

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 669**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2012 E 15158288 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2907504**

54 Título: **Composición y formulación lipídica de una enzima de degradación de hialuronano y uso de la misma para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata**

30 Prioridad:

08.02.2011 US 201161462875 P

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

28.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**XIAOMING, LI;
RAMPRASAD, MYSORE;
THOMPSON, CURTIS;
SHEPARD, HAROLD MICHAEL;
BOOKBINDER, LOUIS HOWARD y
FROST, GREGORY IAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 634 669 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

Composición y formulación lipídica de una enzima de degradación de hialuronano y uso de la misma para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata**Campo de la invención**

Se proporcionan composiciones y formulaciones o co-formulaciones que contienen una enzima de degradación de hialuronano. Las composiciones, formulaciones o co-formulaciones también pueden contener otro agente terapéutico, tal como uno que sea adecuado para el tratamiento de la Hiperplasia Prostática Benigna, por ejemplo, un inhibidor de la 5-alfa reductasa. Las composiciones y formulaciones se pueden utilizar para el tratamiento de la Hiperplasia Prostática Benigna. Las composiciones y formulaciones se pueden proporcionar combinadas con uno o más agentes para el tratamiento de la Hiperplasia Prostática Benigna.

Compendio

Se proporcionan en la presente memoria liposomas multivesiculares (LMV) que contienen un lípido neutro, un lípido anfipático y una enzima de degradación de hialuronano. La enzima de degradación de hialuronano en los LMV tiene generalmente una actividad de al menos 40.000 U/mg. La concentración de la enzima de degradación de hialuronano está comprendida entre 0,1 mg/mL y 1 mg/mL, 0,2 mg/mL y 0,5 mg/mL, o es al menos aproximadamente 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,8 mg/mL o 0,9 mg/mL.

En algunos ejemplos, los LMV contienen ácido hialurónico (HA). El HA puede estar presente en una cantidad suficiente para aumentar la encapsulación y la actividad enzimática de la enzima de degradación de hialuronano. La concentración de ácido hialurónico en los LMV está entre o aproximadamente entre 0,05 mg/mL y 50 mg/mL, 0,75 mg/mL y 13,0 mg/mL, o entre 1 mg/mL y 10 mg/mL o es al menos o aproximadamente 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL o 1 mg/mL. En algunos ejemplos, la razón de ácido hialurónico con respecto a la enzima de degradación de hialuronano es de 1:500, 1:400, 1:300, 1:200, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 200:1, 300:1, 400:1, 500:1.

En los ejemplos de la presente invención, los LMV se pueden elaborar mediante un procedimiento o se pueden obtener mediante un procedimiento que incluye a) formar un primer componente acuoso que contiene una enzima de degradación de hialuronano a una concentración inferior a 2 mg/mL; b) formar un componente lipídico que contiene al menos un disolvente orgánico, al menos un lípido anfipático y al menos un lípido neutro; c) formar una emulsión a partir del primer componente acuoso y del componente lipídico; d) dispersar la emulsión en un segundo componente acuoso para formar esférulas de disolvente; y e) separar el disolvente orgánico de las esférulas de disolvente para formar liposomas multivesiculares suspendidos en el segundo componente acuoso. En el procedimiento, la enzima de degradación de hialuronano en el primer componente acuoso está en una concentración entre aproximadamente 0,1 mg/mL y 1,9 mg/mL, 0,5 mg/mL y 1,5 mg/mL o es de aproximadamente 1 mg/mL. El primer componente acuoso también puede contener un excipiente que es sacarosa, cloruro de calcio (CaCl_2), glicerol, dextrano, PEG (p.ej. PEG-6000), ácido hialurónico (HA), prolina, Arg-HCl, sorbitol, trehalosa, albúmina de suero humano (HSA), o una combinación de los mismos. En tales ejemplos, el CaCl_2 está entre o aproximadamente entre CaCl_2 1 mM y 50 mM, CaCl_2 5 mM y 25 mM, CaCl_2 10 mM y 20 mM, o al menos o aproximadamente o 10 mM, 15 mM o 20 mM; el dextrano está entre o aproximadamente entre 0,01% y 1% o 0,05% y 0,5% o al menos o aproximadamente o 0,1%; el PEG está entre o aproximadamente entre 0,01% y 1% o 0,05% y 0,5% o al menos o aproximadamente o 0,1%; la prolina está entre o aproximadamente entre prolina 1 mM y 1 M, 10 mM y 500 mM o al menos o aproximadamente o 100 mM; la arginina está entre o aproximadamente entre 1 mM y 1 M, 10 mM y 500 mM o al menos o aproximadamente o 100 mM; el sorbitol está entre, o aproximadamente entre sorbitol al 1% y 20%, al 5% y 15% o al menos o aproximadamente o 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%; y/o la trehalosa está entre o aproximadamente entre trehalosa al 1% y 20%, 5% y 15% o al menos o aproximadamente o al 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%; y/o el ácido hialurónico (HA) está entre aproximadamente 1 mg/mL y 100 mg/mL, 10 mg/mL y 75 mg/mL, o 15 mg/mL y 50 mg/mL, o al menos o aproximadamente o 1 mg/mL de HA, 2 mg/mL de HA, 3 mg/mL de HA, 4 mg/mL de HA, 5 mg/mL de HA, 6 mg/mL de HA, 7 mg/mL de HA, 8 mg/mL de HA, 9 mg/mL de HA, 10 mg/mL de HA, 11 mg/mL de HA, 12 mg/mL de HA, 13 mg/mL de HA, 14 mg/mL de HA, 15 mg/mL de HA, 16 mg/mL de HA, 17 mg/mL de HA, 18 mg/mL de HA, 19 mg/mL de HA, 20 mg/mL de HA, 25 mg/mL de HA, 30 mg/mL de HA, 40 mg/mL de HA, 50 mg/mL de HA.

En los LMV proporcionados en la presente memoria, los LMV se pueden elaborar mediante un procedimiento que incluye también la eliminación del segundo componente acuoso y la suspensión de los liposomas multivesiculares en un tercer componente acuoso. El tercer componente acuoso puede contener NaCl, por ejemplo, entre o aproximadamente entre 100 mM y 150 mM o es al menos o aproximadamente o 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM o 150 mM; y/o la histidina es, por ejemplo entre 1 mM y 100 mM, 5 mM y 15 mM o es al menos o

aproximadamente 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM. El pH del tercer tampón acuoso es o está aproximadamente entre 6,0 y 8,0 o entre 6,5 y 7,5 o es al menos o aproximadamente o 6,0, 6,5, 7,0 ó 7,4.

- 5 En los LMV proporcionados en la presente memoria, los LMV pueden contener o pueden ser elaborados o se pueden obtener mediante un procedimiento que contiene un lípido neutro que es un diglicérido o un triglicérido. Por ejemplo, el lípido neutro es un triglicérido que consiste en trioleína o tricaprilina, o una mezcla de trioleína y tricaprilina. En algunos ejemplos, la trioleína y la tricaprilina están en una razón molar 50:50 (1:1). En los ejemplos de los LMV proporcionados en la presente memoria, los LMV pueden contener o se pueden elaborar o se pueden
- 10 obtener mediante un procedimiento que contiene un lípido anfipático que es un fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), fosfatidilserina (PS), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomielina o diaciltrimetilamoniopropano (DITAP). Por ejemplo, el lípido anfipático es una fosfatidilcolina que es DEPC o DOPC, o una mezcla de DEPC y DOPC. El DEPC y el DOPC están en una razón molar que es al menos o aproximadamente al menos una razón molar 50:50 (1 DEPC:1 DOPC), 75/25 o 90/10. En los ejemplos de los LMV
- 15 proporcionados en la presente memoria, los LMV pueden contener o se pueden elaborar adicionalmente mediante un procedimiento que contiene DPPG, colesterol o DPPG y colesterol.

- En cualquiera de los LMV proporcionados en la presente memoria, los LMV contienen, por ejemplo a partir de la elaboración mediante un procedimiento que contiene, un agente terapéutico adicional. El agente terapéutico puede
- 20 ser hidrófilo o hidrófobo. Típicamente, el agente terapéutico es un agente para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata. Por ejemplo, el agente terapéutico es un antiandrógeno, un bloqueador alfa, una toxina botulínica o una enzima hidrolítica. El antiandrógeno puede ser un antiandrógeno esteroide, un antiandrógeno no esteroide o un inhibidor de la 5 α -reductasa. En ejemplos particulares, el agente es finasterida o dutasterida.

- 25 También se proporcionan en la presente memoria composiciones o combinaciones que contienen cualquiera de los LMV proporcionados en la presente memoria. Las composiciones o combinaciones pueden contener adicionalmente un agente terapéutico. El agente terapéutico se puede formular por separado del liposoma multivesicular. Es ilustrativo de un agente terapéutico un agente adecuado para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata. Por ejemplo, el agente terapéutico es un antiandrógeno, un bloqueador alfa, una toxina botulínica y una enzima
- 30 hidrolítica. El antiandrógeno es un antiandrógeno esteroide, un antiandrógeno no esteroide o un inhibidor de la 5 α -reductasa. Los inhibidores de la 5 α -reductasa son finasterida o dutasterida. También se proporcionan en la presente memoria contenedores o kits que contienen cualquiera de las composiciones o combinaciones.

- También se proporcionan en la presente memoria composiciones que contienen una enzima de degradación de hialuronano; y ácido hialurónico, por medio de lo cual la enzima de degradación de hialuronano conserva al menos
- 35 50% de la actividad hialuronidasa durante al menos seis meses entre 28°C y 32°C o al menos un año entre 2°C y 8°C. Por ejemplo, se conserva al menos una actividad hialuronidasa de 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o más. La enzima de degradación de hialuronano y el ácido hialurónico en la composición están a una razón molar de o aproximadamente 5000:1, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1900:1, 1800:1, 1700:1, 1650:1, 1600:1, 1500:1, 1200:1, 1200:1,
- 40 1000:1, 900:1, 800:1, 700:1, 600:1, 500:1, 100:1, 90:1, 80:1, 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:500, 1:600, 1:700, 1:800, 1:900, 1:1000, 1:1100, 1:1200, 1:1300, 1:1400, 1:1500, 1:1600, 1:1700, 1:1800, 1:1900, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000. La concentración de la enzima de degradación de hialuronano en la composición es, o está aproximadamente entre o es de al menos, 1 U/mL a 10000 U/mL, 10 U/mL a 5000 U/mL, 100 U/mL a 1000 U/mL o es al menos o aproximadamente o 10 U/mL, 50 U/mL, 100
- 45 U/mL, 200 U/mL, 300 U/mL, 400 U/mL, 500 U/mL, 600 U/mL, 700 U/mL, 800 U/mL, 900 U/mL, 1000 U/mL o más. La concentración de ácido hialurónico es o está aproximadamente entre 1 mg/mL a 100 mg/mL, de 10 mg/mL a 50 mg/mL, de 1 mg/mL a 20 mg/mL o es de al menos aproximadamente 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL, 10 mg/mL, 11 mg/mL, 12 mg/mL, 13 mg/mL, 15 mg/mL, 16 mg/mL, 17 mg/mL, 18 mg/mL, 19 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, o 50 mg/mL. La composición se puede formular
- 50 para uso único o múltiple. La composición se puede formular en un volumen por administración de entre o aproximadamente 0,5 mL y 50 mL, 1 mL y 10 mL, 1 mL y 5 mL o al menos o aproximadamente o 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL o 50 mL.

- En cualquiera de los ejemplos de los LMV proporcionados en la presente memoria o en las composiciones
- 55 proporcionadas en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano es una hialuronidasa, una condroitinasa o una liasa. Por ejemplo, la hialuronidasa es una hialuronidasa de tipo mamífero o una hialuronidasa bacteriana. En algunos ejemplos, la hialuronidasa es una hialuronidasa PH20. La hialuronidasa PH20 puede ser PH20 ovina, de ratón, de mono, bovina, bacteriana y humana. La PH20 es generalmente soluble o es una forma que se secreta cuando se expresa en una célula de mamífero, tal como una célula CHO. La PH20 soluble puede ser una
- 60 que carezca de un sitio de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI) C-terminal o una porción del sitio de anclaje a GPI. Por ejemplo, la PH20 soluble tiene una secuencia de aminoácidos que es una forma truncada del polipéptido expuesto en el SEQ ID NO: 2, por lo que la PH20 soluble carece de todo o de una porción del sitio de anclaje a GPI C-terminal, o tiene una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia al menos de 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con su forma truncada. En ejemplos particulares, la PH20 soluble

tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de los SEQ ID NO: 4-9 y 46-48, y variantes alélicas, variantes de especies y otras variantes de los mismos. En los ejemplos de la presente invención, la enzima de degradación de hialuronano está glicosilada. La enzima de degradación de hialuronano también se puede modificar por conjugación a un polímero. El polímero es PEG o dextrano. La enzima de degradación de hialuronano también puede estar ligada, directa o indirectamente, a una marca o a un radical detectable. Por ejemplo, la marca o el radical detectable es una proteína fluorescente.

Se proporcionan en la presente memoria métodos de tratamiento de una enzima de degradación de hialuronano, tal como la hiperplasia benigna de próstata mediante la administración de cualquiera de las composiciones o combinaciones proporcionadas en la presente memoria. También se proporcionan los usos de cualquiera de las composiciones o combinaciones proporcionadas en la presente memoria para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata.

Antecedentes

La Hipertrofia o Hiperplasia Prostática Benigna (HBP) es una afección no cancerosa resultante del crecimiento de la glándula prostática como consecuencia de la progresión natural del crecimiento de la próstata con la edad. La cápsula de la próstata alrededor de la glándula prostática puede impedir que la glándula prostática crezca aún más. Esto hace que la región interna de la glándula prostática apriete la uretra. La compresión de la uretra aumenta la resistencia al flujo de orina a través de la región de la uretra rodeada por la próstata. La vejiga urinaria tiene que ejercer más presión para forzar la orina a través de la uretra restringida, lo que da como resultado la hipertrofia de las paredes de la vejiga urinaria, rigidez y exposición de una variedad de síntomas del tracto urinario inferior (STUI). Los STUI incluyen flujo de orina débil o intermitente al orinar, tensión al orinar, vacilación antes de que la orina empiece a fluir, sensación de que la vejiga no se ha vaciado completamente después de orinar, goteo al final de la micción o pérdidas después, aumento de la frecuencia de micción particularmente durante la noche y necesidad urgente de orinar. La HBP es una de las afecciones médicas más comunes que afectan a hombres, especialmente a hombres mayores. Se ha informado que la HBP afecta al 50% de los hombres a los 50 años y al 75% de los hombres a los 80 años. Debido al envejecimiento de la población, se prevé que la prevalencia de HBP aumente sustancialmente en los próximos 20 años. La HBP grave puede causar problemas serios tales como una disminución de la calidad de vida, infección del tracto urinario, lesión de la vejiga y los riñones, incontinencia y más grave, hematuria macroscópica e insuficiencia renal por uropatía obstructiva. De las estrategias actuales disponibles para el tratamiento de la HBP, incluyendo el uso de fármacos y la cirugía, todas tienen consecuencias adversas. Por lo tanto, existe la necesidad de regímenes de tratamiento alternativos.

Descripción detallada

Esquema

A. DEFINICIONES

B. DESCRIPCIÓN GENERAL - Hialuronano acumulado (HA) en la enfermedad e hidrólisis del mismo

C. ENZIMAS DE DEGRADACIÓN de HIALURONANO

1. Hialuronidasas

a. Hialuronidasas de tipo mamífero

i. PH20

ii. PH20 humana

b. Hialuronidasas bacterianas

c. Hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos

2. Otras enzimas de degradación de hialuronano

3. Enzimas de degradación de hialuronano solubles

a. PH20 humana soluble

4. Variantes de enzimas de degradación de hialuronano

5. Glicosilación de enzimas de degradación de hialuronano

6. Enzimas de degradación de hialuronano modificadas

7. Métodos de producción de ácidos nucleicos y polipéptidos codificados de enzimas de degradación de hialuronano

a. Vectores y células

b. Expresión

- i. Células eucariotas
- ii. Células de levadura
- iii. Células de insectos
- iv. Células de mamífero
- v. Plantas

c. Técnicas de purificación

D. COMPOSICIONES Y FORMULACIONES DE LIBERACIÓN SOSTENIDA DE ENZIMAS DE DEGRADACIÓN DE HIALURONANO

- 1. Composiciones de enzimas de degradación de haluronano
- 2. Formulaciones de liberación sostenida

- a. Formulación de gel de depósito
- b. Liposomas multivesiculares (LMV)

- i. Parámetros para mejorar la encapsulación, estabilidad y velocidad de liberación
- ii. Ejemplos de formulaciones de LMV- enzimas de degradación de hialuronano
- iii. Co-Formulaciones de LMV
- iv. Evaluación de la encapsulación y la eficacia

E. DOSIFICACIÓN, ADMINISTRACIÓN Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO

F. TERAPIA COMBINADA PARA EL TRATAMIENTO DE LA HIPERTROFÍA PROSTÁTICA BENIGNA

1. Antiandrógenos

- a. Anti-andrógenos esteroides
- b. Anti-andrógenos no esteroides
- c. Inhibidores de la 5 α -reductasa

- 2. Agentes bloqueadores alfa
- 3. Toxina botulínica y BT modificadas
- 4. Otros agentes
- 5. Artículos de Fabricación
- 6. Kits

G. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA EFICACIA

- 1. Modelos de animales
- 2. Procedimientos In Vitro

H. EJEMPLOS

A. DEFINICIONES

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Todas las patentes, solicitudes de patentes, solicitudes y publicadas y publicaciones, secuencias de Genbank, bases de datos, sitios de la red y otros materiales publicados a los que se hace referencia a lo largo de toda la presente descripción, a menos que se indique de otro modo, se incorporan como referencia en su totalidad. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos en la presente memoria, prevalecen los de esta sección. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección, se entiende que tales identificadores pueden cambiar y que una información particular en Internet puede ir y venir, pero se puede encontrar información equivalente buscando en Internet. La referencia a la misma evidencia la disponibilidad y difusión públicas de dicha información.

Según se utiliza en la presente memoria, aproximadamente lo mismo significa dentro de una cantidad que un experto en la técnica consideraría la misma. Típicamente, para composiciones farmacéuticas, al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 10% se considera aproximadamente el mismo. Dicha cantidad puede variar dependiendo de la tolerancia de los sujetos a la variación en la composición particular.

Según se utiliza en la presente memoria, cuando se hace referencia a la dosificación basada en mg/kg del sujeto, se considera que un sujeto humano promedio tiene una masa de aproximadamente 70 kg.

5 Según se utiliza en la presente memoria, "administración intravenosa" hace referencia a la administración de un fármaco directamente en una vena.

10 Según se utiliza en la presente memoria, "hialuronidasa" hace referencia a una clase de enzimas que degradan el hialuronano. Las hialuronidasas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.2.1 o EC 4.2.99.1), hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos (EC 3.2.1.36), y hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35). Las hialuronidasas incluyen cualquiera de origen no humano incluyendo, pero no limitadas a, murinas, caninas, felinas, leporinas, aviares, bovinas, ovinas, porcinas, equinas, piscícolas, de ranas, bacterianas y cualquiera de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas humanas ilustrativas incluyen HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 y PH20 (SEQ ID NO: 1). También se incluyen entre las hialuronidasas las hialuronidasas solubles, incluyendo PH20 ovina y bovina, PH20 humana soluble y rHuPH20. Los ejemplos de hialuronidasas solubles bovinas u ovinas comercialmente disponibles son la hialuronidasa Vitrase® (hialuronidasa ovina) y la hialuronidasa Amphadase® (hialuronidasa bovina).

20 Según se utiliza en la presente memoria, "PH20" hace referencia a un tipo de hialuronidasa que se produce en el esperma y es activa en condiciones neutras. La PH-20 se encuentra en la superficie del esperma, y en el acrosoma derivado del lisosoma, donde está unida a la membrana interna del acrosoma. La PH20 incluye aquellas de cualquier origen incluyendo, pero no limitado a, humanos, chimpancés, monos Cynomolgus, monos Rhesus, móridos, bóvidos, óvidos, cobayas, conejos y ratas. Los polipéptidos PH20 ilustrativos incluyen los de los seres humanos (SEQ ID NO: 1), chimpancé (SEQ ID NO: 101), mono Rhesus (SEQ ID NO: 102), mono Cynomolgus (SEQ ID NO: 29), vaca (SEQ ID NO: 11 y 64); ratón (SEQ ID NO: 32); rata (SEQ ID NO: 31); conejo (SEQ ID NO: 25); oveja (SEQ ID NO: 27, 63 y 65) y cobaya (SEQ ID NO: 30). La referencia a PH20 incluye polipéptidos precursores de PH20 y polipéptidos PH20 maduros (tales como aquellos en los que se ha eliminado una secuencia señal), formas truncadas de los mismos que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y variantes de especies, variantes codificadas por variantes de empalme y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o más con los polipéptidos precursores expuestos en los SEQ ID NO: 93 y 95, o sus formas maduras. Los polipéptidos PH20 también incluyen aquellos que contienen modificaciones químicas o post-traduccionales y aquellos que no contienen modificaciones químicas o post-traduccionales. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, albuminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica. Una hialuronidasa PH20 truncada es cualquier forma acortada en el extremo C-terminal de la misma, particularmente formas que están truncadas y son activas en condiciones neutras cuando están N-glicosiladas.

40 Según se utiliza en la presente memoria, una "PH20 soluble" hace referencia a cualquier forma de PH20 que sea soluble en condiciones fisiológicas. Una PH20 soluble puede ser identificada, por ejemplo, por su reparto en la fase acuosa de una solución de Triton® X-114 a 37°C (Bordier et al., (1981) J. Biol. Chem., 256: 1604 - 7). La PH20 anclada a la membrana, tal como la PH20 anclada a lípidos, incluyendo la PH20 anclada a GPI, se repartirá en la fase rica en detergente, pero se repartirá en la fase pobre en detergente o acuosa después del tratamiento con fosfolipasa-C. Entre las PH20 solubles se encuentra la PH20 anclada a membrana en la que se han eliminado o modificado una o más regiones asociadas con el anclaje de la PH20 a la membrana, donde la forma soluble conserva la actividad hialuronidasa. La PH20 soluble también incluye la PH20 soluble recombinante y las contenidas en o purificadas a partir de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, extractos de testículos de ovejas o vacas. Es ilustrativa de tales PH20 solubles la PH20 humana soluble.

50 Según se utiliza en la presente memoria, la PH20 o sHuPH20 humana soluble incluye polipéptidos de PH20 que carecen de toda o una parte de la secuencia de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el extremo C, de tal manera que, después de la expresión, los polipéptidos son solubles en condiciones fisiológicas. La solubilidad se puede evaluar por cualquier método adecuado que demuestre solubilidad en condiciones fisiológicas. Son ilustrativos de tales métodos el análisis con Triton® X-114, que evalúa el reparto en la fase acuosa y que se describe anteriormente y en los ejemplos. Además, un polipéptido de PH20 humano soluble es, si se produce en células CHO, tales como células CHO-S, un polipéptido que se expresa y se secreta en el medio de cultivo celular. Los polipéptidos humanos PH20 solubles, sin embargo, no se limitan a los producidos en células CHO, sino que se pueden producir en cualquier célula o mediante cualquier método, incluyendo la expresión recombinante y la síntesis de polipéptidos. La referencia a la secreción en células CHO es conceptual. Por lo tanto, si un polipéptido pudiera ser expresado y secretado en células CHO y fuera soluble, es decir, se repartiera en la fase acuosa cuando se extrajera con Triton® X-114, sería un polipéptido PH20 soluble independientemente de que se produzca o no. Los polipéptidos precursores para polipéptidos sHuPH20 pueden incluir una secuencia señal, tal como una secuencia señal heteróloga o no heteróloga (*es decir* nativa). Los ejemplos de los precursores son aquellos que incluyen una secuencia señal, tal como la secuencia señal de 35 aminoácidos nativa en las posiciones de aminoácidos 1-35 (véanse, p.ej., los aminoácidos 1 - 35 del SEQ ID NO: 1).

Según se utiliza en la presente memoria, una "PH20 soluble ampliada" o "esPH20" incluye polipéptidos PH20 solubles que contienen residuos hasta la secuencia señal de anclaje a GPI y uno o más residuos contiguos de la secuencia señal de anclaje a GPI de manera que el esPH20 es soluble en condiciones fisiológicas. La solubilidad bajo condiciones fisiológicas se puede determinar por medio de cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede evaluar mediante el análisis con Triton® X-114 descrito anteriormente y en los ejemplos. Además, como se discutió anteriormente, una PH20 soluble es, si se produce en células CHO, tales como células CHO-S, un polipéptido que se expresa y se secreta en el medio de cultivo celular. Los polipéptidos de PH20 humanos solubles, sin embargo, no se limitan a los producidos en células CHO, sino que pueden producirse en cualquier célula o mediante cualquier método, incluyendo la expresión recombinante y la síntesis de polipéptidos. La referencia a la secreción en células CHO es conceptual. Por lo tanto, si un polipéptido pudiera ser expresado y secretado en células CHO y fuera soluble, es decir se repartiera en la fase acuosa cuando se extrajera con Triton® X-114, sería un polipéptido de PH20 soluble independientemente de que se produzca o no. Los polipéptidos esPH20 solubles humanos incluyen, además de los residuos 36-490, uno o más aminoácidos contiguos de la posición del residuo de aminoácido 491 del SEQ ID NO: 1 inclusive, de manera que el polipéptido resultante es soluble. Los polipéptidos solubles esPH20 humanos ilustrativos son aquellos que tienen residuos de aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496 y 36-497 del SEQ ID NO: 1. Son ilustrativos de estos aquellos con una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de los SEC ID NO: 151-154 y 185-187. También se incluyen variantes alélicas y otras variantes, tales como cualquiera con una identidad de secuencia de 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con los polipéptidos correspondientes de los SEQ ID NO: 151-154 y 185-187 que conservan actividad en condiciones neutras y son solubles. La referencia a la identidad de secuencia hace referencia a variantes con sustituciones de aminoácidos.

