo	93	82	101

Tabla 17. Datos de concentración final

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

Tabla 18. Cambio de tampón en datos de la Formulación Final

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de Inicio (mL)	562	407	237	316
Volumen Final de Producto Concentrado sometido a Cambio de Tampón (mL)	594	516	310	554
Conc. de Proteína del Producto Concentrado (mg/mL)	1.00	0.97	0.98	1.00
Conc. de proteína del Producto Concentrado Filtrado (mg/mL)	0.95	0.92	0.95	1.02
Rendimiento de proteína (%)	118	99	110	101

5 La proteína rHuPH20 soluble purificada y concentrada se cargó asepticamente en viales estériles con 5 mL y 1 mL de volúmenes de carga. La proteína se pasó a través de un filtro de 0,22 µm a una bomba controlada por operador que se utilizó para cargar los viales utilizando una lectura gravimétrica. Los viales se cerraron con tapones y se aseguraron con tapas rizadas. Los viales cerrados se inspeccionaron visualmente para determinar las partículas extrañas y a continuación se etiquetaron. Después del etiquetado, los viales se congelaron rápidamente mediante inmersión en nitrógeno líquido durante no más de 1 minuto y se almacenaron a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ ($-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$).

Ejemplo 5

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

La línea celular Gen1 3D35M descrita en el Ejemplo 2 se adaptó a niveles de metotrexato más altos para producir la generación de 2 clones (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 M. Las células se adaptaron a un nivel más alto de metotrexato mediante cultivo y pasándolas 9 veces durante un período de 46 días en un incubador humidificado a 37°C, 7% de CO₂. La población amplificada de células se clonó mediante dilución limitante en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos que contenían medio con metotrexato 2,0 M. Después de aproximadamente 4 semanas, se identificaron los clones y el clon 3E10B se seleccionó para la expansión. Las células 3E10B se cultivaron en medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 2,0 M durante 20 pases. Se creó un banco de células maestro (MCB) de la línea celular 3E10B y se congelado y se utilizó para estudios posteriores.

30 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 pase 12º, las células se congelaron en viales como 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, a continuación, 20,0 µM 18 días más tarde. Las células del 8º pase en medio que contenía metotrexato 20,0 µM se clonaron mediante dilución limitante en placas de cultivo de tejidos 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 más tarde y el clon 2B2 se seleccionó para la expansión en medio que contenía metotrexato 20,0 µM. Tras el pase 11º, las células 2B2 se congelaron en viales como banco de células de investigación (RCB).

Los células 2B2 resultantes son células CHO DG44 carentes de dihidrofolato reductasa (dhfr-) que expresan PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20). La PH20 soluble está presente en las células 2B2 a un número de copias

de aproximadamente 206 copias/célula. El análisis de transferencia Southern del ADN genómico de las células 2B2 digerido con Spe I, Xba I y BamH I/Hind III utilizando una sonda específica de rHuPH20 reveló el siguiente perfil de digestión mediante enzimas 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 se observó una banda de hibridación única de ~1,4 kb utilizando ADN 2B2 digerido con BamH I/Hind III. El análisis de secuencia del transcrito de ARNm indicó que el ADNc derivado (SEQ ID NO: 56) era idéntico al de la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 49) excepto por un par de bases de diferencia en la posición 1131, que se observó que era una timidina (T) en lugar de la citosina (C) esperada. Esta es una mutación silenciosa, sin ningún efecto sobre la secuencia de aminoácidos.

Ejemplo 6A.

Producción de rHuPH20 soluble de Gen2 en cultivo celular en biorreactor de 300 L

Un vial de HZ24-2B2 se descongeló y se expandió a partir de matraces de agitación a través de matraces de agitación de 36L en medios CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) con suplemento de metotrexato 20 μ M y GlutaMAX-1™ (Invitrogen). En resumen, 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 de nueva aportación y se colocaron en un incubador a 37°C, 7% de CO₂. Las células se expandieron hasta 40 mL en el matraz de agitación de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/ml, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 125 mL en un volumen de cultivo de 100 mL. El matraz se incubó a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/ml, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 250 mL en 200 mL de volumen de cultivo, y el matraz se incubó a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/ml, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 1 L en 800 mL de volumen de cultivo y se incubó a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/ml el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 6 L en 5000 mL de volumen de cultivo y se incubó a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/ml el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 36 L en 32 L de volumen de cultivo y se incubó a 37°C, 7% de CO₂.

Un reactor de 400 L se esterilizó y se añadieron 230 mL de medio de CD-CHO. Antes del uso, se verificó la contaminación del reactor. Se transfirieron aproximadamente 30 L de células de los matraces de agitación de 36L 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 260L. Los parámetros fueron un valor de referencia de temperatura, 37°C; Velocidad del Impulsor 40-55 RPM; Presión del Recipiente: 0,21 bares; Burbujeo de Aire 0,5-1,5 L/min.; Superposición de Aire: 3 L/min.. Se tomaron muestras del reactor diariamente para los recuentos de células, la verificación del pH, el análisis de los medios, la producción de proteínas y la retención. Asimismo, durante la ronda se añadieron las alimentaciones de nutrientes. A las 120 horas (día 5), se añadieron 10,4 L de Medio de Alimentación Núm. 1 (4 x CD-CHO + 33 g/L de glucosa + 160 mL/L de Glutamax-1™ + 83 mL/L de Yeastolato + 33 mg/L rHuInsulin). A las 168 horas (día 7), se añadieron 10,8 L de la Alimentación Núm. 2 (2 x CD-CHO + 33 g/L de Glucosa + 80 mL/L de Glutamax-1™ + 167 mL/L de Yeastolato + 0,92 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura de cultivo se cambió a 36,5°C. A las 216 horas (día 9), se añadieron 10,8 L de la Alimentación Núm. 3 (1 x CD-CHO + 50 g/L de glucosa + 50 mL/L de Glutamax-1™ + 250 mL/L de Yeastolato + 1,80 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura de cultivo se cambió a 36°C. A las 264 horas (día 11), se añadieron 10,8 L de la Alimentación Núm. 4 (1 x CD-CHO + 33 g/L de Glucosa + 33 mL/L Glutamax-1™ + 250 mL/L de Yeastolato + 0,92 g/L de Butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambió a 35,5°C. Se observó que la adición de los medios de alimentación mejoraban drásticamente la producción de rHuPH20 soluble en las etapas finales de producción. El reactor fue cosechado a los 14 o 15 días o cuando la viabilidad de las células se redujo por debajo de 40%. El procedimiento dio como resultado una productividad final del 17.000 Unidades por mL con una densidad celular máxima de 12 millones de células/mL. En la cosecha, se tomaron muestras del cultivo para determinar los micoplasmas, la carga biológica, las endotoxinas y la carga viral *in vitro* e *in vivo*, la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y la actividad enzimática.

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

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

5

B. Purificación de rHuPH20 soluble de Gen2

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

10

15

A continuación se realizó la cromatografía de interacción hidrófoba en Fenil-Sefarosa (Pharmacia). Se preparó una columna de Fenil-Sefarosa (PS) (19-21 L de resina, H = 29 cm, D = 30 cm). Se recogió el producto lavado y se tomaron muestras para determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (ensayo LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. Al producto eluido de proteína de la columna de Q Sefarosa se le añadió un suplemento de soluciones de partida sulfato de amonio 2 M, fosfato de potasio 1 M y CaCl₂ 1 M para producir concentraciones finales 5 mM, 0,5 M y 0,1 mM, respectivamente. La proteína se cargó en la columna de PS a una velocidad de flujo de 100 cm/h y se recogió el flujo directo de la columna. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl₂ 0,1 mM a pH 7,0 a 100 cm/hr y se añadió el producto lavado para el flujo directo recogido. Combinado con el lavado de la columna, el flujo directo se pasó por un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril. Se tomaron muestras del flujo directo para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

20

25

Se preparó una columna boronato de aminofenilo (Promtics). Se recogió el producto lavado y se tomaron muestras para determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (análisis LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. El flujo directo de PS que contenía la proteína purificada se cargó en la columna de boronato de aminofenilo a una velocidad de flujo de 100 cm/h. La columna se lavó con fosfato de potasio 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 de sodio 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 sometió a ensayo para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

30

35

Se preparada la columna de hidroxiapatita (HAP) (Biorad). Se recogió el producto lavado y se sometió a ensayo para determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (análisis LAL). La columna se equilibró con 5 mM de fosfato de potasio, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. A la proteína purificada en boronato de aminofenilo se le añadió un suplemento a concentraciones finales de fosfato de potasio 5 mM y CaCl₂ 0,1 mM y se cargó en la columna de HAP a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM. La columna se lavó a continuación con fosfato de potasio 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM. La proteína se eluyó con fosfato de potasio 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 sometió a ensayo para determinar la carga biológica, concentración de proteína y la actividad enzimática.