Según se utiliza en la presente memoria, la referencia a "esPH20s" incluye polipéptidos esPH20 precursores y polipéptidos esPH20 maduros (tales como aquellos en los que se ha eliminado una secuencia señal), formas truncadas de los mismos que tienen actividad enzimática (conservando al menos 1%, 10%, 30%, 40%, 50% o más de la forma completa) y son solubles, e incluyen variantes alélicas y variantes de especies, variantes codificadas por variantes de empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 40%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con los polipéptidos precursores expuestos en los SEQ ID NO: 1 y 3, o sus formas maduras.

Según se utiliza en la presente memoria, la referencia a "esPH20s" también incluye aquellas que contienen modificaciones químicas o post-traduccionales y aquellas que no contienen modificaciones químicas o post-traduccionales. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, PEGilación, albuminación, glicosilación, famesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, "PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20)" hace referencia a una forma soluble de PH20 humana que se expresa de forma recombinante y se secreta en células de ovario de hámster chino (CHO). La rHuPH20 soluble es codificada por un ácido nucleico que incluye la secuencia señal y se expone en SEQ ID NO: 49. También se incluyen moléculas de ADN que son variantes alélicas de la misma y otras variantes solubles. El ácido nucleico que codifica la rHuPH20 soluble se expresa en células CHO que secretan el polipéptido maduro. Tal como se produce en el medio de cultivo, hay heterogeneidad en el extremo C, de manera que el producto incluye una mezcla de especies que pueden incluir uno o más de los SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 9 con una abundancia diversa.

De manera similar, para otras formas de PH20, tales como las esPH20, los polipéptidos expresados de forma recombinante y sus composiciones pueden incluir una pluralidad de especies cuyo extremo C-terminal presenta heterogeneidad. Por ejemplo, las composiciones de esPH20 expresada de forma recombinante producidas por expresión del polipéptido del SEQ ID NO: 151, que codifica una esPH20 que tiene los aminoácidos 36-497, pueden incluir formas con menos aminoácidos, tales como 36-496, 36-495.

Según se utiliza en la presente memoria, un "radical unido a N" hace referencia a un residuo de aminoácido asparagina (N) de un polipéptido que es susceptible de ser glicosilado por medio de una modificación post-traducciona de un polipéptido. Los radicales ligados a N ilustrativos de la PH20 humana incluyen los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de la PH20 humana expuestos en el SEQ ID NO: 1.

Según se utiliza en la presente memoria, un "polipéptido N-glicosilado" hace referencia a un polipéptido de PH20 o forma truncada que contiene una conexión oligosacárido de al menos tres residuos de aminoácidos ligados a N, por ejemplo, radicales ligados a N correspondientes a los residuos de aminoácidos N235, N368 y N393 del SEQ ID NO: 1. Un polipéptido N-glicosilado puede incluir un polipéptido en el que tres, cuatro, cinco y hasta todos los radicales ligados a N están unidos a un oligosacárido. Los oligosacáridos ligados a N pueden incluir oligomanosa, oligosacáridos complejos, híbridos o sulfatados u otros oligosacáridos y monosacáridos.

Según se utiliza en la presente memoria, un "polipéptido parcialmente N-glicosilado " hace referencia a un polipéptido que contiene mínimamente un N-acetilglucosaminoglicano unido a al menos tres radicales ligados a N. Un polipéptido parcialmente glicosilado puede incluir diversas formas de glicano, incluyendo monosacáridos, oligosacáridos y formas de azúcar ramificadas, incluyendo las formadas por tratamiento de un polipéptido con EndoH, EndoF1, EndoF2 y/o EndoF3.

Según se utiliza en la presente memoria, un "polipéptido de PH20 desglicosilado" hace referencia a un polipéptido de PH20 en el que no todos los sitios de glicosilación posibles están glicosilados. La desglicosilación se puede efectuar, por ejemplo, eliminando la glicosilación, impidiéndola, o modificando el polipéptido para eliminar un sitio de glicosilación. No se requieren sitios de N-glicosilación particulares para la actividad, mientras que otros sí.

Según se utiliza en la presente memoria, "pegilado" hace referencia al anclaje covalente u otro anclaje estable de moléculas poliméricas, tales como polietilenglicol (radical de pegilación PEG) a enzimas de degradación de hialuronano, tales como hialuronidasas, típicamente para aumentar la semivida de la enzima de degradación de hialuronano.

Según se utiliza en la presente memoria, un "producto conjugado" hace referencia a un polipéptido unido directa o indirectamente a uno o más polipéptidos o radicales químicos distintos. Tales productos conjugados incluyen proteínas de fusión, las producidas por productos conjugados químicos y las producidas por cualquier otro método. Por ejemplo, un producto conjugado hace referencia a polipéptidos de PH20 solubles unidos directa o indirectamente a uno o más polipéptidos o radicales químicos, con lo cual al menos un polipéptido de PH20 soluble está unido, directa o indirectamente a otro polipéptido o radical químico, siempre que el producto conjugado conserve la actividad hialuronidasa. Los ejemplos de los productos conjugados proporcionados en la presente memoria incluyen polipéptidos de PH20 unidos directa o indirectamente a un dominio de multimerización, tal como un radical Fc, una toxina, una marca o un fármaco.

Según se utiliza en la presente memoria, una proteína de "fusión" hace referencia a un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que contiene una secuencia codificante de una molécula de ácido nucleico y la secuencia codificante de otra molécula de ácido nucleico en la que las secuencias codificantes están en el mismo marco de lectura de manera que cuando el constructo de fusión se transcribe y se traduce en una célula anfitriona, se produce la proteína que contiene las dos proteínas. Las dos moléculas pueden estar adyacentes en el constructo o estar separadas por un polipéptido conector que contiene 1, 2, 3 o más, pero típicamente menos de 10, 9, 8, 7 ó 6 aminoácidos. El producto proteico codificado por un constructo de fusión se denomina polipéptido de fusión. Los ejemplos de polipéptidos de fusión incluyen las fusiones con Fc.

Según se utiliza en la presente memoria, un "polímero" hace referencia a cualquier radical natural o sintético de elevado peso molecular que está conjugado con, es decir, conectado de forma estable directa o indirectamente a través de un conector, a un polipéptido. Tales polímeros, típicamente aumentan la semivida en el suero, e incluyen, pero no se limitan a, radicales siálicos, radicales de pegilación, dextrano, y azúcar y otros radicales, por ejemplo para la glicosilación. Por ejemplo, las hialuronidasas, tales como una PH20 soluble o rHuPH20, se pueden conjugar con un polímero.

Según se utiliza en la presente memoria, "actividad" hace referencia a una actividad funcional o actividades de un polipéptido o porción del mismo asociadas con una proteína de longitud completa (completa). Por ejemplo, los fragmentos activos de un polipéptido pueden mostrar una actividad de una proteína de longitud completa. Las actividades funcionales incluyen, pero no se limitan a, actividad biológica, actividad catalítica o enzimática, antigenicidad (capacidad de unirse a, o competir con, un polipéptido por la unión a un anticuerpo anti-polipéptido), inmunogenicidad, capacidad para formar multímeros y capacidad de unirse específicamente a un receptor o ligando para el polipéptido.

Según se utiliza en la presente memoria, la "actividad hialuronidasa" hace referencia a la capacidad para catalizar enzimáticamente la escisión del ácido hialurónico. El análisis XXII de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) para la hialuronidasa determina indirectamente la actividad de la hialuronidasa midiendo la cantidad de ácido hialurónico de mayor peso molecular o hialuronano, quedando sustrato (HA) después de que la enzima se deje reaccionar con HA durante 30 min a 37°C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645, United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Se puede utilizar una solución Patrón de Referencia en un análisis para determinar la actividad relativa, en unidades, de cualquier hialuronidasa. Se conocen en la técnica análisis *in vitro* para determinar la actividad hialuronidasa de las hialuronidasas, tales como PH20, incluyendo PH20 soluble y esPH20 y se describen en la presente memoria. Los análisis ilustrativos incluyen el análisis de microturbidez que mide la escisión del ácido hialurónico por la hialuronidasa indirectamente detectando el precipitado insoluble formado cuando el ácido hialurónico no escindido se une con la albúmina del suero. Se pueden utilizar Patrones de Referencia, por ejemplo, para generar una curva patrón para determinar la actividad en Unidades de la hialuronidasa que se está sometiendo a ensayo.

Según se utiliza en la presente memoria, "activo en condiciones neutras" hace referencia a la capacidad de un polipéptido de PH20 para catalizar enzimáticamente la escisión del ácido hialurónico a pH neutro (p.ej. a o aproximadamente pH 7,0). Generalmente, una PH20 activa en condiciones neutras, y soluble, p. ej., una PH20 truncada en el extremo C o parcialmente N-glicosilada, tiene o tiene aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91% 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% o más actividad en comparación con la actividad hialuronidasa de una PH20 activa neutra correspondiente que no está truncada en el extremo C o parcialmente N-glicosilada.

Según se utiliza en la presente memoria, una "secuencia señal de unión al ancla de GPI" es una secuencia C-terminal de aminoácidos que dirige la adición de un ancla de GPI preformada al polipéptido dentro del lumen del RE. Las secuencias señal de unión al ancla de GPI están presentes en los polipéptidos precursores de polipéptidos anclados a GPI, tales como polipéptidos de PH20 anclados a GPI. La secuencia señal de unión al ancla de GPI C-terminal típicamente contiene una región predominantemente hidrófoba de 8-20 aminoácidos, precedida por una región espaciadora hidrófila de 8-12 aminoácidos, inmediatamente aguas abajo del sitio ω o sitio de unión al ancla de GPI. Las secuencias de señal de unión al ancla de GPI se pueden identificar utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, métodos *in silico* y algoritmos (véanse, p.ej. Udenfriend et al. (1995) Methods Enzymol. 250: 571-582, Eisenhaber et al., (1999) J. Biol. Chem. 274:741-758, Fankhauser et al., (2005) Bioinformatics 21: 1846 - 1852, Omaetxebarria et al., (2007) Proteomics 7: 1951-1960, Pierleoni et al., (2008) BMC Bioinformatics 9: 392), Incluyendo aquellos que están fácilmente disponibles en sitios bioinformáticos de la red, tales como el sitio de herramientas ExPASy Proteomics (p.ej., el sitio WorldWideWeb expasy.ch/tools/).

Según se utiliza en la presente memoria, "ácidos nucleicos" incluye 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 de doble hebra. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, que están marcados opcionalmente, por ejemplo con una marca detectable, tal como una molécula fluorescente o radiomarca, se contemplan moléculas de hebra sencilla. Tales moléculas tienen 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 ó 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria o idéntica a un gen de interés. Las sondas y los cebadores pueden tener 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de longitud.

Según se utiliza en la presente memoria, un péptido hace referencia a un polipéptido que es mayor o igual a 2 aminoácidos de longitud, y menor o igual a 40 aminoácidos de longitud.

Según se utilizan en la presente memoria, los aminoácidos que se producen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionados en la presente memoria se identifican de acuerdo con sus abreviaturas conocidas de tres letras o una letra (Tabla 1). Los nucleótidos que se encuentran en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones convencionales de una sola letra utilizadas habitualmente 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 invención, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos naturales, los aminoácidos no naturales y los 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" hace referencia a un aminoácido formado por digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Se supone que los residuos de aminoácidos descritos en la presente memoria están en la forma isómera "L". Los residuos en la forma isomérica "D", que están designados de esta manera, se pueden sustituir por cualquier residuo de L-aminoácido siempre que el polipéptido conserve la propiedad funcional deseada. NH₂ hace referencia al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido. COOH hace referencia al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxilo de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura de polipéptidos convencional descrita en J. Biol. Chem., 243: 3557 - 3559 (1968), y 37 C.F.R. $\square$ §§ 1.821-1.822 adoptada, las abreviaturas para los residuos de aminoácidos se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1 - Tabla de Correspondencia

SÍMBOLO		
1 Letra	3 Letras	AMINOÁCIDO
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina

SÍMBOLO		
1 Letra	3 Letras	AMINOÁCIDO
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	Hls	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

Todas las secuencias de residuos de aminoácidos representadas en la presente memoria por fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional del extremo amino a extremo carboxilo. Además, la expresión "residuo de aminoácido" se define para incluir los aminoácidos enumerados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 1) y aminoácidos modificados e inusuales, tales como los mencionados en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, e incorporados a la presente memoria como referencia. Además, se debe observarse 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 NH₂O o a un grupo carboxilo-terminal tal como COOH.

Según se utiliza en la presente memoria, los "α-aminoácidos naturales" 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. Los aminoácidos no naturales comprenden de ese 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 aminoácidos. Se describen en la presente memoria aminoácidos no naturales ilustrativos 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 lineal o circular de una o dos hebras que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera que no se encuentra en la naturaleza. Existen constructos de ADN como resultado de la manipulación humana, e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.

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 desde la 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 de una o dos hebras de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas del extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen

ARN y ADN, y se pueden aislar a partir 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 moléculas de hebra sencilla o doble donde el contexto lo permite. Cuando el término se aplica a moléculas de doble hebra 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 hebras de un polinucleótido de doble hebra pueden diferir ligeramente en longitud y que sus extremos pueden ser escalonados; por lo tanto, todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido de doble hebra pueden no estar emparejados. Tales extremos desemparejados, en general, no excederán de 20 nucleótidos de longitud.

Según se utiliza en la presente memoria, la "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos hace referencia a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud se puede basar en el grado de identidad y/u homología de las secuencias de residuos y de los residuos contenidos en la misma. 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 para evaluar la similitud de secuencias, dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos están alineadas de una manera que proporciona un nivel máximo de identidad entre las secuencias. "Identidad" hace referencia a la medida en que las secuencias de aminoácidos o nucleótidos son invariantes. El alineamiento de secuencias de aminoácidos y, en cierta medida, de secuencias de nucleótidos, también puede tener en cuenta diferencias conservativas y/o sustituciones frecuentes en aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservativas son las que conservan las propiedades físico-químicas de los residuos involucrados. Los alineamientos pueden ser globales (alineamiento de las secuencias comparadas en toda la longitud de las secuencias e incluyendo todos los residuos) o locales (alineamiento de una porción de las secuencias que incluye sólo la región o regiones más similares).

La "identidad" por sí misma tiene un significado reconocido en la técnica y se puede calcular utilizando técnicas publicadas. (Véase, 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, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). Si bien existen numerosos métodos para medir la identidad entre dos polinucleótidos o polipéptidos, el término "identidad" es bien conocido por los expertos en la técnica (Carrillo, H. & Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988)).

Según se utiliza en la presente memoria, homólogo (con respecto a las secuencias de ácido nucleico y/o aminoácidos) representa una homología de secuencia aproximadamente superior o igual a 25%, típicamente una homología de secuencia mayor o igual a 25%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95%; el porcentaje preciso se puede especificar si es necesario. Para los fines de la presente memoria, los términos "homología" e "identidad" se usan a menudo indistintamente, a menos que se indique lo contrario. En general, para la determinación del porcentaje de homología o identidad, las secuencias se alinean de manera que se obtiene la coincidencia de orden más alto (véase, 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, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Por medio de la homología de secuencia, se determina el número de aminoácidos conservados mediante programas de algoritmos de alineamiento convencionales, y se puede utilizar con las penalizaciones por hueco por defecto establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas hibridarían típicamente a una rigurosidad moderada o una alta rigurosidad 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 hibridante.

Si dos moléculas cualesquiera tienen secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos que son "idénticas" u "homólogas" en al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% se puede determinar utilizando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa "FASTA", utilizando, por ejemplo, los parámetros por defecto como en Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (otros programas incluyen el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul, S.F., et al., J. Mol Biol 215: 403 (1990)); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, y Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Por ejemplo, se puede utilizar la función BLAST de la base de datos del National Center for Biotechnology Information para determinar la identidad. Otros programas comerciales o disponibles públicamente incluyen el programa "MegAlign" de DNASTar (Madison, WI) y el programa "Gap" (Madison WI) de la Universidad de Wisconsin Genetics Computer Group (UWG). El porcentaje de homología o identidad de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico se puede determinar, por ejemplo, comparando la información de las secuencias utilizando un programa informático GAP (p.ej., Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, revisado por Smith y Waterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2: 482). Brevemente, el programa GAP define

similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos), que son similares, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para las identidades y de 0 para las no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribkov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745, como describen Schwartz y Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 por cada hueco y una penalización adicional de 0,10 por cada símbolo en cada hueco; y (3) ninguna penalización por los huecos finales.

Por lo tanto, según se utiliza en la presente memoria, el término "identidad" o "homología" representa una comparación entre un polipéptido de ensayo y un polinucleótido de referencia. Según se utiliza en la presente memoria, "idéntico al menos en 90%" hace referencia a porcentajes de identidad de 90 a 99,99 con respecto a la secuencia del ácido nucleico o de aminoácidos del polipéptido de referencia. La identidad a un nivel de 90% o más es indicativa del hecho de que, suponiendo con fines ilustrativos, que se compara una longitud del polipéptido de ensayo y de referencia de 100 aminoácidos. No más del 10% (es decir, 10 de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de ensayo difiere de los del polipéptido de referencia. Se pueden realizar comparaciones similares entre polinucleótidos de ensayo y de referencia. Tales diferencias se pueden representar como mutaciones puntuales distribuidas aleatoriamente en toda la longitud de un polipéptido o se pueden agrupar en una o más ubicaciones de longitud variable hasta el máximo permitido, p.ej. una diferencia de 10/100 aminoácidos (aproximadamente 90% de identidad). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácidos nucleicos o aminoácidos. A nivel de homologías o identidades superiores a 85-90%, el resultado debe ser independiente de los parámetros del programa y de hueco enunciados; tales altos niveles de identidad se pueden evaluar fácilmente, a menudo mediante alineamiento manual sin depender del soporte lógico.

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

Según se utiliza en la presente memoria, "cebador" hace referencia a una molécula de ácido nucleico que puede actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ADN dirigida por un molde en condiciones apropiadas (p.ej., en presencia de cuatro nucleósidos trifosfato diferentes y un agente de polimerización, tal como una ADN polimerasa, una ARN polimerasa o una 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 3' para su extensión. Se puede utilizar un cebador en una variedad de métodos, incluyendo, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR-transcriptasa inversa (RT), la PCR de ARN, la LCR, la PCR múltiple, la PCR angosta ("Panhandle"), la PCR de captura, la 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" hace referencia a un conjunto de cebadores que incluye un cebador 5' (aguas arriba) que hibrida con el extremo 5' de una secuencia que se va a amplificar (p.ej. mediante PCR) y un cebador 3' (aguas abajo) que hibrida con el complemento del extremo 3' de la secuencia que se va a amplificar.

Según se utiliza en la presente memoria, "hibrida específicamente" hace referencia a la reasociación, mediante emparejamiento de bases complementarias, de una molécula de ácido nucleico (p.ej. un oligonucleótido) a 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 particular. Los parámetros particularmente relevantes para la hibridación in vitro incluyen adicionalmente la temperatura de reasociación y lavado, la composición del tampón y la concentración de sal. Las condiciones de lavado ilustrativas para eliminar las moléculas de ácido nucleico unidas no específicamente a una alta rigurosidad son 0,1 x SSPE, SDS al 0,1%, 65°C y a una rigurosidad media son 0,2 x SSPE, SDS al 0,1%, 50°C. En la técnica se conocen condiciones de restricción equivalentes. El experto en la técnica puede ajustar fácilmente estos parámetros para conseguir una hibridación específica de una molécula de ácido nucleico con una molécula de ácido nucleico diana apropiada para una aplicación particular. Como complemento, cuando se hace referencia a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de hibridar, típicamente con menos del 25%, 15% o 5% de emparejamientos erróneos entre nucleótidos opuestos. Si fuera necesario, se especificaría el porcentaje de complementariedad. Típicamente, las dos moléculas se seleccionan de tal manera que hibriden en condiciones de alta rigurosidad.

Según se utiliza en la presente memoria, sustancialmente idéntico a un producto significa suficientemente similar como para que la propiedad de interés esté lo suficientemente intacta para que el producto sustancialmente idéntico pueda utilizarse 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 tal como entienden los expertos en la técnica relevante.

Según se utiliza en la presente memoria, una variante alélica o una variación alélica hacen referencia a cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede dar como resultado un polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (no hay cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencia de aminoácidos alterada. El término "variante alélica" también se utiliza en la presente memoria para designar una proteína codificada por una variante alélica de un gen. Típicamente, la forma de referencia del gen codifica una forma de tipo salvaje y/o una forma predominante de un polipéptido de una población o único miembro de referencia de una especie. Típicamente, las variantes alélicas, que incluyen variantes entre dos y entre más de dos especies típicamente tienen una identidad de aminoácidos de al menos 80%, 90% o mayor con una forma de tipo salvaje y/o predominante de la misma especie; el grado de identidad depende del gen y de si la comparación es interespecie o intraespecie. Generalmente, las variantes alélicas intraespecie tienen una identidad de al menos 80%, 85%, 90% o 95% o más con una forma de tipo salvaje y/o predominante, incluyendo una identidad de 96%, 97%, 98%, 99% o más con una forma de tipo salvaje y/o predominante de un polipéptido. La referencia a una variante alélica en la presente memoria hace referencia generalmente a variaciones en las proteínas entre los miembros de la misma especie.

Según se utiliza en la presente memoria, "alelo", que se utiliza indistintamente en la presente memoria con "variante alélica" hace referencia a formas alternativas de un gen o porciones del mismo. Los alelos ocupan el mismo locus o posición sobre los 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 solo nucleótido o varios nucleótidos, y pueden incluir modificaciones tales como sustituciones, deleciones e inserciones de nucleótidos. Un alelo de un gen también puede ser una forma de un gen que contiene una mutación.

Según se utilizan en la presente memoria, las variantes de especie hace referencia a variantes en polipéptidos entre especies diferentes, incluyendo diferentes especies de mamíferos, tales como ratón y ser humano. Por ejemplo, para PH20, los ejemplos de variantes de especie proporcionadas en la presente memoria son PH20 de primate, tales como, pero no limitados a, ser humano, chimpancé, macaco y mono cynomologus. Generalmente, las variantes de especie tienen una identidad de secuencia de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, o 98%. Los residuos correspondientes entre dos y entre más de dos variantes de especie se pueden determinar comparando y alineando secuencias para maximizar el número de nucleótidos o residuos coincidentes, por ejemplo, de tal manera que la identidad entre las secuencias sea igual o mayor de 95%, igual o mayor de 96%, igual o mayor de 97%, igual o mayor de 98% o mayor de 99%. A la posición de interés se le otorga a continuación el número asignado en la molécula de ácido nucleico de referencia. El alineamiento se puede efectuar manualmente o a ojo, particularmente, cuando la identidad de secuencia es mayor de 80%.

Según se utiliza en la presente memoria, una proteína humana es una codificada por una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, presente en el genoma de un ser humano, incluyendo todas las variantes alélicas y sus variaciones conservativas. Una variante o modificación de una proteína es una proteína humana si la modificación se basa en el tipo salvaje o en la secuencia prominente de una proteína humana.

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

Según se utiliza en la presente memoria, la modificación hace referencia a la modificación de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico e incluye deleciones, inserciones y sustituciones (p.ej. sustituciones) de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Los ejemplos de las modificaciones son las sustituciones de aminoácidos. Un polipéptido con aminoácidos sustituidos puede presentar una identidad de secuencia de 65%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o más con un polipéptido que no contiene las sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservativas o no conservativas. Generalmente, cualquier modificación de un polipéptido conserva una actividad del polipéptido. Los métodos de modificación de un polipéptido son rutinarios para los expertos en la técnica, por ejemplo utilizando metodologías de ADN recombinante.

Según se utilizan en la presente memoria, las sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden realizar generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, p.ej., Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4ª Edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224). Tales sustituciones se pueden realizar de acuerdo con las que se indican en la TABLA 2 a continuación:

TABLA 2

Residuo original	Sustitución conservativa ilustrativa
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

También son permisibles otras sustituciones y se pueden determinar empíricamente o de acuerdo con las sustituciones conservativas conocidas.

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

10 Según se utiliza en la presente memoria, el polipéptido o proteína o porción biológicamente activa aislada o purificada están sustancialmente exentos de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido de la que deriva la proteína o sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetizan químicamente. Se puede determinar que las preparaciones estén sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables como se determina por métodos convencionales de análisis, tales como cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), utilizados por los expertos en la técnica de evaluación de dicha pureza o lo suficientemente puras como para que una purificación adicional no altere de manera detectable las propiedades físicas y químicas de la sustancia, tales como las actividades enzimáticas y biológicas. Los métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros son conocidos por los expertos en la técnica. Sin embargo, un compuesto sustancialmente químicamente puro puede ser una mezcla de estereoisómeros. En tales casos, una purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

25 Por lo tanto, la referencia a un polipéptido sustancialmente purificado, tal como una PH20 soluble sustancialmente purificada, hace referencia a preparaciones de proteínas que están sustancialmente libres de material celular incluyendo preparaciones de proteínas en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla se produce de forma recombinante. En una realización, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de proteínas no enzimáticas (también referidas en la presente memoria como proteína contaminante), generalmente menos de aproximadamente 20% de proteínas no enzimáticas o 10% de proteínas no enzimáticas o menos de aproximadamente 5% de proteínas no enzimáticas. Cuando la proteína enzimática se produce de forma recombinante, también está sustancialmente exenta de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente o 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína enzimática.

Según se utiliza en la presente memoria, el término sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos incluye preparaciones de proteínas enzimáticas en las que la proteína se separa de los precursores

químicos u otros agentes químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. El término incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco), 20%, 10%, 5% o menos de precursores químicos o agentes químicos o componentes no enzimáticos.

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

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

15 Según se utiliza en la presente memoria descriptiva, vector (o plásmido) hace referencia a elementos discretos que se utilizan para introducir un ácido nucleico heterólogo en células para su expresión o replicación. Los vectores típicamente permanecen como episómicos, pero se pueden diseñar para que efectúen 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.

20 Según se utiliza en la presente memoria, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que está operativamente ligado a secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de tales fragmentos de ADN. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y opcionalmente pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, y similares. Los vectores de expresión derivan
25 generalmente de ADN plasmídico o viral, o pueden contener elementos de ambos. Por lo tanto, un vector de expresión hace referencia a un constructo de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, virus recombinante u otro vector que, tras la introducción en una célula anfitriona apropiada, da como resultado la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen aquellos que son replicables en células eucariotas y/o células procariotas y aquellos que permanecen en
30 estado episomal o aquellos que se integran en el genoma de la célula anfitriona.