40

45

A continuación, la proteína HAP purificado se pasó a través de un filtro de eliminación de virus. El filtro Viroart esterilizado (Sartorius) se preparó en primer lugar lavando con 2 L de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0. Antes de su uso, se tomaron muestras del tampón filtrado para determinar el pH y la conductividad. La proteína HAP purificada se bombeó vía bomba peristáltica a través del filtro de eliminación de virus 20 nM. La proteína filtrada en fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 se pasó a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril. La muestra filtrada de virus se sometió a ensayo para determinar los perfiles de concentración de proteínas, actividad enzimática, oligosacáridos, monosacáridos y ácido siálico. La muestra se sometió a ensayo también para determinar las impurezas relacionadas con el procedimiento.

50

55

A continuación, la proteína en el producto filtrado se concentró a 10 mg/ml utilizando un sistema de filtración de flujo tangencial de peso molecular de corte (MWCO) a 10 kD Sartocoon Slice (TFF) (Sartorius). El filtro se preparó en primer lugar lavando con histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0 y se tomaron muestras del producto permeado para determinar el pH y la conductividad. Después de la concentración, se tomaron muestras de la proteína concentrada y se sometieron a ensayo para determinar la concentración de proteína y la actividad enzimática. Se realizó un cambio de tampón seis veces en la proteína concentrada en el tampón final: histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0. Tras el cambio de tampón, la proteína concentrada se pasó a través de un filtro de 0,22 µm a una bolsa de

60

almacenamiento estéril de 20 L. Se tomaron muestras de proteína y se sometió a ensayo para determinar los perfiles de concentración de proteínas, actividad enzimática, grupos sulfhidrilo libres, oligosacáridos y la osmolaridad.

5 A continuación se dispensaron asépticamente 20 mL de la proteína en masa filtrada en condiciones estériles a viales de 30 mL de Teflón estéril (Nalgene). Los viales se congelaron rápidamente y se almacenaron a $20 \pm 5^\circ\text{C}$.

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

10 La producción y purificación de rHuPH20 soluble de Gen2 en un cultivo celular en biorreactor de 300L contenían algunos cambios en los protocolos en comparación con la producción y purificación rHuPH20 soluble de Gen1 en un cultivo celular en biorreactor 100L (que se describe en el ejemplo 4.B). La Tabla 19 expone diferencias ilustrativas, además de simples cambios de aumento de escala, entre los métodos.

Tabla 19		
Diferencia de procedimiento	rHuPH20 Soluble de Gen1	rHuPH20 soluble de Gen2
Línea celular	3D35M	2B2
Medios utilizados para expandir inóculo celular	Contiene metotrexato 0,10 μM (0,045 mg/L)	Contiene metotrexato 20 μM (9 mg/L)
Medios en cultivos de 6L en curso	Contiene metotrexato 0,10 μM	No contiene metotrexato
Matraz de agitación de 36 L	sin instrumentación volumen de operación 20 L.	Equipado con la instrumentación que supervisa y controla el pH, oxígeno disuelto, burbujeo y la velocidad de flujo de gas de superposición. volumen operativo de 32 L
Volumen final de operación en biorreactor	Aprox. 100 L en un biorreactor de 125 L (volumen de cultivo inicial + 65 L)	Aprox. 300L en un biorreactor de 400L (volumen de cultivo inicial + 260L)
Medio de cultivo en el biorreactor final	sin rHuInsulina	5,0 mg/L rHuInsulina
Volumen de alimentación de medios	Aumento a escala en 4% del volumen del cultivo celular del biorreactor es decir, 3,4, 3,5 y 3,7 L, lo que da como resultado un volumen diana del biorreactor de ~92 L.	Aumento a escalado en 4% del volumen del cultivo celular del biorreactor es decir, 10,4, 10,8, 11,2 y 11,7 L, lo que da como resultado un volumen diana del biorreactor de ~303L.
Alimentación de medios	Medio de Alimentación Núm. 1: CD CHO + 50 g/L de Glucosa + GlutaMAX™-1 8 mM Alimentación Núm. 2 (CD CHO + 50 g/L de Glucosa + GlutaMAX 8 mM + 1,1 g/L de butirato de sodio Alimentación Núm. 3: CD CHO + 50 g/L de Glucosa + GlutaMAX 8 mM + 1,1 g/L de Butirato de Sodio	Medio de Alimentación Núm. 1: 4x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + Glutamax 32 mM + 16,6 g/L de Yeastolato + 33 mg/L rHuInsulina Alimentación Núm. 2: 2x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + Glutamax 16 mM + 33,4 g/L de Yeastolato + 0,92 g/L butirato de sodio Alimentación Núm. 3: 1 x CD CHO + 50 g/L de Glucosa + Glutamax 10 mM + 50 g/L
		Yeastolato + 1,80 g/L de Butirato de Sodio Alimentación Núm. 4: 1 x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + Glutamax 6,6 mM + 50 g/L de Yeastolato + 0,92 g/L de Butirato de Sodio

Tabla 19		
Diferencia de procedimiento	rHuPH20 Soluble de Gen1	rHuPH20 soluble de Gen2
Filtración del cultivo celular del biorreactor	Cuatro filtros de polietersulfona (8,0 µm, 0,65 µm, 0,22 µm y 0,22 µm) en serie bolsa de almacenamiento 100 L	1ª etapa - Cuatro módulos en paralelo, cada uno con una capa de tierra de diatomeas graduada a 4-8 micras y una capa de tierra de diatomeas graduada de 1,4 a 1,1 µm, seguidas de una membrana de celulosa. 2ª etapa - etapa única que contiene una capa de tierra de diatomeas graduada de 0,4 a 0,11 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a <0,1 µm, seguidas de una membrana de celulosa. 3ª etapa - filtro de 0,22 µm de polietersulfona bolsa de almacenamiento de 300L El cultivo celular cosechado se complementa con EDTA 10 mM, Tris 10 mM a un pH de 7,5.
Concentración y cambio de tampón antes de la cromatografía	Concentrado con 2 TFF con Filtro Millipore de polietersulfona espiral de MWCO a 30K Cambio de tampón del Producto concentrado 6 veces con Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0 bolsa de almacenamiento estéril de 20L	Concentrado utilizando cuatro filtros Sartorius Sartoslice TFF de MWCO a 30K Intercambio de tampón 10x concentrado con Tris 10 mM, Na ₂ SO ₄ 20 mM, pH 7,5 bolsa de almacenamiento estéril de 50L
Inactivación viral antes de la cromatografía	Ninguna	Inactivación viral realizada con la adición de de Triton X-100 al 1%, tributilo al 0,3%
		Fosfato, pH 7,5,
1ª etapa de purificación (Q Sefarosa)	No hay lectura de absorbancia	Mediciones de A280 al principio y al final
Filtración viral después de la cromatografía	Filtro Pall DV-20 (20 nm)	Filtro Sartorius Virosart (20 nm)
Concentración y cambio de tampón después de la cromatografía	Tampón Hepes/solución salina pH 7,0 La proteína se concentró hasta 1 mg/ml	Tampón Histidina/solución salina, pH 6,0 La proteína se concentró hasta 10 mg/ml

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

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Baxter Healthcare, S.A.
Baxter International, Inc.
Halozyme, Inc.
10 Schiff, Richard
Leibl, Heinz
Frost, Gregory

<120> Combinaciones y Métodos para Administración Subcutánea de Inmunoglobulina e Hialuronidasa

15 <130> 0119374-00095/3058PC

<140> Todavía sin asignar
<141> Anexa

ES 2 633 295 T3

<150> US 61/069.841
 <151> 2008-03-17

<160> 56

5 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 509

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 humana precursora

15 <400> 1

```

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


ES 2 633 295 T3

```

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

```

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

<220>
 <223> rHuPH20 soluble precursor

10 <400> 3