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

35 Según se utiliza en la presente memoria, "operablemente" o "unido operativamente" cuando se hace referencia a segmentos de ADN significa que los segmentos están dispuestos de modo que funcionan en conjunto para los fines previstos, *p.ej.* la transcripción se inicia aguas abajo del promotor y aguas arriba de cualquier secuencia transcrita. El promotor es usualmente el dominio al que se une la maquinaria transcripcional para iniciar la transcripción y procede a través del segmento codificante hacia el terminador.

40 Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "evaluación" incluya la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteína, tal como una enzima, o un dominio de la misma, presente en la muestra, y también de obtener un índice, razón, porcentaje, valor visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, las especies químicas realmente detectadas no tienen que ser, por supuesto, el producto enzimáticamente escindido en
45 sí mismo, pero pueden ser, por ejemplo, un derivado del mismo o alguna otra sustancia. Por ejemplo, la detección de un producto de escisión puede ser un radical detectable tal como un radical fluorescente.

50 Según se utiliza en la presente memoria, la actividad biológica hace referencia a las actividades *in vivo* de un compuesto o las respuestas fisiológicas que se producen después de la administración *in vivo* de un compuesto, composición u otra mezcla. La actividad biológica, por tanto, abarca los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de tales compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas se pueden observar en sistemas *in vitro* diseñados para someter a ensayo o utilizar tales actividades. Por lo tanto, para los fines de la
55 presente memoria, una actividad biológica de una enzima hialuronidasa es su degradación del ácido hialurónico. En otros ejemplos, una actividad biológica de un agente terapéutico de la HBP incluye su mecanismo de acción y su reducción de uno o más síntomas asociados con la HBP.

60 Según se utiliza en la presente memoria, equivalente, cuando hace referencia a dos secuencias de ácidos nucleicos, significa que las dos secuencias en cuestión codifican la misma secuencia de aminoácidos o proteínas equivalentes. Cuando se utiliza equivalente para referirse a dos proteínas o péptidos, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos con sólo sustituciones de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad o función de la proteína o péptido. Cuando equivalente hace referencia a una propiedad, no es necesario que la propiedad esté presente en la misma medida (*p.ej.*, dos péptidos pueden

presentar diferentes velocidades del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades son usualmente sustancialmente las mismas.

Según se utiliza en la presente memoria, "modular" y "modulación" o "alterar" hacen referencia 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, una actividad reguladora al alza o agonista), una disminución de la actividad (es decir, una regulación a la baja o inhibición) o cualquier otra alteración de una actividad (tal como un cambio de periodicidad, frecuencia, duración, cinética u otro parámetro). La modulación puede depender del contexto y típicamente la modulación se compara con un estado designado, por ejemplo, la proteína de tipo salvaje, la proteína en estado constitutivo o la proteína tal como se expresa en un tipo de célula o condición designados.

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

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

Según se utiliza en la presente memoria, "enfermedad o trastorno" hace referencia a un estado patológico en un organismo resultante de una causa o afección que incluye, pero no se limita a, infecciones, afecciones adquiridas, condiciones genéticas y caracterizadas por síntomas identificables.

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

Según se utiliza en la presente memoria, tratamiento significa cualquier forma en la que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad u otra indicación, se mejoran o se alteran de otro modo beneficiosamente.

Según se utiliza en la presente memoria, un agente terapéutico hace referencia a cualquier agente que sea capaz de proporcionar un efecto terapéutico cuando se administra a un sujeto. Por ejemplo, para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata, un agente terapéutico es cualquier agente que produce la reducción del volumen, el crecimiento o el tamaño de la próstata y, en algunos casos, la reducción de la próstata.

Según se utiliza en la presente memoria, el agente o fármaco hidrófobo es un agente que no se absorbe o disuelve fácilmente en agua u otra disolución acuosa, y que generalmente no es soluble en soluciones acuosas. En la técnica se conocen varios métodos para determinar el carácter hidrófobo de un fármaco o agente (Wasik et al. (1981) NBS Techn. Rep., 81: S1 - 56; Sangster J. A Databank of evaluated octanol-water partition coefficients (LogP), logkow.cisti.nrc.ca/logkow/). Por ejemplo, se puede determinar el coeficiente de reparto de octanol/agua ($\log P_{o/w}$) que es una razón de la concentración en equilibrio de una sustancia disuelta en un sistema bifásico, formado por dos disolventes no miscibles (agua y un disolvente hidrófobo tal como octanol). Esto se puede realizar utilizando la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Según se utiliza en la presente memoria, un agente o fármaco hidrófilo es un agente que se puede absorber o disolver fácilmente en agua u otra disolución acuosa. También se puede utilizar una medición del coeficiente de reparto como se ha descrito anteriormente para medir cuán hidrófilo es un fármaco o agente.

Según se utiliza en la presente memoria, efecto terapéutico significa un efecto resultante del tratamiento de un sujeto que altera, típicamente mejora o alivia los síntomas de una enfermedad o afección o que cura una enfermedad o afección. Una cantidad terapéuticamente eficaz hace referencia a la cantidad de una composición, molécula o compuesto que da como resultado un efecto terapéutico después de la administración a un sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz es la dosificación suficiente para reducir uno o más síntomas de HBP en un sujeto durante al menos una semana, más preferiblemente un mes y lo más preferiblemente de 6 a 8 meses o más. Los indicadores de mejoría o tratamiento exitoso incluyen la reducción en el tamaño del tejido prostático obstructivo y el alivio de los síntomas de obstrucción urinaria.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" hace referencia a un animal, incluyendo un mamífero, tal como un ser humano.

Según se utiliza en la presente memoria, un paciente hace referencia a un sujeto humano que presenta síntomas de

una enfermedad o trastorno.

Según se utiliza en la presente memoria, el alivio de los síntomas de una enfermedad o trastorno particulares mediante un tratamiento, tal como mediante la administración de una composición farmacéutica u otro agente terapéutico, hace referencia a cualquier disminución, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria de los síntomas que puede ser atribuida a, o asociada con, la administración de la composición o agente terapéutico.

Según se utiliza en la presente memoria, la prevención o profilaxis hace referencia a métodos en los que se reduce el riesgo de desarrollar una enfermedad o afección.

Según se utiliza en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "dosis terapéuticamente eficaz" hacen referencia a la cantidad de un agente, compuesto, material o composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Por lo tanto, es la cantidad necesaria para prevenir, curar, aliviar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.

Según se utiliza en la presente memoria, la forma de dosis unitaria hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y envasadas individualmente como se conoce en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, una formulación de dosificación única hace referencia a una formulación para la administración directa.

Según se utiliza en la presente memoria, un "artículo de fabricación" es un producto que se elabora y vende. Según se utiliza a lo largo de esta solicitud, se pretende que el término abarque una hialuronidasa, p.ej. una PH20 soluble, y uno o más un antiandrógeno, un agente bloqueador alfa y una toxina botulínica contenidos en el mismo artículo o en artículos de envasado separados.

Según se utiliza en la presente memoria, el fluido hace referencia a cualquier composición que pueda fluir. Por lo tanto, los fluidos abarcan composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones de este tipo.

Según se utiliza en la presente memoria, un "kit" hace referencia a una combinación de composiciones proporcionada en la presente memoria y otro artículo con un propósito que incluye, pero no se limita a, la reconstitución, activación y aparatos/dispositivos para el suministro, diagnóstico y evaluación de una actividad biológica o propiedad. Los kits incluyen opcionalmente instrucciones de uso.

Según se utiliza en la presente memoria, un extracto o producto lisado celular hacen referencia a una preparación o fracción que se elabora a partir de una célula lisada o desorganizada.

Según se utiliza en la presente memoria, animal incluye cualquier animal, tal como, pero no limitado a, primates incluyendo seres humanos, gorilas y monos; roedores, tales como ratones y ratas; aves, tales como pollos; rumiantes, tales como cabras, vacas, ciervos, ovejas; cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen a los seres humanos como animal contemplado. Las hialuronidasas proporcionadas en la presente memoria son de cualquier fuente, animal, vegetal, procariótico y fúngico. La mayoría de las hialuronidasas son de origen animal, incluyendo el origen de mamíferos. Generalmente las hialuronidasas son de origen humano.

Según se utiliza en la presente memoria, un control hace referencia 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 también puede ser un control interno.

Según se utiliza en la presente memoria, una enfermedad, trastorno o afección asociados a hialuronano hacen referencia a cualquier enfermedad o afección en la que los niveles de hialuronano se elevan como causa, consecuencia u observado de otro modo en la enfermedad o afección. Las enfermedades y afecciones asociadas a hialuronano están asociadas con una elevada expresión de hialuronano en un tejido o célula, un aumento de la presión del líquido intersticial, una disminución del volumen vascular y/o un aumento del contenido de agua en un tejido. Las enfermedades y afecciones asociadas a hialuronano ilustrativas incluyen enfermedades y afecciones asociadas con una presión elevada de líquido intersticial, una disminución del volumen vascular y/o un aumento del contenido de agua en un tejido, incluyendo cánceres, presión de disco y edema. En un ejemplo, el tratamiento de la afección, enfermedad o trastorno asociados a hialuronano incluye el alivio, la reducción u otro efecto beneficioso en uno o más del aumento de la presión del líquido intersticial (PLI), disminución del volumen vascular y aumento del contenido de agua en un tejido.

Según se utiliza en la presente memoria, "tratar" a un sujeto con una enfermedad o condición significa que los síntomas del sujeto se alivian parcial o totalmente o permanecen estáticos después del tratamiento. Por lo tanto, el

tratamiento abarca la profilaxis, la terapia y/o la curación. La profilaxis hace referencia a la prevención de una enfermedad potencial y/o a la prevención del empeoramiento de los síntomas o la progresión de una enfermedad. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de un interferón modificado y composiciones proporcionadas en la presente memoria.

5 Según se utiliza en la presente memoria, la "Hiperplasia Prostática Benigna" (HBP) hace referencia a una enfermedad o afección de la glándula en donde la próstata se agranda o muestra hiperplasia y que no es una enfermedad o afección maligna.

10 Según se utiliza en la presente memoria, la referencia a un agente que es adecuado para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata hace referencia a cualquier agente que efectúa una reducción en el volumen o crecimiento de la próstata cuando se administra a un sujeto y en algunos casos afecta a la contracción de la próstata. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, antiandrógenos, bloqueadores alfa, toxinas botulínicas. Tales agentes son bien conocidos por un experto en la técnica. Se describen en la presente memoria agentes ilustrativos.

15 Según se utiliza en la presente memoria, "antiandrógeno" hace referencia a una clase amplia de agentes que ejercen su efecto ya sea interfiriendo en la unión de andrógenos al receptor de andrógeno ya sea interfiriendo en la producción de andrógenos. Los antiandrógenos que actúan a través del receptor de andrógeno se clasifican como antiandrógenos esteroides o no esteroides basándose en su estructura química. Los antiandrógenos esteroides tienen la estructura de un esteroide, es decir, son hidrocarburos tetracíclicos compuestos por tres anillos de ciclohexano y un anillo de ciclopentano. Los antiandrógenos no esteroides no tienen la estructura química de un esteroide. Un ejemplo de un antiandrógeno que interfiere en la producción de andrógenos es un inhibidor de la 5 α -reductasa.

25 Según se utiliza en la presente memoria, "agente bloqueador alfa" hace referencia a un agente que interfiere en o impide la estimulación de los adrenorreceptores alfa1 y actúa para relajar el tejido del músculo liso que se encuentra en la próstata y el cuello de la vejiga, permitiendo que la orina fluya fuera de la vejiga más fácilmente.

30 Según se utiliza en la presente memoria, "inhibidor de la 5 α -reductasa" hace referencia a un agente que inhibe la enzima 5 α -reductasa de manera que la testosterona no se convierte en 5 α -dihidrotestosterona.

35 Según se utiliza en la presente memoria, "toxina botulínica" hace referencia a la neurotoxina producida por Clostridium botulinum; la toxina botulínica (o la cadena ligera o la cadena pesada) elaborada recombinantemente por una especie no Clostridial; los serotipos A, B, C, D, E, F y G de la toxina botulínica; un complejo de toxina botulínica (los complejos de 300, 600 y 900 kDa); una toxina botulínica modificada, toxina botulínica PEGilada, toxina botulínica quimérica, toxina botulínica recombinante, toxina botulínica híbrida y toxina botulínica modificada químicamente. Una toxina de botulismo modificada es una toxina de botulismo que tiene al menos uno de sus aminoácidos eliminado, modificado o reemplazado, en comparación con una toxina botulínica nativa. Una toxina botulínica modificada puede ser una neurotoxina producida de forma recombinante, o un derivado o fragmento de una neurotoxina producida de forma recombinante. Una toxina botulínica modificada conserva al menos una actividad biológica de la toxina botulínica nativa.

45 Según se utiliza en la presente memoria, "intraprostáticamente" hace referencia a directamente a la próstata mediante inyección o infusión e incluye, pero no se limita a, la administración transuretral, transperineal y transrectal.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "liberación prolongada o sostenida" o "formulación de liberación controlada" hacen referencia a la formulación de una composición farmacéutica de uno o más agentes terapéuticos que después de la inyección localizada en la próstata permite que el agente o agentes terapéuticos sean liberados de la composición farmacéutica, con el fin de contactar con células y tejidos circundantes, durante un período de tiempo, en oposición a todo a la vez, entre 1 día y aproximadamente 1 año. Los agentes terapéuticos se suministran así a las células de la próstata y a las células y tejidos circundantes durante un período de tiempo (horas, días, semanas, meses) en lugar de inmediatamente. Las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, vesículas lipídicas que incluyen vesículas unilamelares (VUL) y vesículas multilamelares (VML), complejos de fármaco-resina (resinatos) y formulaciones de depósito.

55 Según se utiliza en la presente memoria, "enzima hidrolítica" hace referencia a enzimas hidrolíticas que se pueden utilizar para digerir o disolver el tejido prostático, incluyendo pero sin limitarse a, colagenasa, hialuronidasa, tripsina, quimotripsina, pronasa, elastasa, ADNasa I, dispasa, plasmina, bromelina, clostripaína, termolisina, neuraminidasa, fosfolipasa, colesterol esterasa, subtilisina, papaína, quimopapaína, activador de plasminógeno, estreptoquinasa, uroquinasa, fibrinolisisina, serratiopeptidasa, pancreatina, amilasa, lisozima, catepsina G y las serina proteasas de leucocitos PMN.

60 Según se utiliza en la presente memoria, "actividad total" hace referencia a la actividad enzimática del agente activo, por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano, que está encapsulada dentro del liposoma.

Según se utiliza en la presente memoria, "liposoma multivesicular" o "vesícula de membrana lipídica" o "liposoma" hacen referencia a vesículas lipídicas microscópicas elaboradas por el hombre que contienen membranas lipídicas que encierran múltiples cámaras acuosas no concéntricas. Un liposoma multivesicular, tal como se utiliza en la presente memoria, es una emulsión de agua en aceite en agua (w/o/w).

Según se utiliza en la presente memoria, "disolvente orgánico volátil" hace referencia a un disolvente orgánico que se evapora fácilmente. Los ejemplos de disolventes orgánicos volátiles incluyen, pero no se limitan a éteres, éteres halogenados, hidrocarburos, ésteres, hidrocarburos halogenados o Freones, por ejemplo, éter dietílico, isopropilo y otros éteres, cloroformo, tetrahidrofurano, acetato de etilo, Forane y combinaciones de los mismos.

Según se utiliza en la presente memoria, "lípidos neutros" hace referencia a un aceite o grasa que no tiene capacidad de formación de membrana por sí mismo y carece de un grupo con "cabeza" hidrófilo. Los ejemplos de lípidos neutros incluyen diglicéridos, tales como dioleína, dipalmitoleína; ésteres de propilenglicol tales como diésteres mixtos de ácidos caprílico/cáprico sobre propilenglicol; triglicéridos tales como trioleína, tripalmitoleína, trilinoleína, tricaprilina y trilaurina; aceites vegetales, tales como aceite de soja; manteca de cerdo o grasa de ternera; escualeno; tocoferol; y combinaciones de los mismos. Los lípidos neutros incluyen tanto lípidos neutros de liberación lenta como lípidos neutros de liberación rápida. Los lípidos neutros de liberación lenta incluyen, por ejemplo, trioleína, tripalmitoleína, trimiristoleína, trilaurina y tricaprina. Los lípidos neutros de liberación rápida incluyen, por ejemplo, tricaprilina y tricaproína y mezclas de las mismas.

Según se utiliza en la presente memoria, "lípidos anfipáticos" hace referencia a una molécula que tiene un grupo de "cabeza" hidrófilo y un grupo de "cola" hidrofóbico y tiene capacidad de formación de membrana. Los lípidos anfipáticos incluyen aquellos con carga neta negativa, carga neta cero y carga neta positiva a pH 7,4, incluyendo lípidos zwitteriónicos, ácidos o catiónicos. Tales lípidos anfipáticos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), fosfatidilserina (PS), ácido fosfatídico (AP), fosfatidilinositol, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomielina, diaciltrimetilamoniopropano (DITAP) y combinaciones de los mismos.

Según se utiliza en la presente memoria, "lípidos anfipáticos de cadena larga" hace referencia a un lípidos anfipático que tiene un mayor número de carbonos en la cadena de carbono, incluyendo pero no limitado a DOPC o DC18:1PC = 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina ; DLPC o DC12:0PC = 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfolina; DMPC o DC14:0PC = 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina; DPPC o DC16:0PC = 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina; DSPC o DC18:0PC = 1,2-diesteroil-sn-glicero-3-fosfolina; DAPC o DC20:0PC = 1,2-diaracidoil-sn-glicero-3-fosfolina; DBPC o DC22:0PC = 1,2-dibehenoil-sn-glicero-3-fosfolina; DC16:1PC = 1,2-dipalmitoleoil-sn-glicero-3-fosfolina; DC20:1PC = 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfolina; DC22:1PC = 1,2-dierucoil-sn-glicero-3-fosfolina; DPPG = 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol; DOPG = 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol. Típicamente, el uso de un lípidos anfipático de cadena larga aumentará la eficacia de encapsulación de la formulación liposomal.

Según se utiliza en la presente memoria, "ácido hialurónico" o "HA" hace referencia a un glicosaminoglicano no sulfatado que está ampliamente distribuido a lo largo de tejidos conectivos, epiteliales y neurales. Es un polímero de hasta 25.000 unidades disacáridas, compuestas a su vez por ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina. El peso molecular del HA oscila entre aproximadamente 5 kDa y 20.000 kDa. Los oligómeros de ácido hialurónico utilizados en la presente memoria son fragmentos de ácido hialurónico.

Según se utiliza en la presente memoria, "estable" o "estabilidad" con referencia a una enzima de degradación de hialuronano o composición que contiene una enzima de degradación de hialuronano significa que la enzima de degradación de hialuronano conserva al menos un nivel requerido de su actividad de al menos 50% de la actividad de degradación de hialuronano en condiciones definidas, por ejemplo, condiciones de temperatura de temperaturas bajas o refrigeradas de 2°C a 8°C, temperaturas ambiente de 20°C a 30°C o temperaturas elevadas de 32°C a 40°C durante un período de tiempo superior a 6 meses. Por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano conserva al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o más de su actividad a una temperatura de 2°C a 8°C, 20°C a 30°C o 32°C a 40°C durante un período de tiempo superior a 6 meses.

Según se utiliza en la presente memoria, "agente activo" o "agente biológicamente activo" cuando se utiliza para describir agentes presentes en las cámaras del liposoma multivesicular o en la solución acuosa utilizada durante la fabricación de liposomas, incluye agentes que poseen una actividad biológica deseada, incluyendo, pero no limitada a, enzimas, fármacos y profármacos, moléculas pequeñas y proteínas de degradación de hialuronanos.

Según se utiliza en la presente memoria, "osmolaridad" hace referencia a la suma de las concentraciones molares de los solutos presentes en la solución acuosa, incluyendo cualquier excipiente añadido.

Según se utiliza en la presente memoria, un "excipiente" hace referencia a cualquier molécula, agente o compuesto que mantiene o potencia la estabilidad de una enzima de degradación de hialuronano, o modula (aumenta) la eficacia de encapsulación de la enzima de degradación de hialuronano. Los excipientes son conocidos por los

expertos en la técnica o se pueden determinar empíricamente. En la presente memoria se describen excipientes ilustrativos.

Según se utiliza en la presente memoria, "excipiente osmótico" hace referencia a una molécula de soluto biológicamente compatible en una solución acuosa que no es el agente biológicamente activo. Se puede utilizar un excipiente osmótico para alterar la osmolaridad del componente acuoso en el que se disuelve el agente activo para la encapsulación. Tanto los electrolitos como los no electrolitos funcionan como excipientes osmóticos. Cuando se determina si alguna molécula particular funcionará como un excipiente osmótico o cuando se determina la concentración de un excipiente osmótico en una solución, por ejemplo, una encapsulada en un liposoma multivesicular, se debe considerar si, en las condiciones dentro de la solución, por ejemplo, el pH, la molécula está parcial o totalmente ionizada. Los excipientes osmóticos incluyen aquellos que pueden facilitar la actividad del agente activo. Los excipientes osmóticos que se pueden utilizar para formar liposomas multivesiculares y para modular la carga de fármaco del agente encapsulado a partir de liposomas multivesiculares incluyen, pero no se limitan a, glucosa, sacarosa, trehalosa, succinato, glicilglicina, ácido glucónico, ciclodextrina, arginina, galactosa, manosa, maltosa, manitol, glicina, lisina, citrato, sorbitol, dextrano y combinaciones de los mismos.

Según se utiliza en la presente memoria, "estabilizador" hace referencia a un excipiente, que cuando se añade a un liposoma multivesicular, estabiliza el agente activo.

Según se utiliza en la presente memoria, "gel de depósito" o "formulación de depósito" hace referencia a una formulación en gel que permite la liberación sostenida de un agente activo. Generalmente, el gel es un hidrogel, un gel que contiene una cantidad sustancial de agua, es biocompatible y el gel es biodegradable. Los materiales formadores de gel incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos tales como alginato y formas modificadas de los mismos, otros precursores de hidrogel poliméricos incluyen polímeros de bloque de óxido de polietileno-polipropilenglicol tales como Pluronic® o Tetronics®.

Según se utiliza en la presente memoria, "eficacia de encapsulación" o "encapsulación porcentual" hace referencia a la razón de la cantidad de compuesto que se va a encapsular en la suspensión final del liposoma con respecto a la cantidad total de compuesto que se va a encapsular utilizado en la primera solución acuosa del proceso multiplicada por 100.

Según se utiliza en la presente memoria, "capacidad de carga de fármaco" hace referencia a la cantidad del agente activo, *es decir*, la enzima de degradación de hialuronano, cargada en la suspensión de liposomas del producto. La capacidad de carga de fármaco es una medida de la cantidad de agente activo disponible en un volumen unitario de formulación de liposomas y es la razón de fármaco encapsulado por unidad de volumen de suspensión de liposomas con respecto al porcentaje de volumen encapsulado en los propios liposomas. Es aproximadamente igual a la concentración del agente activo en la suspensión dividida por el lipocrito de la suspensión para el bajo porcentaje de fármaco libre.

Según se utiliza en la presente memoria, "lipocrito" hace referencia a la razón de volumen ocupado por los liposomas con respecto al volumen de suspensión total multiplicado por 100.

Según se utiliza en la presente memoria, "porcentaje de fármaco libre" hace referencia a la razón de la cantidad de fármaco exterior a los liposomas en la suspensión de liposomas final con respecto a la cantidad total de fármaco en la suspensión final multiplicada por 100.

Según se utiliza en la presente memoria, "otros agentes útiles para tratar la HBP" hace referencia a agentes distintos de los antiandrógenos, agentes bloqueadores alfa y toxina botulínica.

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

Según se utilizan en la presente memoria, los intervalos y las cantidades se pueden expresar como "aproximadamente" un valor o intervalo particular. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto, "aproximadamente 5 bases" significa "aproximadamente 5 bases" y también "5 bases".

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

Según se utilizan en la presente memoria, las abreviaturas para cualquier grupo protector, aminoácido y otros compuestos, a menos que se indique lo contrario, están de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas, o

la Comisión IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica (véase (1972) Biochem. 11:1726).

B. DESCRIPCIÓN GENERAL - HIALURONANO (HA) ACUMULADO EN LA ENFERMEDAD E HIDRÓLISIS DEL MISMO

En la presente memoria, se proporcionan composiciones que contienen formulaciones de liberación sostenida, tales como formulaciones de lípidos, de una enzima de degradación de hialuronano. Las enzimas de degradación de hialuronano se pueden utilizar en métodos de tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas a hialuronano (HA) en las que los niveles elevados o acumulados de hialuronano son una causa o están asociados de otra manera con la enfermedad o afección. Se encuentra, sin embargo, que un problema con el uso de enzimas de degradación de hialuronano para degradar el HA en sitios de tejido locales es que, una vez administradas, las enzimas de degradación de hialuronano desaparecen rápidamente. Por el contrario, las células que producen HA se regeneran cada 3 a 10 días. Por lo tanto, se encuentra en la presente memoria que la liberación sostenida o controlada de una enzima de degradación de hialuronano se puede utilizar para proporcionar una fuente continua o persistente de enzima para degradar el HA en sitios locales, por ejemplo en las células del estroma de la próstata, para proporcionar una hidrólisis focal prolongada del HA. Por lo tanto, como se describe en la presente memoria, las formulaciones de liberación sostenida de una enzima de degradación de hialuronano se pueden proporcionar para promover la localización de la enzima, para proporcionar una alta concentración de enzima en el sitio diana, p.ej. glándula prostática, y/o para proporcionar una liberación prolongada de la enzima en el sitio diana.

En particular, la acumulación de hialuronano (HA) en el estroma es una característica de la HBP. Por lo tanto, las composiciones que contienen formulaciones de liberación sostenida, y combinaciones de las mismas, son útiles para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata (HBP), en particular en hombres con una próstata agrandada. Se encuentra en la presente memoria que las enzimas de degradación de hialuronano, *p.ej.*, las hialuronidasas, cuando se suministran a la glándula prostática hipertrofiada, degradan el ácido hialurónico que se acumula en el estroma de la glándula hipertrofiada y provocan la apoptosis de las células presentes en el estroma de la glándula. El agotamiento del HA en el estroma da como resultado la apoptosis selectiva de las células del estroma que son estimuladas por la testosterona, mientras que las células normales del estroma no se ven afectadas. La apoptosis de las células estromales detiene la expansión del estroma y produce la contracción de la próstata y reduce o detiene la progresión de la HBP. Por lo tanto, la exposición de la glándula prostática hipertrofiada a hialuronidasa da como resultado una disminución en el tamaño de la glándula hipertrofiada y una inhibición de la proliferación adicional. En particular, el efecto de las enzimas de degradación de hialuronano es selectivo para las células del estroma estimuladas por la testosterona, y no provoca la apoptosis de la célula epitelial que podría dar lugar a resultados indeseables como la disfunción orgánica. Por lo tanto, el uso de enzimas de degradación de hialuronano es seguro y no está asociado con efectos secundarios relacionados con los tejidos.

Para el tratamiento de la HBP, las formulaciones de liberación sostenida que contienen una enzima de degradación de hialuronano, tal como hialuronidasa, pueden inyectarse directamente en la glándula prostática. La composición enzimática de degradación de hialuronano se puede formular como depósito para ser liberada durante un periodo de tiempo prolongado una vez introducido en la próstata. Tales métodos de administración son beneficiosos ya que reducen los efectos secundarios al minimizar la exposición de tejidos y órganos distintos de la próstata a estos agentes, permiten a los agentes terapéuticos alcanzar una alta concentración local y prolongar el tiempo que la próstata y las células y tejidos circundantes están expuestos a los agentes terapéuticos.

El uso de enzimas de degradación de hialuronano representa un método previamente no reconocido para tratar la HBP. Este efecto de las enzimas de degradación de hialuronano en la próstata hipertrofiada es distinto de su uso como agente dispersante. Por ejemplo, los usos conocidos de las enzimas de degradación de hialuronano incluyen el uso como agentes dispersantes para potenciar el efecto de un agente terapéutico facilitando el acceso del agente terapéutico a su diana.

El tratamiento de la HBP con enzimas de degradación de hialuronano muestra propiedades eficaces que no muestran los tratamientos existentes de la HBP. Por ejemplo, los tratamientos existentes que utilizan bloqueadores alfa o inhibidores de la 5-alfa-reductasa tienen limitaciones. Si bien los bloqueadores alfa, como la finasterida, alivian los síntomas, no reducen el tamaño de la próstata o la progresión del impacto. Además, aunque los inhibidores de la 5-alfa-reductasa reducen la próstata, pueden tardar más de 6 meses en funcionar, los pacientes pueden llegar a ser refractarios y los efectos secundarios sexuales son comunes. Adicionalmente, otros métodos de tratamiento de la HBP que implican cirugía, como la resección transuretral de la próstata (RTUP) u otras intervenciones quirúrgicas, están asociados con efectos secundarios no deseados que pueden incluir, por ejemplo, la eyaculación retrógrada, la infección y el estrechamiento uretral. Por el contrario, el tratamiento de la HBP con enzimas de degradación de hialuronano, por ejemplo hialuronidasa tal como PH20, da como resultado una reducción rápida del volumen prostático, sin efectos sexuales secundarios y sin efectos secundarios asociados con la cirugía.

En algunos ejemplos, la composición o las formulaciones que contienen una enzima de degradación de hialuronano se pueden combinar en tratamientos combinados con uno o más agentes distintos útiles para el tratamiento de la

hiperplasia benigna de próstata. Tales otros agentes incluyen, pero no se limitan a, antiandrógenos, agentes bloqueadores alfa, toxina botulínica y cualquier otro tipo de agente útil para el tratamiento de la HBP. Los otros agentes se pueden administrar por separado o se pueden coadministrar en una formulación de liberación sostenida con una enzima de degradación de hialuronano. La combinación de hialuronidasa como agente terapéutico para la HBP y otros agentes terapéuticos de la HBP complementarios puede dar como resultado una mejor capacidad para reducir el tamaño de la glándula hipertrofiada durante un período de tiempo prolongado, alcanzando potencialmente de ese modo un mayor efecto terapéutico que el observado cuando se utiliza un agente terapéutico solo.

Las secciones siguientes proporcionan una descripción no limitante de las enzimas de degradación de hialuronano, las formulaciones de liberación sostenida, los tratamientos combinados y el método y los usos de éstos, por ejemplo, para tratar la HBP.

C. ENZIMAS DE DEGRADACIÓN DE HIALURONANO

Se proporcionan en la presente memoria composiciones y formulaciones que contienen enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo formulaciones de liberación sostenida o controlada. Las composiciones que contienen formulaciones de liberación sostenida se pueden utilizar en inyecciones locales para evitar la acumulación de HA asociada con la enfermedad. Por ejemplo, tales composiciones y formulaciones se pueden utilizar en métodos para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata degradando el HA asociado al estroma. Las enzimas de degradación de hialuronano, tales como hialuronidasas, pueden ser utilizadas como agentes terapéuticos para la HBP para reducir el tamaño del tejido prostático hipertrofiado y también para prevenir una proliferación adicional.

El hialuronano, también llamado ácido hialurónico o hialuronato, es un glicosaminoglicano no sulfatado que está ampliamente distribuido a lo largo de los tejidos conectivos, epiteliales y neurales. El hialuronano es un componente esencial de la matriz extracelular y un componente importante de la barrera intersticial. Mediante la catálisis de la hidrólisis del hialuronano, las enzimas de degradación de hialuronano disminuyen la viscosidad del hialuronano, aumentando así la permeabilidad del tejido y aumentando la tasa de absorción de los fluidos administrados por vía parenteral. Como tales, las enzimas de degradación de hialuronano, tales como las hialuronidasas, se han utilizado, por ejemplo, como agentes de propagación o dispersión junto con otros agentes, fármacos y proteínas para mejorar su dispersión y suministro. Las enzimas que degradan el hialuronano también se utilizan como coadyuvantes para aumentar la absorción y dispersión de otros fármacos inyectados, para la hipodermoclastia (administración subcutánea de fluidos) y como un complemento en la urografía subcutánea para mejorar la reabsorción de agentes radiopacos. Las enzimas que degradan el hialuronano, por ejemplo, la hialuronidasa, se pueden utilizar en aplicaciones de procedimientos oftálmicos, por ejemplo, bloqueo peribulbar y sub-Tenon en anestesia local antes de la cirugía oftálmica. La hialuronidasa también se puede utilizar en otros usos terapéuticos y cosméticos, por ejemplo, promoviendo la acinesia en la cirugía estética, tales como las blefaroplastias y las elevaciones faciales.

Las enzimas de degradación de hialuronano actúan para degradar el hialuronano mediante la escisión de los polímeros de hialuronano, que están compuestos por unidades repetitivas de disacáridos, ácido D-glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidos entre sí por enlaces glucosídicos β -1 $\rightarrow$ 4 y β -1 $\rightarrow$ 3. Las cadenas de hialuronano pueden alcanzar aproximadamente 25.000 repeticiones de disacáridos o más de longitud y los polímeros de hialuronano pueden tener un tamaño que varía de aproximadamente 5.000 a 20.000.000 Da *in vivo*. Por consiguiente, las enzimas de degradación de hialuronano en las formulaciones de la presente memoria incluyen cualquier enzima que tenga la capacidad de catalizar la escisión de una cadena o polímero de disacárido de hialuronano. En algunos ejemplos, la enzima de degradación de hialuronano escinde el enlace glucosídico β -1 $\rightarrow$ 4 en la cadena o polímero de hialuronano. En otros ejemplos, la enzima de degradación de hialuronano cataliza la escisión del enlace glucosídico β -1 $\rightarrow$ 3 en la cadena o polímero de hialuronano.

Las enzimas de degradación de hialuronano para su uso en las formulaciones, métodos y combinaciones de la presente memoria incluyen, por ejemplo, hialuronidasas y condroidasas, y formas solubles de las mismas que carecen de todo o una parte de un ancla a GPI y son secretadas a partir de células. A continuación se proporciona una descripción de varias enzimas de degradación de hialuronano. Se entiende que cualquier enzima de degradación de hialuronano que degrada o escinde HA, y en particular cualquiera que degrada el ácido hialurónico que se acumula en el estroma de la glándula prostática hipertrofiada, se puede utilizar en las formulaciones y métodos de la presente memoria. En particular, la enzima de degradación de hialuronano es una PH20, tal como una PH20 humana y en particular una PH20 truncada en el extremo C-terminal. Cuando los métodos y usos proporcionados en la presente memoria describen el uso de una hialuronidasa soluble, en consecuencia cualquier enzima de degradación de hialuronano, generalmente se puede utilizar una enzima de degradación de hialuronano soluble. Se entiende que cualquier hialuronidasa se puede utilizar en los métodos y usos proporcionados en la presente memoria (véanse, p.ej., las Publicaciones de Estados Unidos Núm. US20040268425 y US20100143457).

En particular, la enzima de degradación de hialuronano es una enzima soluble que se secreta de las células tras la expresión. Por ejemplo, las enzimas ilustrativas de degradación de hialuronano proporcionadas en la presente memoria contienen truncamientos C-terminales para eliminar toda o parte del ancla a GPI. En ejemplos particulares,

la enzima de degradación de hialuronano es una enzima PH20. La enzima de degradación de hialuronano también se puede modificar adicionalmente, por ejemplo, para prolongar adicionalmente su semivida.

Típicamente, para su uso en las composiciones, formulaciones, combinaciones y métodos de la presente memoria, se utiliza una enzima de degradación de hialuronano humano soluble, tal como PH20 humana soluble. Aunque se pueden utilizar enzimas de degradación de hialuronano, tales como PH20, de otros animales, tales preparaciones son potencialmente inmunogénicas, ya que son proteínas animales. Por ejemplo, una proporción significativa de pacientes manifiestan una sensibilización previa secundaria a los alimentos ingeridos, y como éstos son proteínas animales, todos los pacientes tienen un riesgo de sensibilización posterior. Por lo tanto, las preparaciones no humanas pueden no ser adecuadas para uso crónico. Si se desean preparaciones no humanas, se contempla en la presente memoria que tales polipéptidos se pueden preparar para que tengan una inmunogenicidad reducida. Tales modificaciones están dentro del nivel de un experto en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, la eliminación y/o la sustitución de uno o más epítopos antigénicos sobre la molécula.

Las enzimas de degradación del hialuronano, incluidas las hialuronidasas (*p.ej.* PH20), utilizadas en los métodos de la presente memoria se pueden de forma recombinante o se pueden purificar o purificar parcialmente a partir de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, a partir de extractos de testículos. En la presente memoria se proporcionan métodos para la producción de proteínas recombinantes, incluyendo enzimas de degradación de hialuronano recombinantes, y son bien conocidos en la técnica.

Si se requiere glicosilación de una hialuronidasa para la actividad, generalmente se producen enzimas de degradación de hialuronano utilizando sistemas de expresión de proteínas que facilitan la N-glicosilación correcta para asegurar que el polipéptido conserva la actividad. Por ejemplo, la glicosilación es importante para la actividad catalítica y la estabilidad de las hialuronidasas tales como PH20 humana. Tales células incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) (*p.ej.* células CHO DG44).

1. Hialuronidasas

Las hialuronidasas son miembros de una gran familia de enzimas de degradación de hialuronano. Existen tres clases generales de hialuronidasas: hialuronidasas de tipo mamífero, hialuronidasas bacterianas e hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Tales enzimas se pueden utilizar en las composiciones, formulaciones, combinaciones y métodos proporcionados.

a. Hialuronidasas de tipo mamífero

Las hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35) son *endo-β-N*-acetil-hexosaminidasas que hidrolizan el enlace glucosídico β-1→4 del hialuronano en varias longitudes de oligosacáridos tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. Estas enzimas tienen actividades tanto hidrolíticas como transglicosidasa, y pueden degradar hialuronano y sulfatos de condroitina (CS), generalmente C4-S y C6-S. Las hialuronidasas de este tipo incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas de vaca (bovinas) (SEQ ID NO: 10, 11 y 64 y BH55U.S. Patentes de Estados Unidos Núm. 5.747.027 y 5.827.721), ovejas (*ovis aries*) (SEQ ID NO: 26, 27, 63 y 65), avispa amarilla (SEQ ID NO: 12 y 13), abeja de miel (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), orangután (SEQ ID NO: 28), mono *cynomolgus* (SEQ ID NO: 29), conejillo de indias (SEQ ID NO: 30), chimpancé (SEQ ID NO: 101), mono rhesus (SEQ ID NO: 102), y hialuronidasas humanas. Los ejemplos de hialuronidasas en las composiciones, combinaciones y métodos proporcionados en la presente memoria son las hialuronidasas solubles.

Las hialuronidasas de mamíferos pueden subdividirse adicionalmente en aquellas que son activas en condiciones neutras, predominantemente encontradas en extractos de testículos, y las que son activas en condiciones ácidas, predominantemente encontradas en órganos como el hígado. Las hialuronidasas activas en condiciones neutras ilustrativas incluyen PH20, incluyendo pero no limitadas a, PH20 derivada de diferentes especies tales como óvulos (SEQ ID NO: 27), bóvidos (SEQ ID NO: 11) y seres humanos (SEQ ID NO: 1). La PH20 humana (también conocida como SPAM1 o proteína de superficie del espermatozoide PH20), está anclada generalmente a la membrana plasmática a través de un ancla de glicosilfosfatidil inositol (GPI). Está naturalmente implicada en la adherencia del espermatozoide-óvulo y ayuda a la penetración por el espermatozoide de la capa de células del cumulus por digestión del ácido hialurónico.

Además de la PH20 humana (también denominada SPAM1), se han identificado cinco genes de tipo hialuronidasa en el genoma humano, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 y HYALP1. HYALP1 es un pseudogen, y no se ha demostrado que HYAL3 (SEQ ID NO: 38) posea actividad enzimática hacia ningún sustrato conocido. HYAL4 (polipéptido precursor expuesto en el SEQ ID NO: 39) es una condroitinasa y muestra poca actividad hacia el hialuronano. HYAL1 (polipéptido precursor expuesto en el SEQ ID NO: 36) es la enzima prototipo activa en condiciones ácidas y PH20 (polipéptido precursor expuesto en el SEQ ID NO: 1) es la enzima prototipo activa en

condiciones neutras. Las hialuronidasas activas en condiciones ácidas, tales como HYAL1 y HYAL2 (polipéptido precursor expuesto en el SEQ ID NO: 37) generalmente carecen de actividad catalítica a pH neutro (*es decir* pH 7). Por ejemplo, HYAL1 tiene poca actividad catalítica *in vitro* por encima de pH 4,5 (Frost et al. (1997) Anal. Biochem. 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 aquellas que están generalmente ancladas a la membrana plasmática a través de un ancla de glicosilfosfatidil-inositol (GPI) tal 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).

i. PH20

La PH20, al igual que otras hialuronidasas de mamíferos, es una endo- β -N-acetil-hexosaminidasa que hidroliza el enlace glicosídico β 1-4 del ácido hialurónico en varias longitudes de oligosacáridos tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. Tienen actividades tanto hidrolítica como transglicosidasa y pueden degradar el ácido hialurónico y los sulfatos de condroitina, tales como C4-S y C6-S. La PH20 está naturalmente involucrada en la adherencia espermatozoide-óvulo y ayuda a la penetración de espermatozoides en la capa de células del cúmulus mediante la digestión del ácido hialurónico. La PH20 se localiza sobre la superficie del espermatozoide, y en el acrosoma derivado del lisosoma, donde está unido a la membrana acrosomal interna. La PH20 de la membrana plasmática tiene actividad hialuronidasa sólo a pH neutro, mientras que la PH20 de la membrana acrosomal interna tiene actividad tanto a pH neutro como ácido. Además de ser una hialuronidasa, la PH20 también parece ser un receptor para la señalización celular inducida por HA, y un receptor para la zona pelúcida que rodea al ovocito.

Las proteínas PH20 ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos de PH20 de ser humano (polipéptido precursor expuesto en el SEQ ID NO: 1, polipéptido maduro expuesto en el SEQ ID NO: 2), de chimpancé (SEQ ID NO: 101), de mono Rhesus (SEQ ID NO: 102) de bóvido (SEQ ID NO: 11 y 64), de conejo (SEQ ID NO: 25), PH20 de óvulo (SEQ ID NO: 27, 63 y 65), de mono Cynomolgus (SEQ ID NO: 29), de cobaya (SEQ ID NO: 30), de rata (SEQ ID NO: 31) y de ratón (SEQ ID NO: 32).

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 solamente una homología débil, con múltiples huecos existentes desde el aminoácido 470 hasta los respectivos extremos carboxi debido a la ausencia de un ancla a GPI en el polipéptido bovino (véase p.ej., Frost GI (2007) Expert Opin. Drug. Deliv. 4:427-440). De hecho, las anclas claras de GPI no se pronostican en muchas otras especies de PH20 además de la de ser humano. De este modo, los polipéptidos de PH20 producidos a partir de óvidos y bóvidos existen naturalmente como formas solubles. Aunque la PH20 bovina existe anclada muy laxamente a la membrana plasmática, no está anclada a través de un ancla sensible a la fosfolipasa (Lalancette et al. (2001) Biol Reprod. 65(2): 628-36).

La estructura de la hialuronidasa bovina ha permitido el uso de la enzima hialuronidasa de testículos bovinos soluble como un extracto para uso clínico (Wydase®, Hyalase®). Otras preparaciones de hialuronidasa PH20 derivadas de animales incluyen Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular ovina purificada, Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular bovina e Hydase (Akorn), una hialuronidasa testicular bovina.

ii. PH20 humana

El transcrito de ARNm de PH20 humana 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 (posiciones 1-35 de residuos de aminoácidos) y un anclaje de ancla de glicosilfosfatidilinositol de 19 aminoácidos (GPI) en el extremo C (posiciones 491 – 509 de residuos de aminoácidos). La PH20 madura es, por lo tanto, un polipéptido de 474 aminoácidos expuesto en el SEQ ID NO: 2. Tras el transporte del polipéptido precursor al RE y la eliminación del péptido señal, el péptido señal de anclaje a GPI C-terminal se escinde para facilitar la unión covalente de un ancla de GPI al aminoácido C-terminal recién formado en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 490 del polipéptido precursor expuesto en el SEQ ID NO: 1. De este modo, se produce un polipéptido maduro anclado a GPI de 474 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 2.

La PH20 humana muestra actividad hialuronidasa tanto a pH neutro como ácido. En un aspecto, la PH20 humana es la hialuronidasa activa en condiciones neutras prototipo que está generalmente trabada a la membrana plasmática a través de un ancla de GPI. En otro aspecto, la PH20 se expresa en la membrana acrosomal interna donde tiene actividad de hialuronidasa tanto a pH neutro como ácido. Parece que la PH20 contiene dos sitios catalíticos en regiones distintas del polipéptido: las regiones del Péptido 1 y del Péptido 3 (Cherr et al., (2001) Matrix Biology 20: 515-525). La evidencia sugiere que la región del Péptido 1 de PH20, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 107-137 del polipéptido maduro expuesto en el SEQ ID NO: 2 y las posiciones 142-172 del polipéptido precursor expuesto en el SEQ ID NO: 1, es necesaria para la actividad enzimática a pH neutro. Los aminoácidos en las posiciones 111 y 113 (correspondientes al polipéptido PH20 maduro expuesto en el SEQ ID NO: 2) dentro de

esta región parecen ser importantes para la actividad, ya que la mutagénesis por sustitución de aminoácidos da lugar a polipéptidos de PH20 con una actividad hialuronidasa de 3% o una actividad hialuronidasa indelectable, respectivamente, en comparación con la PH20 de tipo salvaje (Arming et al., (1997) Eur. J. Biochem. 247: 810-814).

La región del Péptido 3, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 242 - 262 del polipéptido maduro expuesto en el SEQ ID NO: 2, y las posiciones 277 - 297 del polipéptido precursor expuesto en el SEQ ID NO: 1, parece ser importante para Actividad enzimática a pH ácido. Dentro de esta región, los aminoácidos en las posiciones 249 y 252 del polipéptido PH20 maduro parecen ser esenciales para la actividad, y la mutagénesis de cualquiera de los dos resulta en un polipéptido esencialmente desprovisto de actividad (Arming et al., (1997) Eur. J. Biochem. 247: 810-814).

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

Existen siete sitios potenciales de glicosilación unida a N en la PH20 humana en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 del polipéptido ilustrado en el SEQ ID NO: 1. Dado que los aminoácidos 36 a 464 del SEQ ID NO: 1 parecen contener el dominio hialuronidasa de PH20 humana mínimamente activa, no se requiere el sitio de glicosilación ligada a N-490 para la actividad hialuronidasa apropiada. Hay seis enlaces disulfuro en la PH20 humana. Dos enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína C60 y C351 y entre C224 y C238 del polipéptido ilustrado en el SEQ ID NO: 1 (correspondientes a los residuos C25 y C316 y C189 y C203 del polipéptido maduro expuesto en el SEQ ID NO: 2, respectivamente). Se forman otros cuatro enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína C376 y C387; entre C381 y C435; entre C437 y C443; y entre C458 y C464 del polipéptido ilustrado en el SEQ ID NO: 1 (correspondiente a los residuos C341 y C352, entre C346 y C400; entre C402 y C408; y entre C423 y C429 del polipéptido maduro expuesto en el SEQ ID NO: 2, respectivamente).

A diferencia de la mayoría de las preparaciones animales de PH20, la PH20 humana contiene un ancla de GPI que ancla la proteína expresada a la membrana celular. Típicamente, las preparaciones terapéuticas de PH20 humana se proporcionan como polipéptidos que carecen de residuos de aminoácidos C-terminales. A continuación se describen hialuronidasas solubles ilustrativas, incluyendo hialuronidasas PH20 solubles. Las preparaciones de PH20 humana incluyen Tecnología Hylenex[®] y Enhance[™].

b. Hialuronidasas bacterianas

Las hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.2.1 o EC 4.2.99.1) degradan el hialuronano y, en mayor o menor medida, los sulfatos de condroitina y los dermatán sulfatos. Las liasas de hialuronano aisladas de las bacterias difieren de las hialuronidasas (de otras fuentes, p.ej., hialuronoglucosaminidasas, EC 3.2.1.35) por su modo de acción. Son endo- β -N-acetilhexosaminidasas que catalizan una reacción de eliminación, en lugar de hidrólisis, del enlace β 1 $\rightarrow$ 4-glicosídico entre N-acetil-beta-D-glucosamina y residuos de ácido D-glucurónico en el hialuronano, proporcionando 3-(4-desoxi- β -D-gluc-4-enuronosil)-N-acetil-D-glucosamina, y productos disacáridos finales. La reacción da lugar a la formación de oligosacáridos con residuos de ácido hexurónico insaturados en sus extremos no reductores.

Las hialuronidasas de bacterias ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, enzimas de degradación de hialuronano en microorganismos, incluyendo cepas de *Arthrobacter*, *Bdellovibrio*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Peptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, y *Streptomyces*. Los ejemplos particulares de tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, *Arthrobacter* sp. (cepa FB24) (SEQ ID NO: 67), *Bdellovibrio bacteriovorus* (SEQ ID NO: 68), *Propionibacterium acnes* (SEQ ID NO: 69), *Streptococcus agalactiae* (SEQ ID NO: 70), 18RS21 (SEQ ID NO: 71), serotipo Ia (SEQ ID NO: 72); serotipo III (SEQ ID NO: 73)), *Staphylococcus aureus* (cepa COL (SEQ ID NO: 74), cepa MRSA252 (SEQ ID NO: 75 y 76), cepa MSSA476 (SEQ ID NO: 77), cepa NCTC 8325 (SEQ ID NO: 78), cepa bovina RF122 (SEQ ID NO: 79 y 80), cepa USA300 (SEQ ID NO: 81)), *Streptococcus pneumoniae* (SEQ ID NO: 82), cepa ATCC BAA-255/R6 (SEQ ID NO: 83), serotipo 2, cepa D39/NCTC 7466 (SEQ ID NO: 84)), *Streptococcus pyogenes* (Serotipo M1) (SEQ ID NO: 85), serotipo M2, cepa MGAS10270 (SEQ ID NO: 86), serotipo M4, cepa MGAS10750 (SEQ ID NO: 87), serotipo M6 (SEQ ID NO: 88), serotipo M12, cepa MGAS2096 (SEQ ID NO: 89 y 90), serotipo M12, cepa MGAS9429 (SEQ ID NO: 91), serotipo M28 (SEQ ID NO: 92)); *Streptococcus suis* (SEQ ID NO: 93-95); *Vibrio fischeri* (cepa ATCC 700601/ES 114 (SEQ ID NO: 96)), y la enzima hialuronidasa de *Streptomyces hyaluronolyticus*, que es específica para el ácido hialurónico y no escinde condroitina ni sulfato de condroitina (Ohya, T. y Kaneko, Y. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198: 607).

c. Hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos

Las hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos (EC 3.2.1.36) son endo- β -glucuronidasas que generan productos finales de tetra y hexasacárido. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces 1 $\rightarrow$ 3 entre el β -D-glucuronato y los residuos de N-acetil-D-glucosamina a hialuronato. Las hialuronidasas ilustrativas de sanguijuelas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasa de Hirudinidae (p.ej., *Hirudo medicinalis*), Erpobdellidae (p.ej., *Nepheleopsis obscura* y *Erpobdella punctata*), Glossiphoniidae (p.ej., *Desserobdella picta*, *Helobdella stagnalis*, *Glossiphonia complanata*, *Placobdella ornata* y *Theromyzon* sp.) y Haemopidae (*Haemopsis marmorata*) (Hovingh et al. (1999) Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol. 124(3): 319-26). Una hialuronidasa ilustrativa de bacterias que tiene el mismo mecanismo de acción que la hialuronidasa de sanguijuela es la de las cianobacterias, *Synechococcus* sp. (cepa RCC307, SEQ ID NO: 97).