```

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

```

ES 2 633 295 T3

```

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

```

<210> 4

<211> 447

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 1-447 soluble

10

<400> 4

ES 2 633 295 T3

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

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

<220>
10 <223> rHuPH20 1-446 soluble

<400> 5

ES 2 633 295 T3

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

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

<220>
10 <223> rHuPH20 1-445 soluble

<400> 6

ES 2 633 295 T3

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

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

10 <220>
 <223> rHuPH20 1-444 soluble

<400> 7

ES 2 633 295 T3

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

5 <210> 8
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> rHuPH20 1-443 soluble

<400> 8

ES 2 633 295 T3

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

5 <210> 9
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> rHuPH20 1-442 soluble

<400> 9

ES 2 633 295 T3

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

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

5 <210> 10
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

10 <220>
 <223> hialuronidasa

<400> 10

ES 2 633 295 T3

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

5 <210> 11
<211> 553
<212> PRT
<213> Bos taurus

10 <220>
<223> PH20

<400> 11

ES 2 633 295 T3

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

ES 2 633 295 T3

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

<210> 12
 <211> 331
 5 <212> PRT
 <213> *Vespula vulgaris*

<220>
 <223> hialuronidasa A

10 <400> 12

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

ES 2 633 295 T3

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

<210> 13
 <211> 340
 5 <212> PRT
 <213> Vespula vulgaris

<220>
 <223> hialuronidasa B

10 <400> 13

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

ES 2 633 295 T3

Thr Glu Trp Gly Tyr His Gly Tyr Pro His Cys Leu Ser Gly Ser Thr
 180 185 190
 Asp Lys Pro Ser Phe Asp Cys Asp Ala Leu Ser Met Ser Glu Asn Asp
 195 200 205
 Lys Met Ser Trp Leu Phe Asn Asn Gln Asn Val Leu Leu Pro Ser Ile
 210 215 220
 Tyr Leu Lys Asn Val Leu Lys Pro Asp Glu Lys Ile His Leu Val Gln
 225 230 235 240
 Glu Arg Leu Lys Glu Ala Ile Arg Ile Ser Lys Asn Phe Lys His Leu
 245 250 255
 Pro Lys Val Leu Pro Tyr Trp Trp Tyr Thr Tyr Gln Asp Lys Glu Ser
 260 265 270
 Ile Phe Leu Thr Glu Ala Asp Val Lys Asn Thr Phe Lys Glu Ile Leu
 275 280 285
 Thr Asn Gly Ala Asp Gly Ile Ile Ile Trp Gly Val Ser Tyr Glu Leu
 290 295 300
 Thr Asp Arg Lys Arg Cys Glu Lys Leu Lys Glu Tyr Leu Met Lys Ile
 305 310 315 320
 Leu Gly Pro Ile Ala Phe Lys Val Thr Lys Ala Val Lys Glu Asn Thr
 325 330 335
 Pro Leu Asn Phe
 340

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

5

<220>
 <223> hialuronidasa

10

<400> 14

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

ES 2 633 295 T3

Asn Asp Lys Met Ser Trp Leu Phe Glu Ser Glu Asp Val Leu Leu Pro
 245 250 255
 Ser Val Tyr Leu Arg Trp Asn Leu Thr Ser Gly Glu Arg Val Gly Leu
 260 265 270
 Val Gly Gly Arg Val Lys Glu Ala Leu Arg Ile Ala Arg Gln Met Thr
 275 280 285
 Thr Ser Arg Lys Lys Val Leu Pro Tyr Tyr Trp Tyr Lys Tyr Gln Asp
 290 295 300
 Arg Arg Asp Thr Asp Leu Ser Arg Ala Asp Leu Glu Ala Thr Leu Arg
 305 310 315 320
 Lys Ile Thr Asp Leu Gly Ala Asp Gly Phe Ile Ile Trp Gly Ser Ser
 325 330 335
 Asp Asp Ile Asn Thr Lys Ala Lys Cys Leu Gln Phe Arg Glu Tyr Leu
 340 345 350
 Asn Asn Glu Leu Gly Pro Ala Val Lys Arg Ile Ala Leu Asn Asn Asn
 355 360 365
 Ala Asn Asp Arg Leu Thr Val Asp Val Ser Val Asp Gln Val
 370 375 380

<210> 15
 <211> 331
 5 <212> PRT
 <213> Dolichovespula maculata

<220>
 <223> hialuronidasa

10 <400> 15

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

ES 2 633 295 T3

Leu Thr Glu Thr Asp Val Lys Lys Thr Phe Gln Glu Ile Ala Ile Asn
 275 280 285
 Gly Gly Asp Gly Ile Ile Ile Trp Gly Ser Ser Ser Asp Val Asn Ser
 290 295 300
 Leu Ser Lys Cys Lys Arg Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Thr Val Leu Gly
 305 310 315 320
 Pro Ile Thr Val Asn Val Thr Glu Thr Val Asn
 325 330

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

<220>
 <223> hialuronidasa

10 <400> 16

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

Val Asn Val Thr Glu Thr Val Asn Gly Arg Ser Ser Leu Asn Phe
 355 360 365

15 <210> 17
 <211> 462
 <212> PRT

ES 2 633 295 T3

<213> Mus musculus

<220>

<223> hialuronidasa

5

<400> 17

```

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

Pro Ser Tyr Pro Glu Ala Leu Leu Thr Leu Asn Pro Ala Ser Phe Ser
 405          410          415
Ile Glu Leu Thr His Asp Gly Arg Pro Pro Ser Leu Lys Gly Thr Leu
 420          425          430
Ser Leu Lys Asp Arg Ala Gln Met Ala Met Lys Phe Arg Cys Arg Cys
 435          440          445
Tyr Arg Gly Trp Arg Gly Lys Trp Cys Asp Lys Arg Gly Met
 450          455          460

```

10

<210> 18

<211> 473

ES 2 633 295 T3

<212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> Hialuronidasa 2

5

<400> 18

```

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

Pro Tyr Ile Val Asn Val Ser Trp Ala Thr Gln Tyr Cys Ser Trp Thr
 355     360     365
Gln Cys His Gly His Gly Arg Cys Val Arg Arg Asn Pro Ser Ala Asn
 370     375     380
Thr Phe Leu His Leu Asn Ala Ser Ser Phe Arg Leu Val Pro Gly His
 385     390     395     400
Thr Pro Ser Glu Pro Gln Leu Arg Pro Glu Gly Gln Leu Ser Glu Ala
 405     410     415
Asp Leu Asn Tyr Leu Gln Lys His Phe Arg Cys Gln Cys Tyr Leu Gly
 420     425     430
Trp Gly Gly Glu Gln Cys Gln Arg Asn Tyr Lys Gly Ala Ala Gly Asn
 435     440     445
Ala Ser Arg Ala Trp Ala Gly Ser His Leu Thr Ser Leu Leu Gly Leu
 450     455     460
Val Ala Val Ala Leu Thr Trp Thr Leu
 465     470
    
```

10

ES 2 633 295 T3

<210> 19
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<220>
 <223> hialuronidasa 3

10 <400> 19

```

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

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

15

<210> 20
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

ES 2 633 295 T3

<220>
<223> hialuronidasa

5 <400> 20

```

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

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

```

10

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

15

ES 2 633 295 T3

<220>

<223> hialuronidasa 3

<400> 21

5

```

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

Gln Ala Phe Val Arg Tyr Arg Leu Glu Glu Ala Phe Arg Val Ala Leu
 260     265
Val Gly His Pro His Pro Leu Pro Val Leu Ala Tyr Ala Arg Leu Thr
 275     280     285
His Arg Asn Ser Gly Arg Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Gln Thr
 290     295     300
Ile Gly Val Ser Ala Ala Leu Gly Ala Ser Gly Val Val Leu Trp Gly
 305     310     315     320
Asp Leu Ser Phe Ser Ser Ser Glu Glu Glu Cys Trp His Leu Arg Gly
 325     330     335
Tyr Leu Val Gly Thr Leu Gly Pro Tyr Val Ile Asn Val Thr Arg Ala
 340     345     350
Ala Met Ala Cys Ser His Gln Arg Cys His Gly His Gly Arg Cys Ala
 355     360     365
Trp Gln Asp Pro Gly Gln Leu Lys Val Phe Leu His Leu His Pro Gly
 370     375     380
Gly Ser Pro Gly Ala Trp Glu Ser Phe Ser Cys Arg Cys Tyr Trp Gly
 385     390     395     400
Trp Ala Gly Pro Thr Cys Gln Glu Pro Arg Pro Glu Leu Gly Pro Glu
 405     410     415
Glu Ala Thr

```

10

<210> 22

<211> 449

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

15

<220>

<223> hialuronidasa 1

<400> 22

ES 2 633 295 T3

```

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

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

```

5 <210> 23
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

10 <220>
 <223> hialuronidasa 2

<400> 23

ES 2 633 295 T3

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

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

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

10 <220>
<223> hialuronidasa 3

ES 2 633 295 T3

<400> 24

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

5

10

15

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

<220>
 <223> PH20

<400> 25

ES 2 633 295 T3

Met	Gly	Val	Leu	Lys	Phe	Lys	His	Ile	Phe	Phe	Gly	Ser	Ala	Val	Glu
1				5					10					15	
Leu	Ser	Gly	Val	Phe	Gln	Ile	Val	Phe	Ile	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Cys
			20					25					30		
Cys	Leu	Thr	Ala	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn	Val	Pro
		35					40					45			
Phe	Leu	Trp	Ala	Trp	Asn	Ala	Pro	Thr	Glu	Phe	Cys	Leu	Gly	Lys	Ser
	50					55					60				
Gly	Glu	Pro	Leu	Asp	Met	Ser	Leu	Phe	Ser	Leu	Phe	Gly	Ser	Pro	Arg
65					70					75					80
Lys	Asn	Lys	Thr	Gly	Gln	Gly	Ile	Thr	Ile	Phe	Tyr	Val	Asp	Arg	Leu
				85					90					95	
Gly	Tyr	Tyr	Pro	Tyr	Ile	Asp	Pro	His	Thr	Gly	Ala	Ile	Val	His	Gly
			100					105					110		
Arg	Ile	Pro	Gln	Leu	Gly	Pro	Leu	Gln	Gln	His	Leu	Thr	Lys	Leu	Arg
		115					120						125		