2. Otras enzimas de degradación de hialuronano

Además de la familia de la hialuronidasa, se pueden utilizar otras enzimas de degradación de hialuronano en las composiciones, formulaciones, combinaciones y métodos proporcionados. Por ejemplo, se pueden emplear enzimas, que incluyen condroitinasas y liasas particulares, que tienen la capacidad de escindir el hialuronano. Las condroitinasas ilustrativas que pueden degradar el hialuronano incluyen, aunque sin limitación, condroitina ABC liasa (también conocida como condroitinasa ABC), condroitina AC liasa (también conocida como condroitina sulfato liasa o condroitina sulfato eliminasa) y condroitina C liasa. Los métodos para la producción y purificación de tales enzimas para su uso en las composiciones, formulaciones, combinaciones y métodos proporcionados son conocidos en la técnica (p.ej., Patente de Estados Unidos Núm. 6.054.569; Yamagata, et al. (1968) J. Biol. Chem. 243(7): 1523-1535; Yang et al. (1985) J. Biol. Chem. 160(30): 1849-1857).

La condroitina ABC liasa contiene dos enzimas, condroitin-sulfato-ABC endoliasa (EC 4.2.2.20) y condroitin-sulfato-ABC exoliasa (EC 4.2.2.21) (Hamai et al. (1997) J Biol Chem. 272(14): 9123 - 30), que degradan una variedad de glicosaminoglicanos del tipo condroitin-sulfato y dermatán-sulfato. El sulfato de condroitina, el proteoglicano de condroitin sulfato y el dermatán sulfato son los sustratos preferidos para la condroitin-sulfato-ABC endoliasa, pero la enzima también puede actuar sobre hialuronano a una velocidad menor. La condroitin-sulfato-ABC endoliasa degrada una variedad de glicosaminoglicanos del tipo condroitin-sulfato y dermatán-sulfato, produciendo una mezcla de oligosacáridos Δ 4-insaturados de diferentes tamaños que finalmente se degradan a tetra- y di-sacáridos Δ 4 insaturados. La condroitin-sulfato-ABC exoliasa tiene la misma especificidad de sustrato, pero elimina los residuos de disacárido de los extremos no reductores de los condroitin-sulfatos poliméricos y sus fragmentos de oligosacáridos producidos por la condroitin-sulfato-ABC endoliasa (Hamai, A. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272: 9123-9130). Una condroitin-sulfato-ABC endoliasa y una condroitin-sulfato-ABC exoliasa ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, las de *Proteus vulgaris* y *Flavobacterium heparinum* (la condroitin-sulfato-ABC endoliasa de *Proteus vulgaris* se expone en el SEQ ID NO: 98 (Sato et al. (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol. 41(1): 39 - 46).

La condroitina AC liasa (EC 4.2.2.5) es activa sobre los sulfatos de condroitina A y C, la condroitina y el ácido hialurónico, pero no es activa sobre sulfato de dermatán (sulfato de condroitina B). Las enzimas condroitinasa AC ilustrativas de bacterias incluyen, pero no se limitan a, las de *Flavobacterium heparinum* y *Victivallis vadensis*, expuestas en los SEQ ID NO: 99 y 100, respectivamente, y *Arthrobacter aureescens* (Tkalec et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology 66 (1): 29-35; Ernst et al. (1995) Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30(5):387-444). La condroitinasa C separa el sulfato de condroitina C que produce tetrasacárido más un disacárido 6-sulfatado insaturado (delta Di-6S). También escinde ácido hialurónico produciendo disacárido insaturado no sulfatado (delta Di-OS). Las enzimas condroitinasa C ilustrativas de bacterias incluyen, pero no se limitan a, las de *Streptococcus* y *Flavobacterium* (Hibi et al. (1989) FEMS-Microbiol-Lett. 48(2): 121-4; Michelacci et al. (1976) J. Biol. Chem. 251: 1154-8; Tsuda et al. (1999) Eur. J. Biochem. 262: 127-133).

3. Enzimas de degradación de hialuronano solubles

En ejemplos particulares, las enzimas de degradación de hialuronano se proporcionan como enzimas solubles que pueden ser secretadas de las células tras la expresión. Por lo tanto, las enzimas solubles incluyen enzimas que, cuando se expresan, se secretan al medio celular donde pueden aislarse o purificarse. Como se ha descrito anteriormente, las enzimas de degradación de hialuronano existen en formas ligadas a la membrana o solubles que son secretadas a partir de células. Por lo tanto, cuando las enzimas de degradación de hialuronano incluyen un ancla a glicosilfosfatidilinositol (GPI) y/o están ancladas a la membrana de otra manera o son insolubles, tales enzimas de degradación de hialuronano se proporcionan en la presente memoria en forma soluble por truncamiento o delección de toda o parte del ancla de GPI para hacer que la enzima sea secretada y soluble. Un experto en la técnica puede determinar si un polipéptido está anclado a GPI utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, el uso de algoritmos conocidos para pronosticar la presencia y localización de la secuencia señal de unión de anclaje de GPI y el sitio ω y realizar análisis de solubilidad antes y después de la digestión con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) o D (PI-PLD). En un ejemplo, la hialuronidasa PH20 humana, que normalmente está anclada a la membrana a través de un ancla GPI, puede hacerse soluble por truncamiento y eliminación de la totalidad o una parte del ancla GPI en el extremo C-terminal. Las enzimas de degradación de hialuronano solubles también incluyen hialuronidasas activas en condiciones

neutras y activas en condiciones ácidas. Dependiendo de factores, tales como, pero no limitados a, el nivel deseado de actividad de la enzima después de la administración y/o el sitio de administración, se pueden seleccionar hialuronidasas activas en condiciones neutras y activas en condiciones ácidas. En un ejemplo particular, la enzima de degradación de hialuronano para su uso en las composiciones, combinaciones y métodos de la presente memoria es una hialuronidasa activa en condiciones neutras. Los análisis para la evaluación de la actividad de la hialuronidasa a diversas condiciones de pH, incluyendo a pH neutro, son bien conocidos por un experto en la técnica.

Por lo tanto, las enzimas que degradan hialuronano incluyen variantes truncadas, *p.ej.* variantes truncadas dentro del extremo C del polipéptido para eliminar toda o una porción de un ancla GPI. Tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas solubles, incluyendo hialuronidasas solubles no humanas, hialuronidasas solubles bacterianas y hialuronidasas humanas, Hyal1, PH20 bovina y PH20 ovina, variantes alélicas de las mismas y otras variantes de las mismas. Los ejemplos de hialuronidasas solubles son las PH20 de cualquier especie, tales como cualquiera de las establecidas en cualquiera de los SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27-32, 63-65 y 101-102, variantes de las mismas que presentan una identidad de secuencia de al menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más, con cualquiera de los SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27-32, 63-65 y 101-102, o formas truncadas de las mismas que carecen de toda o una porción del ancla GPI C-terminal, siempre y cuando la hialuronidasa se secrete desde las células al medio tras la expresión de la misma y conserve la actividad hialuronidasa. La enzima de degradación de hialuronano soluble proporcionada en la presente memoria se puede truncar dentro del extremo C en al menos o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 o más aminoácidos en comparación con el polipéptido de tipo salvaje, siempre que el polipéptido truncado resultante muestre actividad hialuronidasa. Por ejemplo, el dominio de hialuronidasa mínimo de la PH20 humana requerido para la actividad consiste en los aminoácidos 36-464 (véase *p.ej.* la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.767.429). Así, en una hialuronidasa PH20 humana, se pueden eliminar al menos 45 aminoácidos del extremo C-terminal. La actividad de la hialuronidasa puede estar entre o aproximadamente 0,5% y 100% de la actividad del polipéptido de partida, por ejemplo, al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de la actividad de la enzima que degrada hialuronano que contiene el ancla GPI.

En los casos en los que la enzima de degradación de hialuronano soluble conserva una porción de la secuencia señal de fijación del ancla de GPI, se pueden conservar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más residuos de aminoácidos en la secuencia de señal de fijación del ancla GPI, siempre que el polipéptido se pueda aislar del medio celular tras la expresión, *p.ej.* anclado laxamente a la membrana celular o secretado desde las células al medio tras la expresión del mismo. Los polipéptidos que contienen uno o más aminoácidos del ancla de GPI se denominan enzimas de degradación de hialuronano solubles ampliadas (véase, la solicitud de los Estados Unidos publicada Núm. 2010-0143457 para enzimas de degradación de hialuronano solubles ampliadas).

a. HP20 humana soluble

La HP20 humana soluble es un ejemplo de hialuronidasa soluble. Se han producido formas solubles de PH20 humana recombinante y se pueden utilizar en las composiciones, formulaciones, combinaciones y métodos descritos en la presente memoria. La producción de tales formas solubles de PH20 se describe en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Núm. US20040268425; US 20050260186 y US20060104968 y en la solicitud Internacional PCT Núm. WO2009111066.

Los polipéptidos de PH20 humanos truncados en el extremo C ilustrativos proporcionados en la presente memoria incluyen cualquiera que tenga un residuo de aminoácido C-terminal 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 ó 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 1, o posiciones correspondientes en una variante alélica o de especie del mismo u otra variante. Cuando se expresa en células de mamífero, la secuencia señal N - terminal de 35 aminoácidos se escinde durante el procesamiento, y la forma madura de la proteína es secretada. Por lo tanto, los polipéptidos de PH20 solubles truncados en el extremo C maduros ilustrativos pueden contener los aminoácidos 36 a 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 ó 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 1 o posiciones correspondientes en una variante alélica o de especie del mismo u otras variantes. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C ilustrativos para su uso en las composiciones y formulaciones proporcionadas en la presente invención son cualquiera que muestre una identidad de secuencia de al menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más con los aminoácidos 36 a 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 1. Se entiende que la variabilidad en los residuos de aminoácidos N-terminales del polipéptido puede existir debido al variado procesamiento del polipéptido en las células. Además, se puede utilizar una secuencia señal heteróloga para alterar o mejorar la expresión del ácido nucleico codificante en las células.

La Tabla 3 proporciona ejemplos no limitantes de polipéptidos de PH20 ilustrativos truncados en el extremo C, incluyendo polipéptidos de PH20 solubles truncados en el extremo C terminal. En la Tabla 3 a continuación, se exponen la longitud (en aminoácidos) de los polipéptidos precursores y maduros y el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se establecen secuencias de aminoácidos ilustrativas de los polipéptidos precursores y maduros de las proteínas PH20 truncadas en el extremo C-terminal. El polipéptido de PH20 de tipo salvaje también se incluye en la Tabla 3 para la comparación. Tales polipéptidos de PH20 ilustrativos truncados en el extremo C incluyen cualquiera de los expuestos en cualquiera de los SEC ID NO: 4-9, 47, 48, 151-170, 185-189, 242, 275 o 276, o un polipéptido que muestra una identidad de secuencia de al menos 85% 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más con cualquiera de los SEQ ID NO: 4-9, 47, 48, 151-170, 185-189, 242, 275 o 276.

En particular, son ejemplos de tales polipéptidos los generados a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica los aminoácidos 1-482 del SEQ ID NO: 1 (expuestos en el SEQ ID NO: 3). Tal molécula de ácido nucleico ilustrativa se expone en el SEQ ID NO: 49. El procesamiento postraducciona elimina la secuencia señal de 35 aminoácidos, dejando una PH20 humana recombinante soluble de 447 aminoácidos (SEQ ID NO: 4). Tal como se produce en el medio de cultivo hay heterogeneidad en el extremo C de manera que el producto, designado rHuPH20, incluye una mezcla de especies que pueden incluir uno o más de los SEQ ID NO: 4-9 en diversas abundancias. Típicamente, rHuPH20 se produce en células que facilitan la N-glicosilación correcta para conservar la actividad, tales como células CHO (p.ej. células CHO DG44).

Tabla 3. Polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C ilustrativos				
Polipéptido	Precursor (aminoácidos)	Precursor SEQ ID NO	Maduro (aminoácidos)	SEQ ID NO.
tipo salvaje	509	1	474	2
SPAM1-SILF	500	231	465	275
SPAM-VSIL	499	198	464	242
SPAM1-IVSI	498	232	463	276
SPAM1-FIVS	497	107	462	151
SPAM1-MFIV	496	141	461	185
SPAM1-TMFI	495	108	460	152
SPAM1-ATMF	494	142	459	186
SPAM1-SATM	493	109	458	153
SPAM1-LSAT	492	143	457	187
SPAM1-TLSA	491	110	456	154
SPAM1-PSTL	489	111	454	155
SPAM1-SPST	488	144	453	188
SPAM1-STLS	490	112	455	156
SPAM1-ASPS	487	113	452	157
SPAM1-NASP	486	145	451	189
SPAM1-YNAS	485	114	450	158
SPAM1-FYNA	484	115	449	159
SPAM1-IFYN	483	46	448	48
SPAM1-QIFY	482	3	447	4
SPAM1-PQIF	481	45	446	5
SPAM1-EPQI	480	44	445	6
SPAM1-EEPQ	479	43	444	7
SPAM1-TEEP	478	42	443	8
SPAM1-ETEE	477	41	442	9
SPAM 1-METE	476	116	441	160

Tabla 3. Polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C ilustrativos				
Polipéptido	Precursor (aminoácidos)	Precursor SEQ ID NO	Maduro (aminoácidos)	SEQ ID NO.
SPAM1-PMET	475	117	440	161
SPAM1-PPME	474	118	439	162
SPAM1-KPPM	473	119	438	163
SPAM1-LKPP	472	120	437	164
SPAM1-FLKP	471	121	436	165
SPAM1-AFLK	470	122	435	166
SPAM1-DAFL	469	123	434	167
SPAM1-IDAF	468	124	433	168
SPAM1-CIDA	467	40	432	47
SPAM1-VCID	466	125	431	169
SPAM1-GVCI	465	126	430	170

4. Enzimas de degradación de hialuronano variantes

Las enzimas de degradación de hialuronano que se proporcionan en la presente memoria también incluyen variantes alélicas o de especies u otras variantes de una enzima de degradación de hialuronano. Por ejemplo, las enzimas de degradación de hialuronano pueden contener una o más variaciones en su secuencia primaria, tales como sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos. Una variante de una enzima de degradación de hialuronano generalmente muestra una identidad de secuencia de al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o más en comparación con la enzima de degradación de hialuronano que no contiene la variación. Para los propósitos de la presente memoria se puede incluir cualquier variación en la enzima de degradación de hialuronano, siempre que la enzima conserve la actividad de hialuronidasa, tal como al menos o aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más de la actividad de una enzima de degradación de hialuronano que no contiene la variación (medida mediante análisis *in vitro* y/o *en vivo* bien conocidos en la técnica).

Por ejemplo, también se incluyen entre las enzimas de degradación de hialuronano variantes alélicas u otras variantes de cualquiera de los SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27-32, 63-65 y 101-102, o formas truncadas de las mismas. Las variantes alélicas y otras variantes incluyen polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o más con cualquiera de los SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27 - 32, 63 - 65 y 101 - 102, o formas truncadas de los mismos. Las variantes de aminoácidos incluyen mutaciones conservativas y no conservativas. Se entiende que los residuos que son importantes o necesarios de otro modo para la actividad de una hialuronidasa, tal como cualquiera de los descritos anteriormente o conocidos en la técnica, son generalmente invariantes y no pueden ser cambiados. Estos incluyen, por ejemplo, los residuos del sitio activo. Así, por ejemplo, los residuos de aminoácidos 111, 113 y 176 (correspondientes a residuos en el polipéptido de PH20 maduro expuesto en el SEQ ID NO: 2) de un polipéptido de PH20 humano, o forma soluble del mismo, son generalmente invariantes y no se alteran. Otros residuos que confieren glicosilación y formación de enlaces disulfuro necesarios para el plegado adecuado también pueden ser invariantes.

5. Glicosilación de enzimas de degradación de hialuronano

La glicosilación, incluyendo la glicosilación unida a N y O, de algunas enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo las hialuronidasas, puede ser importante para su actividad catalítica y su estabilidad. Aunque la alteración del tipo de glicano que modifica una glicoproteína puede tener efectos notables sobre la antigenicidad, el plegamiento estructural, la solubilidad y la estabilidad de una proteína, se cree que la mayoría de las enzimas no requieren glicosilación para una actividad enzimática óptima. Para algunas hialuronidasas, la eliminación de la glicosilación unida a N puede dar como resultado una inactivación casi completa de la actividad hialuronidasa. Así, para tales hialuronidasas, la presencia de glicanos ligados a N es crítica para generar una enzima activa.

Los oligosacáridos ligados a N se dividen en varios tipos principales (oligomanosa, complejos, híbridos, sulfatados), todos los cuales tienen núcleos (Man) 3-GlcNAc-GlcNAc- unidos mediante el nitrógeno amídico de los residuos de Asn que caen dentro de las secuencias -Asn-Xaa-Thr/Ser- (donde Xaa no es Pro). Se ha informado de una glicosilación en el sitio -Asn-Xaa-Cys- para la proteína C de coagulación. En algunos casos, una enzima de

degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa, puede contener enlaces tanto N-glicosídicos como O-glicosídicos. Por ejemplo, la PH20 tiene oligosacáridos unidos a O así como oligosacáridos ligados a N. Existen siete sitios potenciales de glicosilación unida a N en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de la PH20 humana ilustrada en el SEQ ID NO: 1. Los residuos de aminoácidos N82, N166 y N254 están ocupados por glicanos de tipo complejo, mientras que los residuos de aminoácidos N368 y N393 están ocupados por glicanos de alto contenido de manosa. El residuo de aminoácido N235 está ocupado por aproximadamente 80% de glicanos de tipo alto contenido de manosa y 20% de glicanos de tipo complejo. Como se ha indicado anteriormente, la glicosilación unida a N en N490 no es necesaria para la actividad hialuronidasa.

En algunos ejemplos, las enzimas de degradación de hialuronano para su uso en las composiciones, formulaciones, combinaciones y/o métodos proporcionados son glicosiladas en uno o en todos los sitios de glicosilación. Por ejemplo, para PH20 humana, o una forma soluble de la misma, están glicosilados 2, 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 del SEQ ID NO: 1. En algunos ejemplos, las enzimas de degradación de hialuronano están glicosiladas en uno o más sitios de glicosilación nativos. En otros ejemplos, las enzimas de degradación de hialuronano se modifican en uno o más sitios de glicosilación no nativos para conferir la glicosilación del polipéptido a uno o más sitios adicionales. En tales ejemplos, el anclaje de radicales de azúcar adicionales puede mejorar las propiedades farmacocinéticas de la molécula, tales como una mejor semivida y/o una mejor actividad.

En otros ejemplos, las enzimas de degradación de hialuronano para su uso en las composiciones, formulaciones, combinaciones y/o métodos proporcionados en la presente memoria están parcialmente desglicosiladas (o polipéptidos parcialmente N-glicosilados). Las glicosidasas o glicósido hidrolasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico para generar dos azúcares más pequeños. Los principales tipos de N-glicanos en los vertebrados incluyen glicanos de alto contenido de manosa, glicanos híbridos y glicanos complejos. Existen glicosidasas que dan como resultado sólo una desglicosilación parcial de proteínas, incluyendo: EndoF1, que escinde glicanos de elevado contenido de manosa y de tipo híbrido; EndoF2, que escinde glicanos de tipo complejo biantenarico; EndoF3, que escinde glicanos biantenaricos y complejos más ramificados; y EndoH, que escinde glicanos de elevado contenido de manosa y de tipo híbrido. El tratamiento de una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble, tal como una PH20 soluble, con una o todas estas glicosidasas, puede dar lugar sólo a una desglicosilación parcial y, por tanto, a la conservación de la actividad hialuronidasa.

Las enzimas de degradación de hialuronano parcialmente desglicosiladas, tales como las hialuronidasas solubles parcialmente desglicosiladas, se pueden producir por digestión con una o más glicosidasas, generalmente una glicosidasa que no elimina todos los N-glicanos sino que desglicosila parcialmente la proteína. Por ejemplo, el tratamiento de PH20 (p.ej. una PH20 recombinante designada rHuPH20) con una o todas las glicosidasas anteriores (p.ej. EndoF1, EndoF2 y/o EndoF3) da como resultado una desglicosilación parcial. Estos polipéptidos de PH20 parcialmente desglicosilados pueden mostrar actividad enzimática de hialuronidasa que es comparable a la de los polipéptidos totalmente glicosilados. Por el contrario, el tratamiento de PH20 con PNGasaF, una glicosidasa que escinde todos los N-glicanos, da como resultado la eliminación completa de todos los N-glicanos y, por lo tanto, hace que la PH20 sea enzimáticamente inactiva. Así, aunque todos los sitios de glicosilación unida a N (tales como, por ejemplo, los de los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de PH20 humana, ilustrados en el SEQ ID NO: 1) pueden ser glicosilados, el tratamiento con una o más glicosidasas puede reducir el grado de glicosilación en comparación con una hialuronidasa que no se digiere con una o más glicosidasas.

Las enzimas de degradación de hialuronano parcialmente desglicosiladas, que incluyen polipéptidos de PH20 solubles parcialmente desglicosilados, pueden tener un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o 80% del nivel de glicosilación de un polipéptido totalmente glicosilado. En un ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 del SEQ ID NO: 1 son parcialmente desglicosilados, de manera que ya no contienen glicanos de alto contenido de manosa o de tipo complejo, sino que contienen al menos un radical de N-acetilglucosamina. En algunos ejemplos, 1, 2 ó 3 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166 y N254 del SEQ ID NO: 93 son desglicosilados, es decir, no contienen un radical azúcar. En otros ejemplos, 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 del SEQ ID NO: 1 están glicosilados. Los residuos de aminoácidos glicosilados contienen mínimamente un residuo de N-acetilglucosamina. Típicamente, las enzimas de degradación de hialuronano parcialmente desglicosiladas, que incluyen polipéptidos de PH20 solubles parcialmente desglicosilados, presentan actividad hialuronidasa que es 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% o más de la actividad hialuronidasa mostrada por el polipéptido totalmente glicosilado.

6. Enzimas de degradación de hialuronano modificadas

En un ejemplo, las composiciones y combinaciones proporcionadas contienen enzimas de degradación de hialuronano, en particular hialuronidasas solubles, que se han modificado para aumentar la semivida de la enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo, para promover efectos de tratamiento prolongado/sostenido en un

sujeto. Las modificaciones ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, anclaje, directa o indirectamente a través de un conector, tal como covalentemente o por otra unión estable, de un polímero, tal como dextrano, polietilenglicol (PEG), albúmina o radical sialilo u otros de tales polímeros, tales como polímeros naturales o de azúcares. Otras modificaciones incluyen la generación de proteínas de fusión, por ejemplo por medio de conexión con albúmina de suero humano (HAS) o Fc de inmunoglobulina.

Por ejemplo, las enzimas de degradación de hialuronano pueden ser modificadas por conjugación con una o más moléculas poliméricas (polímero). El anclaje covalente u otra unión estable (conjugación) de moléculas poliméricas, tales como polietilenglicol (radical de pegilación (PEG)) confieren propiedades beneficiosas a la composición de enzima de degradación de hialuronano-polímero resultante. Tales propiedades incluyen una mejor biocompatibilidad, una prolongación de la semivida de la proteína (y actividad enzimática) en la sangre, células y/u otros tejidos dentro de un sujeto, una protección eficaz de la proteína frente a las proteasas y la hidrólisis, una mejor biodistribución, una mejor farmacocinética y/o farmacodinámica, y un aumento de la solubilidad en agua.

Los polímeros ilustrativos que se pueden conjugar con la enzima de degradación de hialuronano, tal como la hialuronidasa, incluyen homopolímeros naturales y sintéticos, tales como polioles (es decir poli-OH), poliaminas (es decir poli-NH₂) y ácidos policarboxílicos (es decir poli-COOH), y otros heteropolímeros es decir polímeros que contienen uno o más grupos de acoplamiento diferentes p.ej. un grupo hidroxilo y grupos amina. Los ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas entre los poli(óxidos de alquileo) (PAO), tales como polialquilenglicoles (PAG), incluyendo polietilenglicoles (PEG), metoxipolietilenglicoles (mPEG) y polipropilenglicoles, PEG-glicidiléteres (Epoxy-PEG), PEG-oxicarboxilimidazol (CDI-PEG), polietilenglicoles ramificados (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, poli-D,L-aminoácidos, anhídrido de polietileno-co-ácido maleico, anhídrido poliestireno-co-ácido maleico, dextranos incluyendo carboximetil-dextranos, heparina, albúmina homóloga, celulosas, incluyendo metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa carboxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa, productos hidrolizados de quitosano, almidones tales como hidroxietilalmidones e hidroxipropilalmidones, glucógeno, agarosas y sus derivados, goma de guar, pululano, inulina, goma de xantano carragenano, pectina, productos hidrolizados de ácido algínico y bio-polímeros.

Típicamente, los polímeros son poli(óxidos de alquileo) (PAO), tales como poli(óxidos de etileno), tales como PEG, típicamente mPEG, que, en comparación con los polisacáridos tales como dextrano y pululano, tienen pocos grupos reactivos susceptibles de entrecruzamiento. Típicamente, los polímeros son moléculas poliméricas no tóxicas tales como (m)polietilenglicol (mPEG) que se pueden conjugar covalentemente con la enzima de degradación de hialuronano, tal como la hialuronidasa (p.ej. a grupos de anclaje sobre la superficie de la proteína) utilizando una química relativamente simple.

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

Las moléculas poliméricas adecuadas para la unión a las enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo las hialuronidasas, incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG) y derivados de PEG tales como metoxipolietilenglicoles (mPEG), PEG-glicidiléteres (Epoxy-PEG) PEG-oxicarboxilimidazol (CDI-PEG), PEG ramificados y poli(óxido de etileno) (PEO) (véase p.ej. Roberts et al., Advanced Drug Delivery Review 2002, 54: 459-476; Harris y Zalipsky, S (eds.) "Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications" ACS Symposium Serie 680, 1997; Mehvar et al., J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 3(1):125-136, 2000; Harris, Nature Reviews 2:215 y siguientes (2003); y Tsubery, J Biol. Chem 279(37):38118-24, 2004).

Se han descrito en la técnica numerosos reactivos para la PEGilación. Tales reactivos incluyen, pero no se limitan a, PEG activado con N-hidroxisuccinimidilo (NHS), mPEG-succinimidilo, mPEG-N-hidroxisuccinimida, mPEG- alfa-metilbutanoato de succinimidilo, mPEG-propionato de succinimidilo, mPEG-butanoato de succinimidilo, éster de succinimidilo de ácido 3-hidroxibutanoico de carboximetil-mPEG, PEG-propionato de succinimidilo homobifuncional, PEG-propionaldehído homobifuncional, PEG-butilaldehído homobifuncional, PEG-maleimida, PEG-hidrazida, PEG-carbonato de p-nitrofenilo, mPEG-carbonato de benzotriazol, PEG-propionaldehído, mPEG-butilaldehído, mPEG₂-butilaldehído ramificado, mPEG-acetilo, mPEG-piperidona, mPEG-metilcetona, mPEG-maleimida "sin conector", mPEG-vinilsulfona, mPEG-tiol, mPEG-ortopiridiltoéster, mPEG-disulfuro de ortopiridilo, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, PEG-vinilsulfona-NHS, acrilato de PEG-NHS, fluoresceína-PEG-NHS, y biotina-PEG-NHS (véanse, p.ej., Monfardini et al., Bioconjugate Chem. 6:62-69, 1995; Veronese et al., J. Bioactive Compatible Polymers 12:197-207, 1997; documentos U.S. 5.672.662; U.S. 5.932.462; U.S. 6.495.659; U.S. 6.737.505; U.S. 4.002.531; U.S. 4.179.337; U.S. 5.122.614; U.S. 5.324. 844; U.S. 5.446.090; U.S. 5.612.460; U.S. 5.643.575; U.S. 5.766.581; U.S. 5.795. 569;

U.S. 5.808.096; U.S. 5.900.461; U.S. 5.919.455; U.S. 5.985.263; U.S. 5.990. 237; U.S. 6.113.906; U.S. 6.214.966; U.S. 6.258.351; U.S. 6.340.742; U.S. 6.413.507; U.S. 6.420.339; U.S. 6.437.025; U.S. 6.448.369; U.S. 6.461.802; U.S. 6.828.401; U.S. 6.858.736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 1064951; EP 0822199; WO 01076640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; WO 0187925; y WO 0500360).

La molécula polimérica puede tener un peso molecular típicamente comprendido entre aproximadamente 3 kDa y aproximadamente 60 kDa. En algunas realizaciones, la molécula polimérica que está conjugada con una proteína, tal como rHuPH20, tiene un peso molecular de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más de 60 kDa. En un ejemplo, el polietilenglicol tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 3 kD a aproximadamente 50 kD, y preferiblemente de aproximadamente 5 kD a aproximadamente 30 kD. La unión covalente del PEG al fármaco (conocida como "PEGilación") se puede llevar a cabo mediante técnicas de síntesis química conocidas. Por ejemplo, la PEGilación de la proteína se puede realizar haciendo reaccionar el PEG activado con NHS con la proteína en condiciones de reacción adecuadas.

Se conocen en la técnica varios métodos para modificar polipéptidos mediante unión covalente (conjugación) de un PEG o derivado de PEG (*es decir* "PEGilación") (véanse p.ej., los documentos U.S. 2006/0104968; U.S. 5-672.662; U.S. 6.737.505; y U.S. 2004/0235734). Las técnicas para la PEGilación incluyen, pero no se limitan a, conectores y químicas de acoplamiento especializados (véase p.ej., Roberts et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 459-476, 2002), unión de múltiples radicales de PEG a un único sitio de conjugación (tal como mediante el uso de PEG ramificados, véase p.ej., Guiotto et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 12:177-180, 2002), PEGilación y/o mono-PEGilación específica del sitio (véase p.ej., Chapman et al., Nature Biotech. 17:780-783, 1999), y PEGilación enzimática dirigida al sitio (ver p.ej., Sato, Adv. Drug Deliv. Rev., 54:487-504, 2002). Los métodos y mecanismos descritos en la técnica pueden producir proteínas que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 PEG o derivados de PEG unidos a una única molécula de proteína (véase p.ej., el documento U.S. 2006/0104968).

Las enzimas de degradación de hialuronano modificadas, en particular las hialuronidasas recombinantes humanas solubles (p.ej. rHuPH20), se pueden preparar utilizando diversos reactivos de PEG. Los reactivos de PEG ilustrativos incluyen, por ejemplo, el uso de mPEG-SBA (30 kD), mPEG-SMB (30 kD) y versiones ramificadas basadas en mPEG2-NHS (40 kD), mPEG2-NHS (60 kD). Las versiones PEGiladas de una enzima de degradación de hialuronano, tal como una PH20, por ejemplo rHuPH20, se pueden preparar utilizando la química de NHS, así como carbonatos y aldehídos, utilizando cada uno de los siguientes reactivos: mPEG2-NHS-40K ramificado, mPEG-NHS-10K ramificado, mPEG-NHS-20K ramificado, mPEG-NHS-40K ramificado, mPEG2-NHS-60K ramificado; mPEG-SBA-5K; mPEG-SBA-20K; MPEG-SBA-30K; mPEG-SMB-20K; MPEG-SMB-30K; mPEG-butiraldehído; mPEG-SPA-20K; MPEG-SPA-30K; y PEG-NHS-5K- biotina. Las enzimas de degradación de hialuronano PEGiladas también se pueden preparar utilizando reactivos de PEG disponibles de Dowpharma, una división de Dow Chemical Corporation; incluyendo hialuronidasas PEGiladas con PEG-carbonato de p-nitrofenilo de Dowpharma (30 kDa) y con propionaldehído PEG (30 kDa).

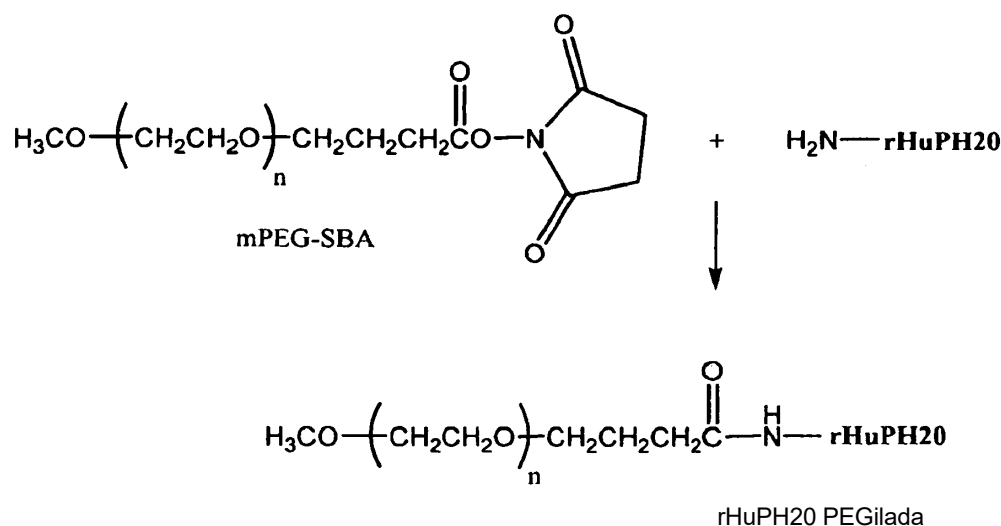
Si bien se han descrito numerosas reacciones para la PEGilación, las que son más aplicables en general aplican direccionalidad, utilizan condiciones de reacción suaves y no requieren un procesamiento exhaustivo aguas abajo para eliminar catalizadores tóxicos o sub-productos. Por ejemplo, el monometoxi PEG (mPEG) tiene solamente un hidroxilo terminal reactivo, y por lo tanto su uso limita algo de la heterogeneidad de la mezcla de producto PEG-proteína resultante. La activación del grupo hidroxilo en el extremo del polímero opuesto al grupo metoxi terminal es generalmente necesaria para conseguir una PEGilación de proteína eficaz, con el objetivo de hacer que el PEG derivatizado sea más susceptible al ataque nucleófilo. El nucleófilo atacante es usualmente el grupo épsilon-amino de un residuo lisilo, pero también pueden reaccionar otras aminas (p.ej. la alfa-amina N-terminal o las aminas del anillo de histidina) si las condiciones locales son favorables. Es posible un anclaje más dirigido en proteínas que contienen una única lisina o cisteína. Este último residuo puede ser elegido como diana por la PEG-maleimida para la modificación específica del tiol. Alternativamente, la PEG-hidrazida de se puede hacer reaccionar con una enzima de degradación de hialuronano oxidada con peryodato y reducida en presencia de NaCNBH₃. Más específicamente, los azúcares de CMP PEGilados se pueden hacer reaccionar con una enzima de degradación de hialuronano en presencia de glicosil-transferasas apropiadas. Una técnica es la técnica de "PEGilación" en la que un número de moléculas poliméricas están acopladas al polipéptido en cuestión. Cuando se utiliza esta técnica, el sistema inmunológico tiene dificultades para reconocer los epítomos sobre la superficie del polipéptido responsables de la formación de anticuerpos, reduciendo así la respuesta inmunitaria. Para polipéptidos introducidos directamente en el sistema circulatorio del organismo humano para proporcionar un efecto fisiológico particular (*es decir* fármacos), la respuesta inmunitaria potencial típica es una respuesta de IgG y/o IgM, mientras que los polipéptidos que son inhalados a través del sistema respiratorio (*es decir* polipéptido industrial) potencialmente pueden causar una respuesta de IgE (*es decir* respuesta alérgica). Una de las teorías que explican la reducción de la respuesta inmunitaria es que la molécula o las moléculas poliméricas protegen los epítomos sobre la superficie del polipéptido responsable de la respuesta inmunitaria que conduce a la formación de anticuerpos. Otra teoría o al menos un factor

parcial es que cuanto más pesado sea el producto conjugado, más reducida será la respuesta inmunitaria.

Los succinimidil-PEG que contienen PEG lineales o ramificados se pueden conjugar con una enzima de degradación de hialuronano. Por ejemplo, una enzima de degradación de hialuronano, tal como una PH20, por ejemplo, rHuPH20 se puede conjugar con reactivos de succinimidil-monoPEG (mPEG) que incluyen Propionatos de Succinimidil-mPEG (mPEG-SPA), Butanoatos de Succinimidil-mPEG (mPEG-SBA) y (para unir PEG "ramificados") mPEG2-N-Hidroxilsuccinimida. Estos ésteres de succinimidilo pegilados contienen cadenas principales de carbono de longitudes diferentes entre el grupo PEG y el entrecruzador activado, y un grupo PEG sencillo o ramificado. Estas diferencias se pueden utilizar, por ejemplo, para proporcionar diferentes cinéticas de reacción y potencialmente restringir sitios disponibles para la unión de PEG a la enzima durante el proceso de conjugación.

En un ejemplo, la PEGilación incluye la conjugación de mPEG-SBA, por ejemplo, mPEG-SBA-30K (que tiene un peso molecular de aproximadamente 30 KDa) u otros ésteres de succinimidilo de derivado de ácido PEG butanoico, a una hialuronidasa soluble. Los ésteres de succinimidilo de derivados de ácido PEG butanoico, tales como mPEG-SBA-30K, se acoplan fácilmente a grupos amino de proteínas. Por ejemplo, la conjugación covalente de mPEG-SBA-30K y rHuPH20 (que tiene un tamaño de aproximadamente 60 KDa) proporciona enlaces amida estables entre rHuPH20 y mPEG, como se muestra en el Esquema 1, a continuación.

Esquema 1



Típicamente, se añade el mPEG-SBA-30K u otro PEG a la enzima de degradación de hialuronano, en algunos casos una hialuronidasa, a una razón molar de PEG:polipéptido de 10:1 en un tampón adecuado, p.ej. NaCl 130 mM/HEPES 10 mM a pH 6,8, seguido de esterilización, p.ej. filtración en condiciones estériles y conjugación continua, por ejemplo, con agitación, durante la noche a 4°C en una habitación fría. En un ejemplo, el PEG-enzima de degradación de hialuronano conjugado se concentra y se intercambia con tampón.

Otros métodos de acoplamiento de ésteres de succinimidilo de derivados de ácido PEG butanoico, tales como mPEG-SBA-30K son conocidos en la técnica (véanse p.ej., los documentos U.S. 5.672.662; U.S. 6.737.505; y U.S. 2004/0235734). Por ejemplo, un polipéptido, tal como una enzima de degradación de hialuronano (p.ej. una hialuronidasa), se puede acoplar a un derivado de PEG activado con NHS por reacción en un tampón de borato (0,1 M, pH 8,0) durante una hora a 4°C. La proteína PEGilada resultante se puede purificar por ultrafiltración. Alternativamente, la PEGilación de una fosfatasa alcalina bovina se puede lograr mezclando la fosfatasa con mPEG-SBA en un tampón que contiene fosfato de sodio 0,2 M y NaCl 0,5 M (pH 7,5) a 4°C durante 30 minutos. El PEG sin reaccionar se puede eliminar por ultrafiltración. Otro método hace reaccionar el polipéptido con mPEG-SBA en agua desionizada a la que se añade trietilamina para elevar el pH a 7,2-9. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante varias horas para completar la PEGilación.

Los PEG se pueden utilizar para generar enzimas de degradación de hialuronano, tales como una PH20, por ejemplo rHuPH20, que tienen entre aproximadamente tres y seis moléculas de PEG por enzima. Tales composiciones de rHuPH20 pegiladas se pueden purificar fácilmente para producir composiciones que tienen actividades específicas de aproximadamente 25.000 o 30.000 unidades/mg de actividad hialuronidasa de proteína, y están sustancialmente libres de enzima no PEGilada (menos de 5% no PEGilada).

7. Métodos de producción de ácidos nucleicos y polipéptidos codificados de enzimas de degradación de

hialuronano

Los polipéptidos de una enzima de degradación de hialuronano, tal como 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 los genes deseados. Se puede utilizar cualquier método disponible en la técnica para obtener un ADN completo (es decir, que abarca toda la región codificante) o un clon de ADN genómico que codifica una hialuronidasa, por ejemplo de una fuente celular o tisular. Las hialuronidasas solubles modificadas o variantes, pueden ser modificadas genéticamente a partir de un polipéptido de tipo salvaje, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida.

Los polipéptidos se pueden clonar o aislar utilizando cualquier método disponible conocido en la técnica para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Tales métodos incluyen la amplificación por PCR de ácidos nucleicos y el escrutinio de bibliotecas, incluyendo el escrutinio por hibridación de ácido nucleico, el escrutinio basado 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 un material de partida a partir del que se puede aislar una molécula de ácido nucleico codificante del polipéptido deseado. Por ejemplo, preparaciones de ADN y ARNm, extractos celulares, extractos de tejidos, muestras de fluidos (p.ej. sangre, suero, saliva), se pueden utilizar muestras de sujetos sanos y/o enfermos en métodos de amplificación. También se pueden utilizar bibliotecas de ácido nucleico como 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 se pueden diseñar basándose en la traducción de una secuencia de aminoácidos polipeptídica. Las moléculas de ácido nucleico generadas por amplificación se pueden secuenciar y confirmar para codificar un polipéptido deseado.

Se pueden unir secuencias de nucleótidos adicionales a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, incluyendo secuencias conectoras que contienen sitios de endonucleasas de restricción con el propósito de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteína o un vector diseñado para la amplificación de las secuencias de ADN que codifican la proteína núcleo. Además, secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcionales pueden estar operativamente unidas a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido. Los ejemplos de tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión de proteínas intracelulares, y secuencias de secreción, por ejemplo secuencias señal heterólogas, diseñadas para facilitar la secreción de proteínas. Tales secuencias son conocidas por 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 de proteínas a moléculas de ácido nucleico que codifican enzimas. Tales regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias de residuos que facilitan o codifican proteínas que facilitan la captación de una enzima en células diana específicas, o alteran de otro modo la farmacocinética de un producto de un gen sintético. Por ejemplo, las enzimas pueden estar conectadas a radicales de PEG.

Además, se pueden añadir etiquetas o otros radicales, por ejemplo, para ayudar a 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 moléculas de ácido nucleico que codifican enzimas. Los ejemplos de tales secuencias incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican una etiqueta His (p.ej., 6XHis, HHHHHH; SEQ ID NO: 54) o una Etiqueta Flag (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 55).

Los ácidos nucleicos identificados y aislados se pueden insertar entonces en un vector de clonación apropiado. Se puede utilizar un gran número de sistemas vector-anfitrión conocidos en la técnica. Los vectores posibles incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema vectorial 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 plasmídicos pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Otros vectores de expresión incluyen el vector de expresión HZ24. La inserción en un vector de clonación se puede lograr, por ejemplo, ligando el fragmento de ADN a un vector de clonación que tiene extremos cohesivos complementarios. La inserción se puede efectuar utilizando vectores de clonación TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios utilizados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN se pueden modificar enzimáticamente. Alternativamente, se puede producir cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (conectores) sobre los extremos de 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 por medio de colas homopoliméricas. Las moléculas recombinantes se

pueden introducir en células anfitrionas a través, por ejemplo, de transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de manera que se generen muchas copias de la secuencia génica.

En realizaciones específicas, la transformación de células anfitrionas con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen de la proteína aislado, ADNc o secuencia de ADN sintetizada permite la generación de múltiples copias del gen. De este modo, se puede obtener el gen en grandes cantidades mediante el crecimiento de transformantes, el aislamiento de las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, la recuperación del gen insertado desde del ADN recombinante aislado.

10 a. Vectores y células

Para la expresión recombinante de una o más de las proteínas deseadas, tal como cualquiera de las descritas en la presente memoria, se puede insertar el ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína 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. Las señales transcripcionales y traduccionales necesarias también pueden ser suministradas por el promotor nativo para genes enzimáticos y/o sus regiones flanqueantes.

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

Se proporcionan células procariotas y eucariotas, incluyendo células endoteliales, que contienen los vectores. Tales células incluyen células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, Archeobacterias, células vegetales, células de insecto y células animales. Las células se utilizan para producir una proteína de las mismas mediante el cultivo de las células anteriormente descritas en condiciones en las que la proteína codificada sea expresada por la célula y recuperar la proteína expresada. Para los fines de la presente memoria, por ejemplo, la enzima puede ser secretada al medio.

Se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la enzima de degradación de hialuronano, en algunos ejemplos un polipéptido de hialuronidasa soluble, acoplado a la secuencia señal nativa o heteróloga, así como múltiples copias de la misma. Los vectores se pueden seleccionar 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 anfitrión-vector para expresar la secuencia que codifica la proteína. Estos incluyen pero no se limitan a sistemas de células de mamíferos infectados con virus (p.ej. virus vaccinia, adenovirus y otros virus); sistemas de células de insectos infectados con virus (p.ej. baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico o ADN cosmídico. Los elementos de expresión de los vectores varían en sus fuerzas y especificidades. Dependiendo del sistema anfitrión-vector utilizado, se puede utilizar cualquiera de una serie de elementos de transcripción y traducción adecuados.

Se puede utilizar cualquiera método conocido por 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 apropiadas y secuencias codificantes de proteínas. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante *in vitro* y sintéticas y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos, se puede regular mediante una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que los genes o fragmentos de los mismos se expresen en un anfitrión transformado con una o varias moléculas de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede ser controlada por cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. En una realización específica, el promotor no es nativo de los genes para una proteína deseada. Los promotores que se pueden utilizar incluyen pero no se limitan al promotor temprano de SV40 (Bemoist 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 la timidina quinasa del herpes (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster et al., Nature 296:39-42 (1982)); vectores de expresión 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 vegetales que contienen el promotor de la nopalina sintasa (Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213 (1984)) o el promotor del ARN de 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner et al., Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bifsosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., Nature 310:115-120 (1984)); elementos promotores de levadura y otros hongos tales como el promotor de Gal4, el promotor de la alcohol deshidrogenasa, el promotor de la fosfoglicerol quinasa, el promotor de la fosfatasa alcalina, y

las siguientes regiones de control transcripcional animales que muestran especificidad de tejido y han sido utilizadas 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)); la 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, mamarias, linfoides y mastocitos (Leder et al., Cell 45:485-495 (1986)), la región de control del gen de la albúmina que es activa en hígado (Pinkert et al., Genes and Devel. 1:268-276 (1987)), la región de control del gen de la alfa-fetoproteína que es activa en 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 antitripsina alfa-1 que es activa en 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)), la región de control del gen de la proteína básica mielina que es activa en oligodendrocitos del cerebro (Readhead et al., Cell 48:703-712 (1987)), la región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina 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 gonadotrofos del hipotálamo (Mason et al., Science 234:1372-1378 (1986)).

En una realización específica, se utiliza un vector que contiene un promotor unido operablemente a ácidos nucleicos que codifican una proteína deseada, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo de la misma, uno o más orígenes de replicación y, opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (p.ej., un gen de resistencia a antibiótico). Los vectores plasmídicos ilustrativos para la transformación de células de *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles en Qiagen, Valencia, CA; véase también la bibliografía publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor de fago T5 (reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*) y un doble módulo de represión del operador lac para proporcionar una expresión fuertemente regulada y de alto nivel de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión al ribosoma sintético (RBS II) para una traducción eficaz, una secuencia codificante de la etiqueta 6XHis, terminadores de la transcripción t_0 y T1, el origen de replicación de 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 pQ E31 que proporcionan múltiples sitios de clonación para los tres marcos de lectura y proporcionan la expresión de proteínas etiquetadas con 6xHis en el extremo N-terminal. Otros vectores plasmídicos ilustrativos para la transformación de células de *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, la Patente de Estados Unidos 4.952.496; disponible de Novagen, Madison, WI; véase, también la bibliografía publicada por Novagen que describe el sistema). Tales plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T7lac, el terminador T7, el operador lac de *E. coli* inducible; y el gen represor de lac; PET 12a-c, que contiene el promotor T7, el terminador T7 y la señal de secreción ompT de *E. coli*; y pET 15b y pET19b (Novagen, Madison, WI), que contienen una secuencia líder His-TagTM para su uso en purificación con una columna His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión tras la purificación sobre la columna, la región promotora de T7-lac y el terminador T7.

Un ejemplo de un vector para la expresión en células de mamífero 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 potenciadora/promotora inmediata-temprana 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 (DHFR) de ratón.

b. Expresión

Los polipéptidos de enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo los polipéptidos de hialuronidasa solubles, pueden ser producidos por 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, tales como por ejemplo, las necesarias para la administración y el tratamiento. Los anfitriones de expresión incluyen organismos procariotas y eucariotas tales como *E. coli*, levadura, plantas, células de insecto, células de mamífero, incluyendo líneas celulares humanas y de 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 realizar basándose en éstos y otros factores, tales como consideraciones reguladoras y de seguridad, costes de producción y la necesidad y los métodos para la purificación.

Se encuentran disponibles muchos vectores de expresión y son conocidos por los expertos en la técnica y se pueden utilizar para la expresión de proteínas. La elección del vector de expresión estará influenciada por la elección del sistema de expresión del anfitrión. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores transcripcionales y opcionalmente potenciadores, señales de traducción y señales de terminación de la transcripción

y la traducción. Los vectores de expresión que se utilizan para la transformación estable típicamente tienen un marcador seleccionable que permite la selección y el mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, se puede utilizar un origen de replicación para amplificar el número de copias del vector.

Los polipéptidos de enzimas de degradación de hialuronano, tales como los polipéptidos de hialuronidasa solubles, también se pueden utilizar o expresar como fusiones de proteínas. Por ejemplo, se puede generar una fusión enzimática para añadir una 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 por ejemplo para la localización, p.ej. una etiqueta de his₆ o una etiqueta myc, o una etiqueta para la purificación, por ejemplo, una fusión GST, y una secuencia para dirigir la secreción de la proteína y/o la asociación a la membrana.

i. Células procarióticas

Los procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema para producir grandes cantidades de proteínas. La transformación de *E. coli* es un mecanismo simple y rápido bien conocido por 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 proteína y para expresar proteínas que muestran cierta toxicidad para las células anfitrionas. Los ejemplos de 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.

Las proteínas, tales como las proporcionadas en la presente memoria, se pueden expresar en el entorno citoplásmico de *E. coli*. El citoplasma es un entorno reductor y para algunas moléculas, esto puede dar lugar a la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Se pueden utilizar agentes reductores tales como ditioneol 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 bacterias que proporciona un entorno oxidante e isomerasas de tipo chaperonina y disulfuro y puede conducir a la producción de una proteína soluble. Típicamente, se fusiona una secuencia líder con la proteína que se va a expresar que dirige la proteína al periplasma. El líder se elimina a continuación por medio de peptidasas señal dentro del periplasma. Los ejemplos de las secuencias líder de orientación al periplasma 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 la fuga de la proteína expresada al medio de cultivo. La secreción de proteínas permite una purificación rápida y sencilla a partir del sobrenadante del cultivo. Las proteínas que no se secretan se pueden obtener del periplasma mediante lisis osmótica. De forma similar a la expresión citoplásmica, en algunos casos las proteínas pueden volverse insolubles y se pueden utilizar desnaturizantes y agentes reductores para facilitar la solubilización y el replegamiento. La temperatura de inducción y crecimiento también puede influir en los niveles de expresión y la solubilidad, típicamente se utilizan temperaturas entre 25°C y 37°C. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. Por lo tanto, si las proteínas requieren glicosilación para su función, se puede añadir la glicosilación *in vitro* después de la purificación de las células anfitrionas.

ii. Células de levadura

Las 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 de las descritas en la presente memoria. La levadura puede ser transformada con vectores de replicación episomal o por integración cromosómica estable mediante recombinación homóloga. Típicamente, se utilizan promotores inducibles para regular la expresión génica. Los ejemplos de tales promotores incluyen los promotores GAL1, GAL7 y GAL5 y de metalotioneína, tales como CUP1, AOX1 u otros promotores de *Pichia* u otra 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 levadura son a menudo solubles. La expresión simultánea con chaperoninas tales como Bip y la proteína disulfuro isomerasa puede mejorar los niveles de expresión y la solubilidad. Además, las proteínas expresadas en levadura se pueden dirigir para la secreción utilizando fusiones de péptidos señal de secreción tales como la señal de secreción del factor alfa de tipo de apareamiento de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de la superficie celular de levadura tales como el receptor de adherencia del apareamiento Aga2p o la glucoamilasa de *Arxula adenivorans*. Un sitio de escisión de proteasa por ejemplo para la proteasa Kex-2, se puede ser modificar genéticamente para eliminar las secuencias fusionadas de los polipéptidos expresados a medida que salen de la vía de secreción. La levadura también es susceptible de glicosilación en los motivos Asn-X-Ser/Thr.

iii. Células de insectos

Las células de insecto, que utilizan particularmente la expresión de baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos tales como polipéptidos de hialuronidasa. Las células de insecto expresan altos niveles de proteína y son susceptibles de la mayoría de las modificaciones post-traduccionales utilizadas por los eucariotas superiores. Los

5 baculovirus tienen una gama de anfitriones restringida, lo que mejora la seguridad y reduce los problemas reguladoras de la expresión eucariótica. Los vectores de expresión típicos utilizan un promotor para expresión de alto nivel, tal como el promotor de polihedrina de baculovirus. Los sistemas de baculovirus de uso común incluyen los baculovirus tales como el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) y el virus de la polihedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV) y una línea celular de insecto tal como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN_1). Para una expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula que se va a expresar se fusiona inmediatamente aguas abajo del codón de iniciación del virus de la polihedrina del virus. Las señales de secreción de mamíferos 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.