ES 2 633 295 T3

Gln Glu Ile Leu Tyr Tyr Met Pro Lys Asp Asn Val Gly Leu Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Leu Pro Thr Trp Leu Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Ile Tyr Arg Ile Lys Ser Ile Glu Leu Val Lys Ser Gln His
 165 170 175
 Pro Gln Tyr Asn His Ser Tyr Ala Thr Glu Lys Ala Lys Arg Asp Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Met Glu Glu Thr Leu Lys Leu Gly Arg
 195 200 205
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Asp Lys Pro Asn Leu Tyr Lys Gly Ser Cys Phe
 225 230 235 240
 Asp Ile Glu Lys Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Lys Glu
 245 250 255
 Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Thr Ser Arg Ala Arg Ser
 260 265 270
 Ala Thr Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Val Val Arg Asn Arg Val His Glu
 275 280 285
 Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile Pro Asp Asp Lys Ser Pro Leu Pro Asn
 290 295 300
 Phe Val Tyr Thr Arg Leu Val Phe Thr Asp Gln Ile Phe Gln Phe Leu
 305 310 315 320
 Ser His His Asp Leu Val Tyr Thr Ile Gly Glu Ile Val Ala Leu Gly
 325 330 335
 Ala Ser Gly Ile Val Val Trp Gly Ser Gln Ser Leu Ala Arg Ser Met
 340 345 350
 Lys Ser Cys Leu His Leu Asp Asn Tyr Met Lys Thr Ile Leu Asn Pro
 355 360 365
 Tyr Leu Ile Asn Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Asn Gln Val Leu
 370 375 380
 Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys Thr Arg Lys Asn Trp Asn Pro Asn Asp
 385 390 395 400
 Tyr Leu His Leu Asn Pro Gly Asn Phe Ala Ile Gln Leu Gly Ser Asn
 405 410 415
 Gly Thr Tyr Lys Val Asp Gly Lys Pro Thr Leu Thr Asp Leu Glu Gln
 420 425 430
 Phe Ser Lys Asn Phe Gln Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Leu Asn Cys Lys
 435 440 445
 Glu Arg Thr Asp Met Asn Asn Val Arg Thr Val Asn Val Cys Ala Val
 450 455 460
 Glu Asn Val Cys Ile Asp Thr Asn Val Gly Pro Gln Ala Val Thr Tyr
 465 470 475 480
 Ala Pro Lys Glu Lys Lys Asp Val Ala His Ile Leu Ser Asn Thr Thr
 485 490 495
 Ser Ile Asn Ser Ser Thr Thr Met Ser Leu Pro Phe Pro Arg Lys His
 500 505 510
 Val Ser Gly Cys Leu Leu Val Leu Cys Met Tyr Ser Gln Tyr Leu Asn
 515 520 525
 Ile Cys Tyr Arg Leu Val Ala Ile Gly Ile Gln His Gly Tyr Tyr Leu
 530 535 540
 Lys
 545

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

5

<220>
 <223> hialuronidasa 2

10

<400> 26

ES 2 633 295 T3

Met Trp Thr Gly Leu Gly Pro Ala Val Thr Leu Ala Leu Val Leu Val
1 5 10 15
Val Ala Trp Ala Thr Glu Leu Lys Pro Thr Ala Pro Pro Ile Phe Thr
20 25 30
Gly Arg Pro Phe Val Val Ala Trp Asp Val Pro Thr Gln Asp Cys Gly
35 40 45
Pro Arg His Lys Met Pro Leu Asp Pro Lys Asp Met Lys Ala Phe Asp
50 55 60
Val Gln Ala Ser Pro Asn Glu Gly Phe Val Asn Gln Asn Ile Thr Ile
65 70 75 80
Phe Tyr Arg Asp Arg Leu Gly Met Tyr Pro His Phe Asn Ser Val Gly
85 90 95
Arg Ser Val His Gly Gly Val Pro Gln Asn Gly Ser Leu Trp Val His
100 105 110
Leu Glu Met Leu Lys Gly His Val Glu His Tyr Ile Arg Thr Gln Glu
115 120 125
Pro Ala Gly Leu Ala Val Ile Asp Trp Glu Asp Trp Arg Pro Val Trp
130 135 140
Val Arg Asn Trp Gln Asp Lys Asp Val Tyr Arg Arg Leu Ser Arg Gln
145 150 155 160
Leu Val Ala Ser His His Pro Asp Trp Pro Pro Glu Arg Ile Val Lys
165 170 175
Glu Ala Gln Tyr Glu Phe Glu Phe Ala Ala Arg Gln Phe Met Leu Glu
180 185 190
Thr Leu Arg Phe Val Lys Ala Phe Arg Pro Arg His Leu Trp Gly Phe
195 200 205
Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His Asp Tyr Val Gln Asn Trp Glu
210 215 220
Thr Tyr Thr Gly Arg Cys Pro Asp Val Glu Val Ser Arg Asn Asp Gln
225 230 235 240
Leu Ser Trp Leu Trp Ala Glu Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr
245 250 255
Leu Glu Glu Thr Leu Ala Ser Ser Thr His Gly Arg Asn Phe Val Ser
260 265 270
Phe Arg Val Gln Glu Ala Leu Arg Val Ala Asp Val His His Ala Asn
275 280 285
His Ala Leu Pro Val Tyr Val Phe Thr Arg Pro Thr Tyr Ser Arg Gly
290 295 300
Leu Thr Gly Leu Ser Glu Met Asp Leu Ile Ser Thr Ile Gly Glu Ser
305 310 315 320
Ala Ala Leu Gly Ala Ala Gly Val Ile Leu Trp Gly Asp Ala Gly Phe
325 330 335
Thr Thr Ser Asn Glu Thr Cys Arg Arg Leu Lys Asp Tyr Leu Thr Arg
340 345 350
Ser Leu Val Pro Tyr Val Val Asn Val Ser Trp Ala Ala Gln Tyr Cys
355 360 365
Ser Trp Ala Gln Cys His Gly His Gly Arg Cys Val Arg Arg Asp Pro
370 375 380
Asn Ala His Thr Phe Leu His Leu Ser Ala Ser Ser Phe Arg Leu Val
385 390 395 400
Pro Ser His Ala Pro Asp Glu Pro Arg Leu Arg Pro Glu Gly Glu Leu
405 410 415
Ser Trp Ala Asp Arg Asn His Leu Gln Thr His Phe Arg Cys Gln Cys
420 425 430
Tyr Leu Gly Trp Gly Gly Glu Gln Cys Gln Trp Asp Arg Arg Arg Ala
435 440 445
Ala Gly Gly Ala Ser Gly Ala Trp Ala Gly Ser His Leu Thr Gly Leu
450 455 460
Leu Ala Val Ala Val Leu Ala Phe Thr Trp Thr Ser
465 470 475

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

<220>
<223> Secuencia parcial de PH20

10

ES 2 633 295 T3

<400> 27

```

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

- 5 <210> 28
- <211> 414
- <212> PRT
- <213> Pongo pygmaeus

- 10 <220>
- <223> hialuronidasa 3

<400> 28

```

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

15

ES 2 633 295 T3

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

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

<220>
 <223> PH20

10 <400> 29

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

ES 2 633 295 T3

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

<210> 30
 <211> 529
 5 <212> PRT
 <213> Cavia porcellus

<220>
 <223> PH20

10 <400> 30

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

ES 2 633 295 T3

Leu Pro Gln Leu Met Asn Leu Gln Gln His Leu Arg Lys Ser Arg Gln
 115 120 125
 Asp Ile Leu Phe Tyr Met Pro Thr Asp Ser Val Gly Leu Ala Val Ile
 130 135 140
 Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Thr Arg Asn Trp Arg Pro Lys
 145 150 155 160
 Asp Ile Tyr Arg Asn Lys Ser Ile Glu Leu Val Lys Ser Gln His Pro
 165 170 175
 Gln Tyr Asn His Ser Tyr Ala Val Ala Val Ala Lys Arg Asp Phe Glu
 180 185 190
 Arg Thr Gly Lys Ala Phe Met Leu Glu Thr Leu Lys Leu Gly Lys Ser
 195 200 205
 Leu Arg Pro Ser Ser Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr
 210 215 220
 Asn Thr His Phe Thr Lys Pro Asn Tyr Asp Gly His Cys Pro Pro Ile
 225 230 235 240
 Glu Leu Gln Arg Asn Asn Asp Leu Gln Trp Leu Trp Asn Asp Ser Thr
 245 250 255
 Ala Leu Tyr Pro Ser Val Tyr Leu Thr Ser Arg Val Arg Ser Ser Gln
 260 265 270
 Asn Gly Ala Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val His Glu Ser Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Leu Met Asp Asp Lys Asn Pro Leu Pro Ile Tyr Val Tyr Ile
 290 295 300
 Arg Leu Val Phe Thr Asp Gln Thr Thr Thr Phe Leu Glu Leu Asp Asp
 305 310 315 320
 Leu Val His Ser Val Gly Glu Ile Val Pro Leu Gly Val Ser Gly Ile
 325 330 335
 Ile Ile Trp Gly Ser Leu Ser Leu Thr Arg Ser Leu Val Ser Cys Ile
 340 345 350
 Gly Leu Glu Asn Tyr Met Lys Gly Thr Leu Leu Pro Tyr Leu Ile Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Gly Gln Val Leu Cys Lys Asn Gln
 370 375 380
 Gly Ile Cys Thr Arg Lys Asp Trp Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Ala Thr Asn Phe Asp Ile Glu Leu Gln Gln Asn Gly Lys Phe Val
 405 410 415
 Val His Gly Lys Pro Ser Leu Glu Asp Leu Gln Glu Phe Ser Lys Asn
 420 425 430
 Phe His Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Val Ala Cys Lys Asp Arg Leu Asp
 435 440 445
 Val His Asn Val Arg Ser Val Asn Val Cys Thr Ala Asn Asn Ile Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Val Leu Asn Phe Pro Ser Leu Asp Asp Asp Glu Pro
 465 470 475 480
 Pro Ile Thr Asp Asp Thr Ser Gln Asn Gln Asp Ser Ile Ser Asp Ile
 485 490 495
 Thr Ser Ser Ala Pro Pro Ser Ser His Ile Leu Pro Lys Asp Leu Ser
 500 505 510
 Trp Cys Leu Phe Leu Leu Ser Ile Phe Ser Gln His Trp Lys Tyr Leu
 515 520 525
 Leu