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

20 iv. Células de mamífero

25 Se pueden utilizar sistemas de expresión de mamíferos para expresar proteínas que incluyen polipéptidos de enzimas de degradación de hialuronano, tales como polipéptidos de hialuronidasa solubles. Los constructos de expresión se pueden transferir a células de mamífero por infección vírica tal como adenovirus o por transferencia directa de ADN tales como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamíferos incluyen típicamente un sitio de protección terminal de ARNm, una caja TATA, una secuencia de iniciación de la traducción (secuencia consenso de Kozak) y elementos de poliadenilación. También se pueden añadir elementos IRES para permitir la expresión bicistónica con otro gen, tal como un marcador seleccionable. Tales vectores incluyen a menudo promotores-potenciadores de la transcripción para un alto nivel de expresión, por ejemplo, el promotor-potenciador de SV40, el promotor de citomegalovirus humano (CMV) y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores-potenciadores son activos en muchos tipos de células. También se pueden utilizar promotores de tejidos y de tipo celular y regiones potenciadoras para la expresión. Las regiones promotoras/potenciadoras ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, aquellas de genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus de tumor mamario de ratón, albúmina, alfa-fetoproteína, alfa-1-antitripsina, beta-globina, proteína básica de mielina, cadena ligera 2 de miosina, y el control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica. Se pueden utilizar marcadores seleccionables para seleccionar y mantener células con el constructo de expresión. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, aminoglucósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa. Por ejemplo, la expresión se puede realizar 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 sobre la superficie celular.

45 Se encuentran disponibles muchas líneas celulares para la expresión en mamíferos, incluyendo células de ratón, rata, ser humano, mono, pollo y hámster. Las líneas celulares ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (sin secreción) y otras líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8 y HKB. También están disponibles líneas celulares adaptadas a medios libres de suero que facilitan 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 una expresión máxima. Por ejemplo, las células CHO DG44 se adaptan para crecer en cultivo en suspensión en un medio químicamente definido, libre de producto animal.

55 v. Plantas

60 Se pueden utilizar células de plantas y plantas transgénicas para expresar proteínas tales como las descritas en la presente memoria. Los constructos de expresión típicamente se transfieren a plantas utilizando la transferencia directa de ADN tal como bombardeo con microproyectiles y transferencia mediada por PEG a protoplastos, y con transformación mediada por agrobacterium. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias promotoras y potenciadoras, elementos de terminación de la transcripción y elementos de control de la traducción. Los vectores de expresión y las técnicas de transformación se dividen habitualmente entre dicotiledóneas anfitrionas, tales como *Arabidopsis* y el tabaco, y monocotiledóneas anfitrionas, tales como el maíz y el arroz. Los ejemplos de promotores

de plantas utilizados para la expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de la nopalina sintetasa, el promotor de la ribosa bisfosfato carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBI3. Los marcadores seleccionables tales como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa se utilizan a menudo para facilitar la selección y el mantenimiento de las células transformadas. Las células vegetales transformadas se pueden mantener en cultivo en forma de células, agregados (tejido de callo) o regeneradas en plantas enteras. Las células vegetales transgénicas también pueden incluir algas modificadas genéticamente 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.

10 c. Técnicas de Purificación

El método para la purificación de polipéptidos, incluyendo polipéptidos de enzimas de degradación de hialuronano (p.ej. polipéptidos de hialuronidasa solubles) u otras proteínas, a partir de células anfitriona dependerá de las células anfitrionas y de los sistemas de expresión elegidos. Para las moléculas secretadas, las proteínas generalmente se purifican a partir del medio de cultivo después de retirar las células. Para la expresión intracelular, las células se pueden lisar y las proteínas se pueden purificar 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. Además, la producción de animales transgénicos puede incluir la producción de polipéptidos en la leche o los huevos, que pueden ser recogidos, y si es necesario, las proteínas se pueden extraer y purificar adicionalmente utilizando métodos convencionales en la técnica.

Las proteínas, tales como polipéptidos de hialuronidasa solubles, se pueden purificar utilizando mecanismos convencionales de purificación de proteínas conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, SDS-PAGE, fraccionamiento por tamaño y cromatografía de exclusión por tamaño, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico. 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 las enzimas hialuronidasas en la purificación por afinidad. Los constructos de expresión también pueden ser modificados genéticamente para añadir una etiqueta de afinidad a una proteína tal como un epítipo myc, una fusión GST o His₆ y purificados por afinidad con anticuerpo para myc, resina de glutatión y resina de Ni, respectivamente. La pureza se puede evaluar por cualquier método conocido en la técnica incluyendo técnicas de electroforesis en gel y tinción y espectrofotométricas. Las composiciones de rHuPH20 purificadas, como las proporcionadas en la presente memoria, tienen típicamente una actividad específica de al menos 70.000 a 100.000 unidades/mg, por ejemplo, aproximadamente 120.000 unidades/mg. La actividad específica puede variar tras la modificación, por ejemplo con un polímero.

35 D. Composiciones y formulaciones de liberación sostenida de enzimas de degradación de hialuronano

Se proporcionan en la presente memoria composiciones y formulaciones de liberación sostenida o controlada que contienen una composición de enzima de degradación de hialuronano. También se proporcionan en la presente memoria composiciones y formulaciones de liberación sostenida o controlada que contienen una enzima de degradación de hialuronano y otro agente terapéutico para la HBP, tal como un inhibidor de la 5-alfa reductasa. La enzima de degradación de hialuronano en las composiciones y formulaciones de liberación sostenida son estables y conservan la actividad hialuronidasa que no está formulada de este modo. Las formulaciones de liberación sostenida incluyen aquellas que permiten la liberación sostenida, impiden el acceso a la circulación general y aumentan la localización específica en la próstata de las composiciones. Los ejemplos no limitantes de las formulaciones de liberación sostenida incluyen, por ejemplo, formulaciones de depósito y vesículas de membrana lipídica que contienen una enzima de degradación de hialuronano.

50 1. Composiciones de enzimas de degradación de hialuronano

Las composiciones farmacéuticamente aceptables se preparan teniendo en cuenta las aprobaciones para una agencia reguladora u otra agencia preparada de acuerdo con la farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y en seres humanos. Los compuestos se pueden formular en cualquier preparación farmacéutica adecuada para cualquier administración oral, subcutánea, intravenosa e intraprostática tal 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 p.ej., Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Cuarta Edición, 1985, 126. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

Se contempla en la presente memoria la introducción directa de la enzima en la próstata caracterizada generalmente por medio de inyección o infusión. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Las preparaciones para administración intraprostática incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos solubles secos estériles, tales como polvos liofilizados, listos para ser combinados

con un disolvente justo antes del uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para inyección, productos insolubles secos estériles listos para ser combinados con un vehículo justo antes del uso, emulsiones estériles, geles estériles y soluciones estériles que forman geles en el organismo. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas. Por lo tanto, las composiciones se pueden formular en forma liofilizada o líquida.

5 Cuando las composiciones se proporcionan en forma liofilizada, se pueden reconstituir justo antes de su uso mediante un tampón apropiado, por ejemplo, una solución salina estéril.

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 en forma de una preparación concentrada para ser diluida hasta una concentración terapéuticamente eficaz antes de su uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p.ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p.ej., lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p.ej., aceite de almendras, ésteres oleosos o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p.ej., p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico).

En otro ejemplo, las preparaciones farmacéuticas se pueden presentar en forma liofilizada para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Por ejemplo, los polvos liofilizados se pueden reconstituir para su administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. También se pueden reconstituir y formular como sólidos o geles. El polvo liofilizado estéril se prepara disolviendo un compuesto activo en una solución tampón. La solución tampón puede contener un excipiente que mejore la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituida, preparada a partir del polvo. La subsiguiente filtración en condiciones estériles de la solución seguida de 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, sorbital, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado, en un tampón adecuado, tal como citrato, fosfato de sodio o potásico u otro tampón semejante conocido por los expertos en la técnica. A continuación, se añade un compuesto seleccionado a la mezcla resultante, y se agita hasta que se disuelve. La mezcla resultante se filtra en condiciones estériles o se trata para eliminar las partículas y asegurar la esterilidad, y se reparte en viales para la liofilización. Cada vial contendrá una dosis única o dosis múltiples del compuesto. El polvo liofilizado se puede almacenar en condiciones apropiadas, tales como de aproximadamente 4°C a la temperatura ambiente. La reconstitución de este polvo liofilizado con una solución tampón proporciona una formulación para su uso en la administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores tales como un diluyente, coadyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la hialuronidasa. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o agente, generalmente en forma purificada o parcialmente purificada, junto con una cantidad adecuada de portador de modo que proporcione la forma para la administración apropiada al paciente. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. El agua es un portador típico. También se pueden emplear disoluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol 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 las mismas, povidona, crospovidonas y otros aglutinantes semejantes conocidos por los expertos en la técnica. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua y etanol. Por ejemplo, los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Una composición, si se desea, también puede contener otras cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores de pH, estabilizadores, potenciadores de la solubilidad y otros agentes semejantes, tales como, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas.

Los portadores farmacéuticamente aceptables utilizados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes osmóticos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, dextrosa e inyección 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 cacahuate. Se pueden añadir agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a preparaciones parenterales envasadas en recipientes de dosis múltiples, que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres de ácido p-

hidroxibenzoico de metilo y propilo, 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 clorhidrato de procaína. Los agentes de suspensión y dispersión incluyen carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilmetilcelulosa 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 el ajuste del pH.

Las composiciones de una enzima de degradación de hialuronano son generalmente estables durante días, semanas o años en un amplio intervalo de temperaturas. Por ejemplo, las composiciones de enzimas de degradación de hialuronano son estables a temperaturas entre 4°C y 37°C, y en particular a temperaturas de al menos 5°C, 25°C, 30°C o 37°C. Las enzimas de degradación de hialuronano son estables durante al menos 1 mes, 6 meses, 1 año 2 años o más. Generalmente, las composiciones son estables durante al menos 2 años entre 2°C y 8°C.

Entre los tipos de estabilizadores que se pueden incluir en las composiciones de enzimas de degradación de hialuronano están incluidos aminoácidos, derivados de aminoácidos, aminas, polioles y otros agentes. Los estabilizadores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, poloxámero 188 (p.ej. Pluronic® F68), polisorbato 80 (PS80), polisorbato 20 (PS20), L-arginina, glutamina, lisina, metionina, prolina, Lys-Lys, Gly-Gly, óxido de trimetilamina, betaína, glicerol, sorbitol, manitol, inositol, sacarosa, trehalosa, cloruro de magnesio, cinc, albúmina de suero (tal como albúmina de suero humano), ácido fenilbutírico, taurocolato, polivinilpirrolidona (PVP), dextrano y polietilenglicol (PEG).

En algunos ejemplos, se incluyen oligómeros de ácido hialurónico (HA) en las formulaciones proporcionadas en la presente memoria para estabilizar las enzimas de degradación de hialuronano. El ácido hialurónico (HA, también conocido como hialuronano y hialuronato) es el sustrato natural para las enzimas de degradación de hialuronano tales como las hialuronidasas solubles, incluyendo rHuPH20. El HA es un glicosaminoglicano no sulfatado que está ampliamente distribuido a lo largo de los tejidos conectivos, epiteliales y neurales. Es un polímero de hasta 25.000 unidades disacáridas, compuestas a su vez de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina. El peso molecular del HA oscila entre aproximadamente 5 kDa y 20.000 kDa. Mediante la catálisis de la hidrólisis de hialuronano, las enzimas de degradación de hialuronano, por ejemplo hialuronidasas solubles tales como rHuPH20, disminuyen la viscosidad del hialuronano, aumentando de este modo la permeabilidad del tejido y aumentando la tasa de absorción de fluidos administrados por vía parenteral.

Como se demuestra en la presente memoria, el ácido hialurónico (HA) es un estabilizador eficaz de enzimas de degradación de hialuronano, por ejemplo hialuronidasas solubles tales como rHuPH20. En particular, el hialuronano es un estabilizador eficaz en presencia de agentes y condiciones desestabilizantes, tales como, por ejemplo, baja concentración de sal, pH elevado y temperaturas elevadas. De este modo, se proporcionan en la presente memoria composiciones que contienen HA y una enzima de degradación de hialuronano. Se puede utilizar cualquier tamaño de HA en las composiciones como estabilizador. En algunos ejemplos, el peso molecular del HA es desde, o desde aproximadamente 5 kDa hasta, o hasta aproximadamente 5.000 kDa; desde, o desde aproximadamente 5 kDa hasta, o hasta aproximadamente 1.000 kDa; desde, o desde aproximadamente 5 kDa hasta, o hasta aproximadamente 500 kDa; o desde, o desde aproximadamente 5 kDa hasta, o hasta aproximadamente 200 kDa. Por ejemplo, se incluyen entre las composiciones proporcionadas en la presente memoria de HA y una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble (p.ej. RHuPH20), aquellas que contienen HA que tiene un peso molecular de al menos o aproximadamente al menos 5 kDa, 6 kDa, 7 kDa, 8 kDa, 9 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 60 kDa, 70 kDa, 80 kDa, 90 kDa, 100 kDa, 120 kDa, 140 kDa, 160 kDa, 180 kDa, 200 kDa, 220 kDa, 240 kDa, 260 kDa, 280 kDa, 300 kDa, 3500 kDa, 400 kDa, 450 kDa, o 500 kDa.

Los oligómeros de HA se incluyen en composiciones de una enzima de degradación de hialuronano de o entre 1 mg/mL y 100 mg/mL, tal como 1 mg/mL y 20 mg/mL, y en particular al menos o aproximadamente al menos 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL, 10 mg/mL, 11 mg/mL, 12 mg/mL, 13 mg/mL, 14 mg/mL, 14 mg/mL, 15 mg/mL, 16 mg/mL, 17 mg/mL, 18 mg/mL, 19 mg/mL, 20 mg/mL o más HA. Las formulaciones estables ilustrativas de una enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo una hialuronidasa soluble tal como rHuPH20, incluyen desde o desde aproximadamente 8 mg/mL hasta o hasta aproximadamente 15 mg/mL de HA, tal como, por ejemplo, 10 mg/mL o aproximadamente 10 mg/mL o 15 mg/mL o aproximadamente 15 mg/mL. En algunos ejemplos, la razón molar de HA con respecto a la enzima de degradación de hialuronano es o es de aproximadamente 5000:1, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1900:1, 1800:1, 1700:1, 1650:1, 1600:1, 1500:1, 1400:1, 1300:1, 1200:1, 1100:1, 1000:1, 900:1, 800:1, 700:1, 600:1, 500:1, 100:1, 90:1, 80:1, 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:500, 1:600, 1:700, 1:800, 1:900, 1:1000, 1:1100, 1:1200, 1:1300, 1:1400, 1:1500, 1:1600, 1:1700, 1:1800, 1:1900, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000 o menos.

En algunos ejemplos, una formulación estabilizada convencional de una enzima de degradación de hialuronano

como la proporcionada en la presente se formula con uno o más de EDTA, NaCl, CaCl₂, histidina, lactosa, albúmina, Pluronic® F68, TWEEN® y/u otros detergentes u otros agentes similares. Por ejemplo, las composiciones proporcionadas en la presente memoria pueden contener uno o más tampones de pH (tales como, por ejemplo, histidina, fosfato u otros tampones), o tampón ácido (tal como acetato, citrato, piruvato, Gly-HCl, succinato, lactato, maleato u otros tampones), estabilizadores, agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético, etilendiaminotetraacetato o EDTA de calcio, captador de oxígeno, tal como metionina, ácido ascórbico/ascorbato, ácido cítrico/citrato o albúmina, y/o un conservante, tal como un conservante que contiene un anillo aromático (p.ej. fenol o cresol).

Por ejemplo, los tampones que se pueden incluir en las co-formulaciones proporcionadas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, Tris (Trometamina), histidina, tampones de fosfato, tales como fosfato de sodio dibásico y tampones de citrato. Tales agentes tamponadores pueden estar presentes a concentraciones entre o aproximadamente 1 mM y 100 mM, por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente o 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, o más.

Los estabilizadores ilustrativos que son útiles para composiciones que contienen una enzima de degradación de hialuronano incluyen detergentes, tales como polisorbatos y proteínas tales como albúmina de suero humano. Las concentraciones ilustrativas de albúmina de suero que son útiles en las composiciones de la presente invención incluyen entre 0,1 mg/mL y 1 mg/mL, por ejemplo al menos o 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,8 mg/mL, 0,9 mg/mL o 1 mg/mL, pero puede ser más o menos. Los polisorbatos también pueden estar presentes en las composiciones, por ejemplo, a concentraciones de, o de aproximadamente 0,001% a 0,1%, por ejemplo al menos o 0,001%, 0,002%, 0,003%, 0,004%, 0,005%, 0,006%, 0,007%, 0,008%, 0,009%, 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09% o 0,1%. También puede estar presente un agente quelante metálico, tal como EDTA de calcio (CaEDTA), tal como por ejemplo, a concentraciones comprendidas entre aproximadamente 0,02 mM y 20 mM, tal como al menos o 0,02 mM, 0,04 mM, 0,06 mM, 0,08 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM o más. El pH y la osmolaridad de las composiciones pueden ser ajustados por un experto en la materia para optimizar las condiciones para la actividad deseada y la estabilidad de la composición. En algunos ejemplos, las composiciones proporcionadas en la presente memoria tienen una osmolaridad de, o de aproximadamente, entre 100 mOsm/kg y 500 mOsm/kg, por ejemplo al menos, o aproximadamente 100 mOsm/kg, 120 mOsm/kg, 140 mOsm/kg, 160 mOsm/kg, 180 mOsm/kg, 200 mOsm/kg, 220 mOsm/kg, 260 mOsm/kg, 280 mOsm/kg, 300 mOsm/kg, 320 mOsm/kg, 360 mOsm/kg, 380 mOsm/kg, 400 mOsm/kg, 420 mOsm/kg, 440 mOsm/kg, 460 mOsm/kg, 500 o más mOsm/kg, y un pH de, o de aproximadamente, 6, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8 ó 8.

Generalmente se proporciona NaCl en las formulaciones de la presente invención, por ejemplo, en una cantidad que es, o es aproximadamente 100 mM - 150 mM o más. Por ejemplo, una formulación ilustrativa puede contener histidina 10 mM o aproximadamente 10 mM y/o NaCl 130 mM o aproximadamente 130 mM. Otras formulaciones pueden contener además o alternativamente lactosa, por ejemplo, a, o aproximadamente a, 13 mg/mL. Adicionalmente, puede estar presente en la formulación un agente anti-bacteriano o antifúngico, incluyendo, pero no limitado a timerosal. Las formulaciones pueden contener adicionalmente albúmina, Pluronic® F68, TWEEN® y/u otro detergente. Las formulaciones se proporcionan a un pH que es, o está aproximadamente entre, 6,0 y 7,4, por ejemplo al menos o 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 o 7,4, generalmente que es, o es aproximadamente, pH 6,5. Las formulaciones concentradas de una enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo una hialuronidasa soluble tal como rHuPH20 para su uso en la presente invención, se diluyen generalmente en una solución salina u otra solución salina tamponada antes de la administración para mantener la concentración de sal apropiada.

Las composiciones farmacéuticas de hialuronidasas solubles, por ejemplo, la PH20 recombinante denominada rHuPH20, son conocidas en la técnica (véanse p.ej., las Solicitudes de los Estados Unidos publicadas Núm. 20040268425, 20050260186 y 20060104968).

2. Formulaciones de liberación sostenida

Las composiciones enzimáticas de degradación de hialuronano se proporcionan en formulaciones de liberación sostenida o controlada. En algunos ejemplos, las formulaciones de liberación sostenida o controlada también contienen un segundo agente terapéutico, por ejemplo, un agente terapéutico para la HBP. Las formulaciones se pueden formular para inyección local. Por ejemplo, las formulaciones se formulan para inyecciones intraprostáticas, tales como mediante inyección transrectal, transuretral o transperineal en la próstata.

Las formulaciones de liberación sostenida ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, vesículas lipídicas que incluyen vesículas unilamelares (VUL) y vesículas multilamelares (VML), complejos fármaco-resina (resinatos) y formulaciones de depósito. Tales formulaciones de liberación sostenida o controlada son conocidas por un experto

en la técnica. Por ejemplo, se puede encapsular una enzima de degradación de hialuronano en un sistema de dispersión coloidal o en cristales estabilizados con polímero. Los sistemas de dispersión coloidal útiles incluyen nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Algunos ejemplos de productos conjugados de lípido-polímero y liposomas se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.631.018, que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad. Los ejemplos de los procedimientos para fabricar liposomas multilamelares y unilamelares son conocidos en la técnica (véanse p.ej. las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.522.803, 4.310.506, 4.235.871, 4.224.179, 4.078.052, 4.394.372, 4.308.166, 4.485.054 y 4.508.703). Otros ejemplos de vehículos de suministro de liberación lenta son matrices de hidrogel biodegradables (Patente de Estados Unidos Núm. 5.041.292), productos conjugados de polímero dendrítico (Patente de Estados Unidos Núm. 5.714.166), y liposomas multivesiculares (Depofoam®, Depotech, San Diego, Calif.) (Patentes de Estados Unidos Núm. 5.723.147 y 5.766.627). Un tipo de microesferas adecuadas para encapsular las composiciones para inyección local, por ejemplo en la próstata, son microesferas de poli (D,L-lactida), como describen Fletcher, D. Anesth. Analg. 84: 90- 94 (1997).

En particular, las formulaciones de liberación sostenida proporcionadas en la presente memoria se pueden diseñar de tal manera que la enzima (u otro agente o agentes) se libere a una velocidad predeterminada o de tal manera que se mantenga un nivel constante de fármaco durante un período de tiempo específico. En particular, las formulaciones permiten una liberación controlada de la enzima de degradación de hialuronano (u otro agente o agentes) al tejido local, tal como tejido prostático. La velocidad de liberación es suficientemente lenta de manera que el efecto resultante de la enzima sobre la degradación de HA en el tejido (p.ej. estroma) se prolongue durante muchas horas, días, semanas o meses. Por ejemplo, la liberación de la hialuronidasa y otros agentes terapéuticos una vez introducidos en la próstata puede ser de aproximadamente 24 horas, 36 horas o 48 horas a aproximadamente 90 días. Por ejemplo, se proporcionan formulaciones de liberación sostenida que permiten dosificar la formulación al menos una vez por semana, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, una vez cada siete meses, una vez cada ocho meses, una vez cada nueve meses, una vez cada diez meses, una vez cada once meses, o una vez al año por medio de inyección local en el tejido, por ejemplo por medio de inyección intraprostática. La velocidad de liberación y la duración óptimas para las formulaciones de liberación sostenida de una enzima de degradación de hialuronano pueden ser determinadas por los expertos en la técnica basándose en las propiedades farmacológicas de los agentes específicos, la gravedad de la afección, la edad y la salud del sujeto, y otros factores.

Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar empíricamente si la velocidad de liberación de la enzima o el nivel del fármaco son suficientes para producir un efecto sobre el tejido local, tal como el tejido prostático. Por ejemplo, se puede examinar el tamaño de la próstata (p.ej. retracción). En otros ejemplos, la degradación de HA en el tejido local (p.ej. estroma) se puede controlar con el tiempo mediante histología, u otro método, de una muestra de tejido, por ejemplo una muestra de próstata, tal como de una muestra de biopsia. En un ejemplo adicional, se puede medir la actividad de la enzima de degradación de hialuronano liberada en la sangre o suero. Se puede realizar cualquier análisis conocido por un experto en la técnica para medir la hialuronidasa en el plasma. Por ejemplo, se puede realizar un análisis de microturbidez o un análisis enzimático sobre la proteína en plasma. Se entiende que el plasma contiene normalmente enzimas hialuronidasa. Tales enzimas hialuronidasa del plasma tienen típicamente actividad a un pH ácido (Patente de Estados Unidos Núm. 7.105.330). Por lo tanto, antes del tratamiento con una formulación de liberación sostenida como se describe en la presente memoria, se deben determinar los niveles plasmáticos de hialuronidasa y utilizarlos como referencia. Se pueden comparar mediciones posteriores de los niveles de hialuronidasa plasmática después del tratamiento con los niveles previos a los tratamientos. Alternativamente, el análisis se puede realizar en condiciones de pH que suprimen la actividad de hialuronidasa lisosómica endógena en el plasma, que normalmente muestra actividad a pH ácido. Así, cuando la enzima de degradación de hialuronano es activa a pH neutro (p.ej. PH20 humana), solo se mide el nivel de la enzima activa en condiciones neutras.

Adicionalmente, las formulaciones de liberación sostenida proporcionadas en la presente memoria se pueden diseñar de tal manera que la enzima de degradación de hialuronano sea relativamente estable y activa. Por ejemplo, se proporcionan las formulaciones de liberación sostenida de manera que la actividad de la enzima de degradación de hialuronano total de la formulación sea de, o esté entre, 25.000 U/mg y 200.000 U/mg, por ejemplo 40.000 U/mg y 150.000 U/mg, tal como 75.000 U/Mg y 120.000 U/mg y en particular al menos o 40.000 U/mg, 50.000 U/mg, 60.000 U/mg, 70.000 U/mg, 80.000 U/mg, 90.000 U/mg, 100.000 U/mg, 110.000 U/mg, 120.000 U/mg, 130.000 U/mg, 140.000 U/mg, 150.000 U/mg o más. En particular, las formulaciones de liberación sostenida están diseñadas de modo que la estabilidad se produzca a temperaturas de o entre 2°C y 37°C, por ejemplo, de 4°C a 25°C y en particular de o entre 2°C a 8°C o de o entre 20°C y 30°C, tal como, o aproximadamente, 25°C. En los ejemplos particulares, las formulaciones de liberación sostenida son estables en condiciones de almacenamiento durante al menos 1 semana, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, 1 año, 2 años o más.