<210> 31
 <211> 512
 5 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <223> PH20

10 <400> 31

ES 2 633 295 T3

```

Met Gly Glu Leu Gln Phe Lys Trp Leu Phe Trp Arg Ser Phe Ala Glu
 1      5      10      15
Ser Gly Gly Thr Phe Gln Thr Val Leu Ile Phe Leu Phe Ile Pro Tyr
 20      25      30
Ser Leu Thr Val Asp Tyr Arg Ala Thr Pro Val Leu Ser Asp Thr Thr
 35      40      45
Phe Val Trp Val Trp Asn Val Pro Thr Glu Ala Cys Val Glu Asn Val
 50      55      60
Thr Glu Pro Ile Asp Leu Ser Phe Phe Ser Leu Ile Gly Ser Pro Arg
 65      70      75      80
Lys Thr Ala Ile Gly Gln Pro Val Thr Leu Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85      90      95
Gly Asn Tyr Pro His Ile Asp Ala Gln Gln Thr Glu His His Gly Gly
 100     105     110
Ile Pro Gln Lys Gly Asp Leu Thr Thr His Leu Val Lys Ala Lys Glu
 115     120     125
Asp Val Glu Arg Tyr Ile Pro Thr Asp Lys Leu Gly Leu Ala Ile Ile
 130     135     140
Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Met Arg Asn Trp Thr Pro Lys
 145     150     155     160
Asp Ile Tyr Arg Asn Lys Ser Ile Glu Leu Val Gln Ala Ala Asp Pro
 165     170     175
Ala Ile Asn Ile Thr Glu Ala Thr Val Arg Ala Lys Ala Gln Phe Glu
 180     185     190
Gly Ala Ala Lys Glu Phe Met Glu Gly Thr Leu Lys Leu Gly Lys His
 195     200     205
Ile Arg Pro Lys His Leu Trp Gly Phe Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr
 210     215     220
Asn Asn Lys Phe Gln Val Asp Asn Tyr Asp Gly Gln Cys Pro Asp Val
 225     230     235     240
Glu Lys Lys Arg Asn Asp Asp Leu Asp Trp Leu Trp Lys Glu Ser Thr
 245     250     255
Gly Leu Tyr Pro Ser Val Tyr Leu Lys Lys Asp Leu Lys Ser Ser Arg
 260     265     270
Lys Ala Thr Leu Tyr Val Arg Tyr Arg Val Leu Glu Ser Ile Arg Val
 275     280     285
Ser Lys Val Ser Asp Glu Ser Asn Pro Val Pro Ile Phe Val Tyr Ile
 290     295     300
Arg Leu Val Phe Thr Asp His Val Ser Glu Tyr Leu Leu Glu Asp Asp
 305     310     315     320
Leu Val Asn Thr Ile Gly Glu Ile Val Ala Gln Gly Thr Ser Gly Ile
 325     330     335
Ile Ile Trp Asp Ala Met Ser Leu Ala Gln Arg Ser Ala Gly Cys Pro
 340     345     350
Ile Leu Arg Gln Tyr Met Lys Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile Val Asn
 355     360     365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Thr Leu Cys Lys Glu Lys
 370     375     380
Gly Met Cys Ser Arg Lys Thr Glu Ser Ser Asp Ala Tyr Leu His Leu
 385     390     395     400
Asp Pro Ser Ser Phe Ser Ile Asn Val Thr Glu Ala Gly Lys Tyr Glu
 405     410     415
Val Leu Gly Lys Pro Glu Val Lys Asp Leu Glu Tyr Phe Ser Glu His
 420     425     430
Phe Lys Cys Ser Cys Phe Ser Lys Met Thr Cys Glu Glu Thr Ser Asp
 435     440     445
Met Arg Ser Ile Gln Asp Val Asn Val Cys Met Gly Asp Asn Val Cys
 450     455     460
Ile Lys Ala Thr Leu Gly Pro Asn Ser Ala Phe His Leu Leu Pro Gly
 465     470     475     480
Lys Gly Leu Leu Leu Met Thr Thr Leu Ala His Ile Leu His His Leu
 485     490     495
Pro His Asp Ile Phe Val Phe Pro Trp Lys Met Leu Val Ser Thr Pro
 500     505     510

```

- 5 <210> 32
- <211> 512
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

ES 2 633 295 T3

<220>

<223> PH20

<400> 32

5

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

ES 2 633 295 T3

```

385              390              395              400
Asn Pro Ser His Phe Asp Ile Met Leu Thr Glu Thr Gly Lys Tyr Glu
              405              410              415
Val Leu Gly Asn Pro Arg Val Gly Asp Leu Glu Tyr Phe Ser Glu His
              420              425              430
Phe Lys Cys Ser Cys Phe Ser Arg Met Thr Cys Lys Glu Thr Ser Asp
              435              440              445
Val Lys Asn Val Gln Asp Val Asn Val Cys Val Gly Asp Asn Val Cys
              450              455              460
Ile Lys Ala Lys Val Glu Pro Asn Pro Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly
465              470              475              480
Lys Ser Leu Leu Phe Met Thr Thr Leu Gly His Val Leu Tyr His Leu
              485              490              495
Pro Gln Asp Ile Phe Val Phe Pro Arg Lys Thr Leu Val Ser Thr Pro
              500              505              510

```

<210> 33
 <211> 807
 5 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<220>
 <223> hialuronidasa

10 <400> 33

```

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

```


ES 2 633 295 T3

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 34

5

```

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

```

<210> 35

<211> 1628

10

<212> PRT

<213> Clostridium perfringens

<220>

<223> hialuronidasa

15

<400> 35

ES 2 633 295 T3

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

ES 2 633 295 T3

Asp Pro Ser Lys Ile Asp Gly Ile Val Leu Asn Pro Met Gln Gln Ala
 435 440 445
 Glu Ala Asn Lys Ser Ala Leu Phe Ala Ile Ala Asp Tyr Ala Trp Asn
 450 455 460
 Ile Trp Asp Asn Lys Glu Glu Ala Asp Glu Asn Trp Asn Asp Ser Phe
 465 470 475 480
 Lys Tyr Met Asp His Gly Thr Ala Glu Glu Thr Asn Ser Ser Leu Ala
 485 490 495
 Leu Arg Glu Ile Ser Lys His Met Ile Asn Gln Asn Met Asp Gly Arg
 500 505 510
 Val Arg Pro Leu Gln Glu Ser Val Glu Leu Ala Pro Lys Leu Glu Ala
 515 520 525
 Phe Lys Gln Lys Tyr Asp Ser Gly Ala Ser Ile Lys Glu Asp Ala Leu
 530 535 540
 Glu Leu Ile Ala Glu Phe Thr Asn Leu Gln Lys Ala Ala Asp Tyr Tyr
 545 550 555 560
 Lys Asn Asn Pro Gly Asn Glu Arg Thr Arg Asp Gln Ile Ile Tyr Trp
 565 570 575
 Leu Asn Cys Trp Glu Asp Thr Met Asp Ala Ala Ile Gly Tyr Leu Lys
 580 585 590
 Ser Ala Ile Ala Ile Glu Glu Gly Asp Asp Glu Ala Ala Trp Ala Asn
 595 600 605
 Tyr Ser Glu Ala Gln Gly Ala Phe Glu Lys Ser Lys Thr Tyr Gly Phe
 610 615 620
 His Tyr Val Asp His Thr Glu Tyr Ala Glu Val Gly Val Gln His Ile
 625 630 635 640
 Val Pro Phe Ile Lys Ser Met Gly Gln Asn Leu Ser Val Val Ile Gly
 645 650 655
 Ser Ile Val Asp Pro Asn Arg Ile Ile Ala Thr Tyr Ile Ser Asn Arg
 660 665 670
 Gln Asp Ala Pro Thr Gly Asn Pro Asp Asn Ile Phe Asp Asn Asn Ala
 675 680 685
 Ser Thr Glu Leu Val Tyr Lys Asn Pro Asn Arg Ile Asp Val Gly Thr
 690 695 700
 Tyr Val Gly Val Lys Tyr Ser Asn Pro Ile Thr Leu Asn Asn Val Glu
 705 710 715 720
 Phe Leu Met Gly Ala Asn Ser Asn Pro Asn Asp Thr Met Gln Lys Ala
 725 730 735
 Lys Ile Gln Tyr Thr Val Asp Gly Arg Glu Trp Ile Asp Leu Glu Glu
 740 745 750
 Gly Val Glu Tyr Thr Met Pro Gly Ala Ile Lys Val Glu Asn Leu Asp
 755 760 765
 Leu Lys Val Arg Gly Val Arg Leu Ile Ala Thr Glu Ala Arg Glu Asn
 770 775 780
 Thr Trp Leu Gly Val Arg Asp Ile Asn Val Asn Lys Lys Glu Asp Ser
 785 790 795 800
 Asn Ser Gly Val Glu Phe Asn Pro Ser Leu Ile Arg Ser Glu Ser Trp
 805 810 815
 Gln Val Tyr Glu Gly Asn Glu Ala Asn Leu Leu Asp Gly Asp Asp Asn
 820 825 830
 Thr Gly Val Trp Tyr Lys Thr Leu Asn Gly Asp Thr Ser Leu Ala Gly
 835 840 845
 Glu Phe Ile Gly Leu Asp Leu Gly Lys Glu Ile Lys Leu Asp Gly Ile
 850 855 860
 Arg Phe Val Ile Gly Lys Asn Gly Gly Gly Ser Ser Asp Lys Trp Asn
 865 870 875 880
 Lys Phe Lys Leu Glu Tyr Ser Leu Asp Asn Glu Ser Trp Thr Thr Ile
 885 890 895
 Lys Glu Tyr Asp Lys Thr Gly Ala Pro Ala Gly Lys Asp Val Ile Glu
 900 905 910
 Glu Ser Phe Glu Thr Pro Ile Ser Ala Lys Tyr Ile Arg Leu Thr Asn
 915 920 925
 Met Glu Asn Ile Asn Lys Trp Leu Thr Phe Ser Glu Phe Ala Ile Ile

ES 2 633 295 T3

930	935	940
Ser Asp Glu Leu Glu Asn Ala Gly Asn Lys Glu Asn Val Tyr Thr Asn		
945	950	955
Thr Glu Leu Asp Leu Ser Leu Ala Lys Glu Asp Val Thr Lys Leu		960
	965	970
Ile Pro Thr Asp Asp Ile Ser Leu Asn His Gly Glu Tyr Ile Gly Val		975
	980	985
Lys Leu Asn Arg Ile Lys Asp Leu Ser Asn Ile Asn Leu Glu Ile Ser		990
	995	1000
Asn Asp Thr Gly Leu Lys Leu Gln Ser Ser Met Asn Gly Val Glu Trp		1005
	1010	1015
Thr Glu Ile Thr Asp Lys Asn Thr Leu Glu Asp Gly Arg Tyr Val Arg		1020
1025	1030	1035
Leu Ile Asn Thr Ser Asn Glu Ala Val Asn Phe Asn Leu Thr Lys Phe		1040
	1045	1050
Glu Val Asn Ser Asn Glu Val Tyr Glu Pro Ser Leu Val Asp Ala Tyr		1055
	1060	1065
Val Gly Asp Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Asp Gly Asp Leu Lys Thr		1070
	1075	1080
Arg Val Lys Phe Leu Gly Ala Pro Ser Thr Gly Asp Thr Ile Val Tyr		1085
	1090	1095
Asp Leu Gly Gln Glu Ile Leu Val Asp Asn Leu Lys Tyr Val Val Leu		1100
1105	1110	1115
Asp Thr Glu Val Asp His Val Arg Asp Gly Lys Ile Gln Leu Ser Leu		1120
	1125	1130
Asp Gly Glu Thr Trp Thr Asp Ala Ile Thr Ile Gly Asp Gly Val Glu		1135
	1140	1145
Asn Gly Val Asp Asp Met Phe Ser Thr Pro Leu Lys Asn Gly Tyr Lys		1150
	1155	1160
His Gly Asn Gln Ser Gly Gly Ile Val Pro Ile Asp Ser Ala Tyr Val		1165
	1170	1175
Glu Gly Asp Asn Leu Asn Gln Lys Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Phe		1180
1185	1190	1195
Thr Ala Pro Tyr Arg His Arg Trp Thr Val Ile Asn Glu Leu Met Ile		1200
	1205	1210
Asn Asn Gly Glu Tyr Ile Ser Thr Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ile Ser		1215
	1220	1225
Asn Pro Ile Glu Glu Arg Gly Phe Ala Pro Ser Asn Leu Arg Asp Gly		1230
	1235	1240
Asn Leu Thr Thr Ser Tyr Lys Pro Asn Thr Asn Asn Gly Glu Ile Ser		1245
	1250	1255
Glu Gly Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Ser Glu Lys Thr Asp Val Arg Lys		1260
1265	1270	1275
Val Thr Ile Val Gln Ser Gly Ser Ser Ile Ser Asn Ala Lys Val Met		1280
	1285	1290
Ala Arg Val Gly Asp Gly Ser Glu Asn Val Thr Asp Gln Trp Val Gln		1295
	1300	1305
Leu Gly Thr Leu Ser Asn Ser Leu Asn Glu Phe Ile Asn Arg Asp Tyr		1310
	1315	1320
Asn Asn Ile Tyr Glu Ile Lys Ile Glu Trp Thr Asp Val Ala Pro Asn		1325
	1330	1335
Ile Tyr Glu Ile Ile Thr Leu Asn Gln Glu Phe Glu Phe Pro Val Asn		1340
1345	1350	1355
Asp Ser Leu Lys Ala Lys Tyr Asp Glu Leu Ile Asn Leu Ser Gly Asp		1360
	1365	1370
Glu Tyr Thr Leu Ser Ser Phe Glu Thr Leu Lys Glu Ala Leu Asn Glu		1375
	1380	1385
Ala Lys Ser Ile Leu Asp Asp Ser Asn Ser Ser Gln Lys Lys Ile Asp		1390
	1395	1400
Lys Ala Leu Glu Lys Leu Asn Lys Ala Glu Glu Arg Leu Asp Leu Arg		1405
	1410	1415
Ala Thr Asp Phe Glu Asp Phe Asn Lys Val Leu Thr Leu Gly Asn Ser		1420
1425	1430	1435
		1440

ES 2 633 295 T3

Leu Val Glu Glu Glu Tyr Thr Ala Glu Ser Trp Ala Leu Phe Ser Glu
 1445 1450 1455
 Val Leu Glu Ala Ala Asn Glu Ala Asn Lys Asn Lys Ala Asp Tyr Thr
 1460 1465 1470
 Gln Asp Gln Ile Asn Gln Ile Val Ile Asp Leu Asp Ala Ser Ile Lys
 1475 1480 1485
 Ala Leu Val Lys Glu Thr Pro Glu Val Asp Lys Thr Asn Leu Gly Glu
 1490 1495 1500
 Leu Ile Asn Gln Gly Lys Ser Leu Leu Asp Glu Ser Val Glu Gly Phe
 1505 1510 1515 1520
 Asn Val Gly Glu Tyr His Lys Gly Ala Lys Asp Gly Leu Thr Val Glu
 1525 1530 1535
 Ile Asn Lys Ala Glu Glu Val Phe Asn Lys Glu Asp Ala Thr Glu Glu
 1540 1545 1550
 Glu Ile Asn Leu Ala Lys Glu Ser Leu Glu Gly Ala Ile Ala Arg Phe
 1555 1560 1565
 Asn Ser Leu Leu Ile Glu Glu Ser Thr Gly Asp Phe Asn Gly Asn Gly
 1570 1575 1580
 Lys Ile Asp Ile Gly Asp Leu Ala Met Val Ser Lys Asn Ile Gly Ser
 1585 1590 1595 1600
 Thr Thr Asn Thr Ser Leu Asp Leu Asn Lys Asp Gly Ser Ile Asp Glu
 1605 1610 1615
 Tyr Glu Ile Ser Phe Ile Asn His Arg Ile Leu Asn
 1620 1625

<210> 36
 <211> 435
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Hialuronidasa-1 [Precursor]

10 <400> 36

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

ES 2 633 295 T3

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

<210> 37
 <211> 473
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Hialuronidasa-2 [Precursor]

10 <400> 37

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

ES 2 633 295 T3

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

<210> 38
 <211> 417
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Hialuronidasa-3 [Precursor]

10 <400> 38

Met Thr Thr Gln Leu Gly Pro Ala Leu Val Leu Gly Val Ala Leu Cys
 1 5 10 15
 Leu Gly Cys Gly Gln Pro Leu Pro Gln Val Pro Glu Arg Pro Phe Ser
 20 25 30
 Val Leu Trp Asn Val Pro Ser Ala His Cys Glu Ala Arg Phe Gly Val
 35 40 45
 His Leu Pro Leu Asn Ala Leu Gly Ile Ile Ala Asn Arg Gly Gln His
 50 55 60
 Phe His Gly Gln Asn Met Thr Ile Phe Tyr Lys Asn Gln Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Pro Tyr Phe Gly Pro Arg Gly Thr Ala His Asn Gly Gly Ile Pro
 85 90 95
 Gln Ala Leu Pro Leu Asp Arg His Leu Ala Leu Ala Ala Tyr Gln Ile
 100 105 110
 His His Ser Leu Arg Pro Gly Phe Ala Gly Pro Ala Val Leu Asp Trp
 115 120 125

ES 2 633 295 T3

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

<210> 39
 <211> 481
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Hialuronidasa-4

10 <400> 39

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

ES 2 633 295 T3

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

<210> 40
 <211> 467
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> sHuPH20 precursor 1-467

10 <400> 40

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

ES 2 633 295 T3

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

<210> 41
 <211> 477
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> precursor 1-477 de sHuPH20

10 <400> 41

ES 2 633 295 T3

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

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

5 <210> 42
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> precursor de 1-478sHuPH20

<400> 42

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
 100 105 110
 Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270
 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 290 295 300
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320
 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335
 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 340 345 350
 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
 465 470 475

5

<210> 43
 <211> 479
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<220>

<223> precursor 1-479 sHuPH20

5 <400> 43

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1      5      10      15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
      20      25      30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
      35      40      45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50      55      60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65      70      75      80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
      85      90      95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
      100      105      110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
      115      120      125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
      130      135      140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
      145      150      155      160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
      165      170      175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
      180      185      190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
      195      200      205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
      210      215      220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
      225      230      235      240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
      245      250      255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
      260      265      270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
      275      280      285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
      290      295      300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
      305      310      315      320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
      325      330      335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
      340      345      350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
      355      360      365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
      370      375      380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
      385      390      395      400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
      405      410      415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
      420      425      430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
      435      440      445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
      450      455      460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln
      465      470      475

```

10

<210> 44

ES 2 633 295 T3

<211> 480
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <223> precursor 1-480 de sHuPH20

<400> 44

```

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

10

ES 2 633 295 T3

```

                245                250                255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
                260                265                270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
                275                280                285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
                290                295                300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                310                315
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325                330                335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
                340                345                350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
                355                360                365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
                370                375                380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                390                395
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                410                415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
                420                425                430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
                435                440                445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
                450                455                460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                470                475                480

```

<210> 45
 <211> 481
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> precursor 1-481 de sHuPH20

10 <400> 45

```

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

```

ES 2 633 295 T3

Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270
 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 290 295 300
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320
 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335
 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 340 345 350
 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480
 Phe

<210> 46
 <211> 483
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> precursor 1-483 de sHuPH20

10 <400> 46

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

ES 2 633 295 T3

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

<210> 47
 <211> 432
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> sHuPH20 madura 36-467

10 <400> 47

ES 2 633 295 T3

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

<210> 48
<211> 448
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
10 <223> sHuPH20 madura 36-483

<400> 48

ES 2 633 295 T3

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

<210> 49
 <211> 1446
 5 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> ADN que codifica el "precursor" de rHuPH20 soluble

10 <400> 49

ES 2 633 295 T3

```

atgggagtgct taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatggtgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgcccgaag tgaattttgt 180
cttgaaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccga 240
ataaacgccca cgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaagc taagaaagac attacatctt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaaaca gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcaactataag aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tgggttggtg atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagctt cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgaagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactggtgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgtt 1140
tgcaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatcttct gaaaaatctt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctggtgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctac
    
```

<210> 50
 <211> 509
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> variante P48A de PH20

10 <400> 50

```

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

ES 2 633 295 T3

Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270
 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 290 295 300
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320
 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335
 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 340 345 350
 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480
 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
 485 490 495
 Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
 500 505

<210> 51
 <211> 509
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> variante L499W de PH20 precursora

10 <400> 51

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

ES 2 633 295 T3

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

<210> 52
 <211> 6630
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> vector HZ24

10 <400> 52

ES 2 633 295 T3

tcaatattgg	ccattagcca	tattattcat	tggttatata	gcataaatca	atattggcta	60
ttggccattg	catacgttgt	atctatatca	taatatgtac	atztatattg	gctcatgtcc	120
aatatgaccg	ccatgttggc	attgattatt	gactagtat	taatagtaat	caattacggg	180
gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	240
gcctggctga	ccgccaacg	acccccgcc	attgacgtca	ataatgacgt	atgttcccat	300
agtaacgcca	atagggactt	tccattgacg	tcaatgggtg	gagtatttac	ggtaaactgc	360
ccacttggca	gtacatcaag	tgtatcatat	gccaaagtccg	ccccctattg	acgtcaatga	420
cggtaaatgg	cccgcctggc	attatgccca	gtacatgacc	ttacgggact	ttcctacttg	480
gcagtagcatc	tacgtattag	tcatcgctat	taccatgggtg	atgcggtttt	ggcagtagac	540
caatgggctg	ggatagcggg	ttgactcacg	gggatttcca	agtctccacc	ccattgacgt	600
caatgggagt	ttgttttggc	acccaaatca	acgggacttt	ccaaaatgtc	gtaataaccc	660
cgccccgttg	acgcaaatgg	gcggtaggcg	tgtacggtgg	gaggtctata	taagcagagc	720
tcgtttagtg	aaccgtcaga	tactagaag	ctttattgcg	gtagtttacc	acagttaaat	780
tgtaacgcca	gtcagtgttt	ctgacacaac	agtctcgaac	ttaagctgca	gaagtgtgct	840
gtgaggcact	gggcaggtaa	gtatcaaggt	tacaagacag	gtttaaggag	accaatagaa	900
actgggcttg	tcgagacaga	gaagactctt	gcgtttctga	taggcacctt	ttggtcttac	960
tgacatccac	tttgcctttc	tctccacagg	tgtccactcc	cagttcaatt	acagctctta	1020
aggctagagt	acttaatacg	actcactata	ggctagcatg	ggagtgctaa	aattcaagca	1080
catctttttc	agaagctttg	ttaaatacaag	tgtagtatcc	cagatagttt	tcactttcct	1140
tctgattcca	tgttgcttga	ctctgaattt	cagagcacct	cctgttattc	caaatgtgcc	1200
tttctctctg	gcctggaatg	cccccaagtga	attttctctt	ggaaaatttg	atgagccact	1260
agatatgagc	ctcttctctt	tcataggaag	ccccccaata	aacgccaccg	ggcaagggtg	1320
tacaatattt	tatggtgata	gacttgggta	ctatccttac	atagattcaa	tcacaggagt	1380
aactgtgaat	ggaggaatcc	cccagaagat	ttccttacia	gaccatctgg	acaaccataa	1440
gaaagacatt	acattttata	tgccagtaga	caatttggga	atggctgta	ttgactggga	1500
agaatggaga	cccacttggg	caagaaactg	gaaacctaaa	gatgtttaca	agaataggtc	1560
tattgaattg	gttcagcaac	aaaatgtaca	acttagcttc	acagaggcca	ctgagaaagc	1620
aaaacaagaa	tttgaaaagg	caggaagga	tttctctgta	gagactataa	aattgggaaa	1680
attacttcgg	ccaaatcact	tgtggggta	ttatcttttt	ccggattggt	acaaccatca	1740
ctataagaaa	cccggttaca	atggaagttg	cttcaatgta	gaaataaaaa	gaaatgatga	1800
tctcagctgg	ttgtggaatg	aaagcactgc	tctttaccca	tccatttatt	tgaacactca	1860
gcagtctcct	gtagctgcta	cactctatgt	gcgcaatcga	gttcgggaag	ccatcagagt	1920
ttccaaaata	cctgatgcaa	aaagtccact	tcgggttttt	gcataatacc	gcatagtttt	1980
tactgatcaa	gttttgaat	tcctttctca	agatgaactt	gtgtatacat	ttggcgaaac	2040
tgttgctctg	gggtgctctg	gaattgtaat	atggggaaacc	ctcagtataa	tgcgaaagtat	2100
gaaatcttgc	ttgtctctag	acaattacat	ggagactata	ctgaatcctt	acataatcaa	2160
cgtcacacta	gcagccaaaa	tgtgtagcca	agtgccttgc	caggagcaag	gagtgtgtat	2220
aaggaaaaac	tggaaatcaa	gtgactatct	tcacctcaac	ccagataatt	ttgctattca	2280
acttgagaaa	gggtgaaagt	tcacagtacg	tggaaaaaccg	acacttgaag	acctgtagca	2340
atcttctgaa	aaattttatt	gcagctgtta	tagcaccttg	agttgtaagg	agaaagctga	2400
tgtaaaaagc	actgatgctg	ttgatgtgtg	tattgctgat	gggtgctgta	tagatgcttt	2460
tctaaaacct	cccattggaga	cagaagaacc	tcaaattttc	tactgaggat	ccatagctaa	2520
cgcccctctc	cctccccccc	ccctaacggt	actggccgaa	gccgcttggg	ataaggccgg	2580
tgtgctgttg	tctatatggt	atcttccacc	atattgccgt	cttttggcaa	tgtgagggcc	2640
cggaaacctg	gccctgtctt	cttgacgagc	atccttaggg	gtctttcccc	tctcgccaaa	2700
ggaatgcaag	gtctgttgaa	tgtcgtgaag	gaagcagttc	ctctggaagc	ttcttgaaga	2760
caaacaacgt	ctgtagcgac	cctttgcagg	cagcggaaacc	ccccacctgg	cgacaggtgc	2820
ctctgcggcc	aaaagccacg	tgtataagat	acacctgcaa	aggcggcaca	accccagtgc	2880
cacgttgtga	ggttgatagt	tgtggaaaga	gtcaaatggc	tctcctcaag	cgtattcaac	2940
aaggggctga	aggatgcca	gaaggtaccc	cattgtatgg	gatctgatct	ggggcctcgg	3000
tgcacatgct	ttacatgtgt	ttagtgcagg	ttaaaaaac	gtctaggccc	cccgaaccac	3060
ggggacgtgg	ttttcctttg	aaaaacacga	tgataagctt	gccacaaccc	acagcggccg	3120
ctgccatcat	ggttcgacca	ttgaactgca	tcgtcgccgt	gtcccaaat	atggggattg	3180
gcaagaacgg	agacctacc	tggcctccgc	tcaggaacga	gttcaagtac	ttccaaagaa	3240
tgaccacaac	ctcttcagtg	gaaggtaaac	agaatctggt	gattatgggt	aggaaaacct	3300
ggttctccat	tcctgagaag	aatcgacctt	taaaggacag	aattaatata	gttctcagta	3360
gagaactcaa	agaaccacca	cgaggagctc	atcttcttgc	caaaagtttg	gatgatgcct	3420
taagacttat	tgaacaaccg	gaattggcaa	gtaaaagta	catggtttgg	atagtcggag	3480

ES 2 633 295 T3

```

gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca cctcagactc tttgtgacaa 3540
ggatcatgca ggaatttgaa agtgacacgt ttttcccaga aattgatttg gggaaatata 3600
aacttctccc agaataccca ggcgtcctct ctgaggtcca ggaggaaaaa ggcatcaagt 3660
ataagtttga agtctacgag aagaaagact aaacgcgtgg tacctctaga gtcgaccggg 3720
gcggccgctt cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag 3780
aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac 3840
cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt 3900
tcagggggag atgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtgggtaaaat 3960
cgataaggat ccgggctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca 4020
gttgcgagc ctgaatggcg aatggacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt 4080
gtgggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc 4140
gctttcttcc cttcctttct cgcacagttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg 4200
gggctccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 4260
tagggtagat gttcacgtag tgggccatgc ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg 4320
ttggagtcca gtttcttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaacct 4380
atctcggctc attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttgggttaaaa 4440
aatgagctga tttacaacaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gcttacaatt 4500
tcctgatgcg gtattttctc cttacgcac tgtgcggtat ttcacaccgc atatgggtgca 4560
ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac ccgcaaacct 4620
ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga 4680
ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcacgaaa cgcgcgagac 4740
gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata atgggttctt 4800
agacgtcagg tggcactttt cggggaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 4860
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 4920
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttatt cccttttttg 4980
cggcattttg ccttcctggt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 5040
aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 5100
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat 5160
gtggcgcggt attatccggt attgacgccc ggcaagagca actcggctcg cgcatacct 5220
attctcagaa tgacttggtt gactactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 5280
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taacctgag tgataaacact gcggccaact 5340
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg 5400
atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaaccgac 5460
agcgtgacac cacgatgcct gttagcaatg caacaacggt gcgcaaaacta ttaactggcg 5520
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 5580
caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 5640
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 5700
gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 5760
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat 5820
atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 5880
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgctccac tgagcgtcag 5940
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgccc gtaatctgct 6000
ccttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac 6060
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 6120
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 6180
ctctgctaatt cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtctgtt cttaccgggt 6240
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcgtc gggctgaacg gggggttctg 6300
gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 6360
tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcggg caggtatccg gtaagcggca 6420
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 6480
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgctcagggg 6540
ggcggagcct atgaaaaaac gccagcaacg cgcgcttttt acggttctctg gccttttctg 6600
ggccttttgc tcacatggct cgacagatct 6630

```

<210> 53
 <211> 186
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> dihidrofolato reductasa

10 <400> 53

ES 2 633 295 T3

```

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

```

<210> 54

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial de His

<220>

<223> etiqueta de His

10

<400> 54

His His His His His His

1

5

15 <210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> etiqueta Flag

<400> 55

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

25

<210> 56

<211> 1449

<212> ADN

30 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Secuencia de ARNm de Gen2

35 <400> 56

ES 2 633 295 T3

```

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

```

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de composiciones de inmunoglobulina (IG) y una hialuronidasa soluble para su uso para tratar una enfermedad o afección tratables con IG en un sujeto, en donde:

5 la IG y la hialuronidasa soluble se formulan por separado para la administración subcutánea;
 la IG y la hialuronidasa soluble se formulan para administración de dosificación única una vez al mes;
 la hialuronidasa soluble se administra por separado de la IG antes de la administración de la IG y en el mismo sitio que la IG;
 10 la concentración de IG es de 5 a 15% p/v y la cantidad de IG en la composición es de 0,5 gramos (g) a 70 g;
 la IG se formula en un volumen de líquido que es de 50 mL a 700 mL;
 la hialuronidasa soluble se formula para administración como una razón de hialuronidasa a IG de 10 U/gramo (g) a 500 U/g de IG, con lo que la cantidad de hialuronidasa en la composición es suficiente para efectuar el aumento de biodisponibilidad de la IG cuando se administra combinada con la IG hasta al menos 90% de la biodisponibilidad de la misma dosificación única de IG administrada a través de administración intravenosa
 15 para el tratamiento de la misma enfermedad o afección tratable con IG;
 la hialuronidasa soluble se formula en un volumen de líquido que es de 5 a 30 mL; y
 la enfermedad o afección tratables con IG se seleccionan entre inmunodeficiencia; hipogammaglobulinemia adquirida secundaria a neoplasias hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC); Síndrome de Guillain-Barré; Púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; Miastenia Gravis; síndrome de Moersch-Woltmann; hipogammaglobulinemia secundaria, incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica; deficiencia de anticuerpos específicos; Encefalomiелitis diseminada aguda; vasculitis necrotizante sistémica positiva para ANCA; Anemia hemolítica autoinmunitaria; Penfigoide bulloso; Penfigoide cicatricial;
 20 Síndrome de Evans, incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria con trombocitopenia inmunitaria; Trombocitopenia aloinmunitaria feto-maternal/neonatal (FMAIT/NAIT); Síndrome hemofagocítico; Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas de alto riesgo; neuropatía paraproteínica de tipo IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; Síndrome opsoclono mioclono atáxico; Pénfigo foliáceo; Pénfigo vulgar; Púrpura post-transfusión; Necrólisis epidérmica tóxica/Síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); Síndrome de choque tóxico; Enfermedad de Alzheimer; Lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; septicemia; tumores de células B; trauma; y una infección bacteriana, viral o fúngica.

2. La combinación de la reivindicación 1, en donde la cantidad de IG en la composición es 5 g, 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g, 23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 33 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g o 40 g.

3. La combinación de la reivindicación 1, en donde la IG en la composición se formula para la infusión subcutánea por gravedad, bomba de infusión o inyección en una cantidad que es de 20 a 30 gramos.

4. La combinación de la reivindicación 1, donde la composición IG es una formulación de IG líquida al 10%.

5. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la hialuronidasa en la composición es de 5000 unidades a 7500 unidades o 1.000 unidades a 10.000 unidades.

6. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la hialuronidasa en la composición está en una cantidad que se encuentra a una razón (hialuronidasa unidades/gramos de IG) de 10 U/gramo (g), 20 U/g, 30 U/g, 35 U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g, o 300 u/gramo.

7. La combinación de la reivindicación 6, en donde la hialuronidasa en la composición se administra en una proporción de 50 U/gramo de IG.

8. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la hialuronidasa en la composición es una PH20, o una forma truncada de la misma.

9. La combinación o composición de la reivindicación 8, en donde la PH20 humana truncada:

55 conserva una actividad hialuronidasa y es soluble; y
 se selecciona de entre los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de los SEC ID NO: 4-9, o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 91% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de los SEC ID NO: 4-9.

10. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la IG en la composición se purifica a partir de plasma humano.

11. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la IG en la composición contiene más de

95% de IgG.

12. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la concentración de la IG es de 6 a 15% p/v, o de 8 a 12% p/v de la composición IG.

5

13. La combinación de la reivindicación 12, en donde la concentración de IG es de 10% p/v.

14. La combinación de la reivindicación 1, en donde la enfermedad IG-tratable o afección se selecciona de entre:

10 una inmunodeficiencia seleccionada de entre inmunodeficiencia variable común (CVID), agammaglobulinemia congénita, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada grave (SCID), hipogammaglobulinemia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA), hipogammaglobulinemia de la infancia, y degeneración cerebelosa paraneoplásica sin anticuerpos;

15 hipogammaglobulinemia adquirida secundaria a neoplasias hematológicas seleccionadas de entre leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM) y linfoma no hodgkiniano (NHL);

una miopatía inflamatoria seleccionada entre polimiositis, dermatomiositis y miositis por cuerpos de inclusión; y una afección bacteriana, viral o fúngica seleccionada de entre *Haemophilus influenzae* tipo B, *Pseudomonas aeruginosa* tipos A y B, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* del grupo B, *Streptococcus pneumoniae* tipos

20 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, y 23, Adenovirus tipos 2 y 5, citomegalovirus, virus de Epstein Barr VCA, virus de la Hepatitis A, virus de Hepatitis B, Virus del Herpes simple tipo 1, Virus del Herpes simple tipo 2, Gripe A, Sarampión, Parainfluenza tipos 1, 2 y 3, Poliomieltitis, Virus de la varicela zoster, *Aspergillus* y *Candida albicans*.