En los ejemplos de la presente memoria, se proporcionan formulaciones de liberación sostenida que contienen una

enzima de degradación de hialuronano y otro agente terapéutico para tratar una enfermedad o afección deseadas. Por ejemplo, si la enfermedad o afección es la HBP, se pueden preparar formulaciones de liberación sostenida que, además de una enzima de degradación de hialuronano, también contienen otro agente adecuado para el tratamiento de la HBP. Las formulaciones combinadas de liberación sostenida proporcionan una actividad prolongada de larga duración de al menos dos agentes para el tratamiento de la enfermedad o afección. La terapia combinada para el tratamiento de la HBP se describe adicionalmente en la Sección F de la presente memoria. Por lo tanto, cualquiera de los agentes terapéuticos expuestos en la Sección F puede ser co-formulado con una enzima de degradación de hialuronano en las formulaciones de liberación sostenida de la presente memoria.

10 A continuación se proporcionan ejemplos no limitantes de formulaciones de liberación sostenida y formulaciones ilustrativas.

a. Formulación en gel de depósito

15 Las composiciones de enzimas de degradación de hialuronano se pueden administrar en forma de una formulación en gel de depósito que permite la liberación sostenida, impide el acceso a la circulación general y aumenta la localización específica de la próstata de las composiciones. Los expertos en la técnica están familiarizados con materiales y métodos que se pueden utilizar para formular fármacos individuales y combinaciones como líquidos inyectables, geles o pastas que se pueden depositar en el organismo con velocidades de liberación y duraciones predeterminadas.

20 Las composiciones se pueden proporcionar en un gel o formar un gel después de la administración, que es típicamente por medio de inyección. Los geles se pueden suministrar como composiciones líquidas que contienen un material que forma un gel después de la introducción en el organismo. Se puede preparar una solución que contiene el material formador de gel y la enzima de degradación de hialuronano combinando el material formador de gel y la enzima en solución utilizando cualquier método adecuado, p.ej., añadiendo la enzima a una solución que contiene el material formador de gel. La solución forma un gel después de la introducción en el organismo, p.ej., al contactar con un fluido fisiológico.

25 La liberación de los agentes desde el gel puede ocurrir por cualquier mecanismo, p.ej., por difusión de los agentes fuera del gel, como resultado de la rotura del gel, o ambos. El material formador de gel puede contener también algunos otros materiales, tales como un sólido, que pueden modular la liberación de la enzima u otros agentes terapéuticos.

30 Se puede utilizar una variedad de materiales formadores de gel diferentes. Generalmente, el gel es un hidrogel, un gel que contiene una cantidad sustancial de agua, es biocompatible y el gel es biodegradable. Los materiales formadores de gel incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos tales como alginato y formas modificadas del mismo, otros precursores poliméricos de hidrogeles incluyen polímeros de bloque de poli(óxido de etileno)-polipropilenglicol tal como Pluronic® o Tetronics® (BASF, Florham Park, Nueva Jersey) que se entrecruzan mediante enlaces de hidrógeno y/o por cambio de temperatura, mezclas de polímeros, p.ej., una mezcla de poli(óxido de etileno) y poli(ácido acrílico) que se gelifica por enlaces de hidrógeno durante el mezclado y otros materiales formadores de gel solubles (Patente de Estados Unidos Núm. 6.129.761). Otros hidrogeles adecuados se describen en Peppas, N.A., et al. (2000) Eur J Pharm Biopharm. 50(1): 27-46; Megeed, Z., et al., (2002) Pharm Res. 19(7): 954-9 y Patente de los Estados Unidos Núm. 6129761. Un aditivo adecuado para formar un gel inyectable es un agente gelificante de calidad médica. Uno de tales agentes gelificantes es el polvo estéril Gelfoam® (Pfizer, Nueva York). Gelfoam® es un polvo de gelatina que contiene partículas en el intervalo de tamaño de 40-60 micras.

35 Las formulaciones en gel de depósito para su uso en las formulaciones de degradación de hialuronano proporcionadas en la presente memoria también pueden incluir composiciones en gel de fosfolípidos que contienen de 20 a 80%, tal como de 25 a 70% en peso, por ejemplo de 30 a 60% en peso de uno o más fosfolípidos y de 0,1 a 70% en peso de agua de manera que la composición en gel puede ser extruida a través de una aguja para inyectables. Los depósitos de fosfolípidos son geles monofásicos que pueden ser acuosos o sustancialmente anhidros. Así, en algunos ejemplos, en lugar de agua, las composiciones en gel de fosfolípidos monofásicos se pueden preparar con 5 a 60%, tal como 10 a 50%, por ejemplo 20 a 40% en peso de un componente no acuoso. El componente no acuoso puede ser un azúcar, un aceite o un disolvente. Por ejemplo, el aceite puede ser aceite de sésamo, aceite de cadena media, oleato de etilo o triglicérido sintético. Tales composiciones en gel de depósito de fosfolípidos monofásicos se describen con detalle en la Solicitud Internacional Publicada PCT Núm. WO2011/075623. Tales formulaciones en gel de depósito son particularmente útiles para disolver agentes insolubles en agua o hidrófobos, tales como finasterida y otros agentes terapéuticos para la HBP. Las composiciones en gel monofásicas se pueden utilizar para preparar formulaciones de depósito que contienen una enzima de degradación de hialuronano y otro fármaco terapéutico que es un fármaco hidrófobo, tal como finasterida.

b. Liposomas multivesiculares (LMV)

Se proporcionan en la presente memoria vesículas de membrana sintéticas, tales como formulaciones de liposomas multivesiculares (LMV), que tienen encapsulada en los mismos una enzima de degradación de hialuronano, y en particular una hialuronidasa tal como PH20 o PH20 soluble o recombinante. En algunos ejemplos descritos en la presente memoria, se proporcionan coformulaciones de LMV que contienen adicionalmente la encapsulación de otro fármaco terapéutico. Las formulaciones de liposomas multivesiculares contienen partículas microscópicas, esféricas compuestas por numerosas cámaras acuosas no concéntricas que encapsulan un fármaco o un agente que se va a suministrar. Las cámaras individuales están separadas por membranas de bicapas lipídicas compuestas por duplicados sintéticos o lípidos naturales, dando como resultado un vehículo de suministro que es biocompatible y biodegradable. En los ejemplos de la presente memoria, las enzimas de degradación de hialuronano u otros agentes terapéuticos que son hidrófilos se pueden encapsular en la fase acuosa. En otros ejemplos de la presente memoria, se proporciona una co-formulación de LMV por co-encapsulación de un fármaco hidrófilo y un fármaco hidrófobo en la misma formulación. Por ejemplo, en tales co-formulaciones de LMV, la enzima de degradación de hialuronano se encapsula en la fase acuosa y un fármaco hidrófobo, por ejemplo finasterida o dutasterida, se intercala en la fase lipídica.

Las vesículas de membrana se pueden utilizar en métodos para suministrar una enzima de degradación de hialuronano, y si se desea también otro agente, a un sujeto para ser utilizado como un coadyuvante, agente de extensión o terapéutico. En particular, las vesículas de membrana se proporcionan en composiciones farmacéuticas para su uso como un agente terapéutico. Por ejemplo, las enzimas de degradación de hialuronano, y en particular las vesículas de membrana que contienen enzimas de degradación de hialuronano, se pueden utilizar en métodos, usos y procedimientos para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata (HBP). Los ejemplos de vesículas de membrana son aquellas que logran liberación controlada o sostenida de la enzima de degradación de hialuronano.

Los liposomas multivesiculares (LMV) proporcionados en la presente memoria se fabrican basándose en procedimientos conocidos por los expertos en la técnica (véase p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 5.723.147; 5.766.627; 6.106.858; 6.306.432; 5.962.016; 6.241.999; la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. US2007/0235889 y US2010/030550; y la Solicitud Internacional publicada Núm. WO02/096368). En la generación de tales liposomas, cualquiera de las composiciones enzimáticas de degradación de hialuronano descritas anteriormente en la Sección C, o conocidas por un experto en la técnica, se pueden encapsular dentro de los liposomas multivesiculares. En resumen, una emulsión de "agua-en-aceite" que contiene una enzima de degradación de hialuronano que se va a encapsular se prepara primero disolviendo lípidos anfipáticos y lípidos neutros en un disolvente orgánico volátil para el componente lipídico, añadiendo al componente lipídico un primer componente acuoso no miscible que contiene la enzima y/u otro agente que se vaya a encapsular y una o más moléculas coadyuvantes, *es decir* excipientes osmóticos, que proporcionan propiedades útiles y beneficiosas a los LMV. La mezcla se emulsiona mediante mezclado, por ejemplo, mecánicamente mediante mezclado, agitación, sonicación, por energía ultrasónica, atomización con boquilla, o combinaciones de los mismos. La enzima de degradación de hialuronano que se va a encapsular puede estar contenida en el primer componente acuoso o el componente lipídico o ambos. La emulsión de agua en aceite en su totalidad se mezcla a continuación con el segundo componente acuoso y después se agita mecánicamente, como se ha indicado anteriormente, para formar esferas de disolvente suspendidas en el segundo componente acuoso. Las esférulas de disolvente contienen múltiples gotitas acuosas con la sustancia que se va a encapsular disuelta en ellas. El disolvente orgánico volátil se elimina, por ejemplo por evaporación, de las esférulas. Cuando el disolvente se evapora completamente, se forman liposomas multivesiculares. Los LMV se resuspenden, se lavan y se almacenan en una tercera solución acuosa tal como solución salina o tampón adecuado que permite la estabilidad de las partículas a temperaturas de almacenamiento. Los gases representativos satisfactorios para su uso en la evaporación del disolvente incluyen nitrógeno, helio, argón, oxígeno, hidrógeno y dióxido de carbono. Alternativamente, el disolvente orgánico se puede eliminar por purgado, evaporación rotatoria o membranas selectivas para el disolvente.

Generalmente, la encapsulación satisfactoria sólo se puede conseguir para moléculas hidrófilas. Como se describe más adelante, se encuentra en la presente memoria que las moléculas hidrófobas se pueden incorporar a la bicapa lipídica disolviendo los lípidos y el fármaco hidrófobo en un disolvente orgánico antes de mezclar con un primer componente acuoso que contiene el fármaco hidrófilo (p.ej. una enzima de degradación de hialuronano). Por lo tanto, los métodos de la presente memoria se pueden utilizar para generar también co-formulaciones de LMV por co-encapsulación de un fármaco hidrófobo e hidrófilo en la misma formulación.

Se pueden utilizar muchos tipos diferentes de disolventes hidrofóbicos volátiles, tales como éteres, éteres halogenados, hidrocarburos, ésteres, hidrocarburos halogenados o Freones como disolvente de la fase lipídica. Por ejemplo, se pueden utilizar éter dietílico, isopropilo y otros éteres, cloroformo, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, acetato de etilo, Forane y combinaciones de los mismos para preparar liposomas multivesiculares.

Se pueden utilizar diversos tipos de lípidos para elaborar liposomas multivesiculares, siempre que el componente lipídico contenga un lípido neutro y un lípido anfipático. Los ejemplos de lípidos neutros incluyen diglicéridos, tales como dioleína, dipalmitoleína; ésteres de propilenglicol tales como diésteres mixtos de ácidos caprílico/cáprico sobre propilenglicol; triglicéridos tales como trioleína, tripalmitoleína, trilinoleína, tricaprilina y trilaurina; aceites vegetales,

tales como aceite de soja; grasa o manteca de ternera; escualeno; tocoferol; y combinaciones de los mismos. En los ejemplos particulares, los lípidos neutros de liberación lenta incluyen, por ejemplo, trioleína, tripalmitoleína, triristoleína, trilaurina y tricaprina. Los lípidos neutros de liberación rápida incluyen, por ejemplo, tricaprilina y tricaproína y mezclas de las mismas. Los ejemplos de lípidos anfipáticos incluyen aquellos con carga neta negativa, carga neta cero y carga positiva neta a pH 7,4. Estos incluyen lípidos zwitteriónicos, ácidos o catiónicos. Tales lípidos anfipáticos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), fosfatidilserina (PS), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomielina, diaciltrimetilamoniopropano DITAP) y combinaciones de los mismos. Adicionalmente, se pueden utilizar colesterol o esteroides vegetales para elaborar liposomas multivesiculares. El componente lipídico elegido también puede ser uno que tenga un punto de fusión por debajo de la temperatura a la que se va a almacenar y/o utilizar el LMV (véase p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 5.962.016).

En los ejemplos de las vesículas de membrana sintética proporcionadas en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano, y en particular una hialuronidasa tal como PH20 o PH20 recombinante, se encapsula en presencia de uno o más excipientes que conservan o aumentan la estabilidad de la enzima y/o aumentan la velocidad de encapsulación de la enzima. En ejemplos particulares, el excipiente es ácido hialurónico (también denominado hialuronano, HA). Por ejemplo, se proporcionan en la presente memoria liposomas multivesiculares (LMV) para la liberación sostenida o controlada que han encapsulado en ellos una enzima de degradación de hialuronano y en particular una hialuronidasa tal como PH20 o PH20 recombinante y uno o más excipientes que conservan o mejoran la estabilidad de la enzima y/o aumentan la velocidad de encapsulación de la enzima.

Los ejemplos de los mezcladores que se pueden utilizar en los métodos proporcionados son los homogeneizadores (también llamados cizallas), por ejemplo, homogeneizadores de laboratorio de alta cizalla, que se pueden utilizar, por ejemplo, para emulsionar la primera fase acuosa y el disolvente, p.ej., cloroformo, o emulsionar la primera emulsión con la segunda fase acuosa. Los ejemplos de homogeneizadores que se pueden utilizar en los métodos proporcionados son homogeneizadores de alta cizalla, por ejemplo, mezcladores Omni comercializados por Omni International, Kennesaw, GA, por ejemplo, un homogeneizador Omni Macro o un homogeneizador Omni Macro ES, que tienen motores de 1.800 vatios, control de velocidad de 1.000 a 20.000 rpm, volumen de procesamiento de muestras de 0,25 mL a 30 L, y conjuntos de cuchillas variables para mezclar.

El tamaño de partícula del LMV resultante puede variar. Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar el tamaño de una vesícula de membrana y seleccionar una vesícula basándose en una aplicación deseada. Por ejemplo, se puede realizar el análisis del tamaño de partícula, por ejemplo utilizando un analizador de tamaño de partícula de difracción láser. En algunos ejemplos, las vesículas de membrana proporcionadas en la presente memoria tienen un diámetro medio que está comprendido entre aproximadamente 0,5 μm y 100 μm , por ejemplo al menos, o aproximadamente 0,5 μm , 1 μm , 5 μm , 10 μm , 15 μm , 20 μm , 50 μm o 100 μm .

Las formulaciones o co-formulaciones de LMV resultantes se pueden diluir o suspender adicionalmente por adición de un medio de suspensión u otro portador biológicamente aceptable para obtener formulaciones de depósito de liberación lenta inyectables o implantables. Los portadores adecuados comunes incluyen soluciones suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Los ejemplos de soluciones no acuosas son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones acuosas alcohólicas, emulsiones o suspensiones, incluyendo medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen soluciones de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y solución de Ringer con lactato añadido. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer). También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes (véase, Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed., A. Oslo, ed., Mack, Easton, Pa. 1980).

En la presente memoria se proporcionan composiciones estables de formulaciones de LMV encapsulados con una enzima de degradación de hialuronano. También se proporcionan composiciones estables de co-formulaciones de LMV encapsulados con una enzima de degradación de hialuronano y un fármaco hidrófobo, en particular un fármaco tal como finasterida, diasturida u otro fármaco adecuado. Las formulaciones o co-formulaciones son estables entre 2°C y 32°C durante al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos diez meses, al menos once meses, al menos un año, al menos dos años o más. Por ejemplo, las formulaciones o co-formulaciones son estables a una temperatura de 2°C a 8°C durante al menos un año o al menos 2 años. En otro ejemplo, las formulaciones de co-formulaciones son estables a 28°C-32°C durante al menos 6 meses o al menos un año.

i. Parámetros para mejorar la encapsulación, la estabilidad y la velocidad de liberación

Al generar formulaciones de LMV como se ha descrito anteriormente, se ha encontrado en la presente memoria que la eficacia de encapsulación, la estabilidad y la velocidad de liberación de una enzima de degradación de

hialuronano pueden ser modificadas (p.ej. aumentadas o mejoradas) basándose en parámetros y condiciones particulares. Por ejemplo, se pueden emplear métodos para aumentar la eficacia de encapsulación de la enzima de degradación de hialuronano. La eficacia con la que un agente (p.ej. enzima de degradación de hialuronano) se encapsula se puede modular modificando el número de carbonos en la cadena carbonada de al menos uno de los lípidos anfipáticos utilizados en la preparación de la formulación liposomal. Por ejemplo, el eficacia de la encapsulación se puede incrementar aumentando el número de carbonos en la cadena carbonada de al menos uno de los lípidos anfipáticos utilizados en la preparación de la formulación liposomal (véase p.ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 6.241.999). Una lista no limitante de lípidos anfipáticos de cadena larga que se pueden utilizar en la generación de liposomas multivesiculares en la presente invención incluye, por ejemplo: DOPC o DC18:1PC = 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina; DLPC o DC12:0PC = 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfolina; DMPC o DC14:0PC = 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina; DPPC o DC16:0PC=1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina; DSPC o DC18:0PC=1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina; DAPC o DC20:0PC=1,2diaraquidil-sn-glicero-3-fosfolina; DBPC o DC22:0PC=1,2-dibehenoil-sn-glicero-3-fosfolina; DC14:1PC=1,2-dimiristoleil-sn-glicero-3-fosfolina; DC16:1PC=1,2-dipalmitoleil-sn-glicero-3-fosfolina; DC20:1PC=1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfolina; DC22:1PC=1,2-dierucoil-sn-glicero-3-fosfolina; DPPG=1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol; DOPG=1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoglicerol.

La velocidad de liberación de un agente activo (p.ej. enzima de degradación de hialuronano) a partir de una formulación liposomal se puede modificar mediante la selección del lípido anfipático, el lípido formador de membrana aceptado, mediante la manipulación de la razón fosfolípido/colesterol, mediante la modulación de la razón molar de componentes lípidos neutros de liberación lenta y liberación rápida y/o por otros factores conocidos por los expertos en la técnica (véase p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 5.962.016). Por ejemplo, el componente lipídico neutro en los liposomas puede ser de 0% a 100% de los componentes de liberación lenta y rápida. Por ejemplo, el componente lipídico neutro puede ser una mezcla de un lípido neutro de liberación lenta y un lípido neutro de liberación rápida en una razón molar de 0,0:1,0 a 1,0:0,0 por ejemplo de aproximadamente 1:1 a 1:100 o de 1:4 a 1:18.

La velocidad de liberación del agente activo (p.ej. enzima) puede ser determinada o controlada. Por ejemplo, las velocidades de liberación se pueden realizar sobre la suspensión de lípidos *in vitro* en solución salina, un tampón adecuado o en medio de plasma o de tipo plasma incubado a temperaturas variadas (p.ej. al menos, o aproximadamente 4°C o al menos, o aproximadamente 37°C) durante tiempos variados (p.ej. al menos 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 30 días o más). Después de la incubación durante el tiempo y/o a la temperatura designados, los tubos incubados se pueden centrifugar y la solución sobrenadante se recoge y se analiza. La velocidad de liberación de la enzima se puede determinar, por ejemplo, por detección o cuantificación de la proteína y/o mediante determinación de la actividad hialuronidasa. En particular, la conjugación de la enzima a un marca u otro radical detectable puede ayudar en la detección de las enzimas liberadas. Un ejemplo de un radical detectable es una etiqueta fluorescente (p.ej. GFP o Alexa488). También se pueden realizar análisis similares *in vivo*. Por ejemplo, una enzima de degradación de hialuronano marcada u otra enzima detectable (p.ej. PH20 Alexa488) se pueden encapsular en una suspensión de LMV en la presente memoria, y su liberación se puede controlar directamente en el sitio local de la próstata.

La velocidad de liberación particular se puede modular empíricamente alterando los componentes lipídicos, la concentración de enzima de degradación de hialuronano, añadiendo el excipiente y/u otros parámetros descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica dependiendo de la aplicación particular de interés. Por lo tanto, la velocidad de liberación de la enzima puede ser controlada. Para los fines de la presente memoria, la velocidad de liberación de la enzima de degradación de hialuronano de las formulaciones de liposomas es tal que la enzima puede contrarrestar la síntesis de HA en el estroma de la próstata. Por lo tanto, la velocidad de liberación se mantiene a lo largo del tiempo. La vida media de la hialuronidasa y otras enzimas de degradación de hialuronano es relativamente corta. Por lo tanto, dado que la enzima desaparece rápidamente, se necesita una liberación sostenida para una actividad prolongada e hidrólisis del HA. Dado que el HA en el estroma se regenera cada 3-10 días, es necesario mantener la enzima activa en el estroma local para combatir los efectos del HA.

Como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, cualquiera de las composiciones de enzima de degradación de hialuronano descritas anteriormente en la Sección C, o conocidas por un experto en la técnica, se puede encapsular dentro de los liposomas multivesiculares. La concentración de la enzima encapsulada puede variar desde unos pocos picomoles hasta aproximadamente varios cientos de milimoles. La concentración de agente variará dependiendo de características tales como la enfermedad a tratar, la edad y estado del paciente y las propiedades particulares del agente. Generalmente, la concentración de enzima en solución en el primer componente acuoso durante la fabricación es directamente proporcional a la cantidad de enzima que se puede cargar en cualquier formulación dada. Se encuentra en la presente memoria, sin embargo, que la concentración de proteína tiene impacto en la encapsulación de la enzima de degradación de hialuronano, y en particular de la hialuronidasa PH20. Por ejemplo, como se ilustra en la presente memoria, los procesos de encapsulación con cantidades iniciales de una enzima de degradación de hialuronano de 2 mg/mL dan como resultado una disminución

de la actividad y de la actividad específica de la enzima. Por lo tanto, las formulaciones de la presente memoria se preparan formando una primera fase acuosa para la encapsulación de una enzima de degradación de hialuronano que contiene menos de 2 mg/mL de enzima de degradación de hialuronano. Por ejemplo, el primer componente acuoso contiene generalmente menos de 2 mg/mL de enzima de degradación de hialuronano, tal como entre, aproximadamente entre 0,1 y 1,9 mg/mL de enzima, por ejemplo de 0,25 a 1,9 mg/mL de enzima, de 0,5 mg/mL a 1,5 mg/mL, tal como de 0,75 mg/mL a 1,25 mg/mL y en particular al menos o aproximadamente 1 mg/mL de enzima de degradación de hialuronano pero menos de 2 mg/mL de enzima. Las formulaciones de LMV resultantes contienen entre, o aproximadamente entre 0,1 mg/mL y 1 mg/mL de enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo de 0,2 mg/mL a 0,5 mg/mL, tal como al menos, o aproximadamente 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,8 mg/mL, 0,9 mg/mL, y en particular al menos 0,3 mg/mL de concentración de enzima en una suspensión de liposomas al 50% en tampón o solución salina.

Se sabe también que el pH puede afectar a la solubilidad de los agentes activos en la solución acuosa. Por ejemplo, la solubilidad del IGF-I en solución acuosa cae precipitadamente a un pH de aproximadamente 5 (véase, p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 6.306.432). Así, típicamente en la técnica, para obtener y mantener suficiente agente en solución en la primera solución acuosa, se le añade un tampón o un ácido durante la fabricación para asegurar una concentración suficientemente alta. Se ha encontrado en la presente memoria, sin embargo, que se pueden utilizar intervalos de pH más altos, manteniendo al mismo tiempo la solubilidad, la actividad y la estabilidad de la enzima de degradación de hialuronano encapsulada resultante. Por ejemplo, el pH de la primera solución acuosa está entre, o aproximadamente en el intervalo de 6,0 a 7,5, de 6,0 a 7,0 o de 6,0 a 6,5, y en particular al menos, o aproximadamente 6,0, tal como al menos, o aproximadamente 6,5.

Los excipientes también se pueden añadir a la primera fase acuosa con el fin de aumentar la eficacia de la encapsulación. En algunos ejemplos, los excipientes añadidos modulan la velocidad de liberación del agente activo (p.ej. enzima de degradación de hialuronano). En otros ejemplos, pueden añadirse excipientes para mejorar o conservar la estabilidad de la enzima de degradación de hialuronano encapsulada. Típicamente, se añaden excipientes que actúan ambos aumentando la eficacia de la encapsulación y/o la velocidad de liberación de la enzima, al tiempo que también potencian o conservan la estabilidad de la enzima de degradación de hialuronano encapsulada. La estabilidad, la eficacia de encapsulación y la velocidad de liberación utilizando cualquiera de una variedad de excipientes se pueden determinar empíricamente. Los métodos para evaluar la eficacia de la encapsulación, la estabilidad y la velocidad de liberación son conocidos por un experto en la técnica.

Por ejemplo, se pueden añadir varios tipos de excipientes osmóticos. Tanto los electrolitos como los no electrolitos funcionan como excipientes osmóticos. Para determinar si una molécula particular es un excipiente osmótico o para determinar la concentración de excipiente osmótico en una solución, por ejemplo una encapsulada dentro de un liposoma multivesicular, se debe tener en cuenta si, en las condiciones de la solución (por ejemplo, pH) la molécula está total o parcialmente ionizada. También se debe determinar si tales iones penetrarán en la membrana lipídica (Mahendra K. Jain, van Nostrand Reinhold Co., The Bimolecular Lipid Bilayer Membrane, 1972, 470 pág.). Un experto en la técnica apreciará que el excipiente osmótico se debe seleccionar de manera que se eviten aquellos que resultarían tóxicos o nocivos de otro modo para un sujeto sometido a terapia mediante el uso del liposoma. Generalmente, se seleccionan excipientes osmóticos que por sí mismos no tienen un efecto biológico o terapéutico sobre un sujeto.

Generalmente, se puede utilizar un excipiente osmótico para alterar la osmolaridad del componente acuoso en el que se disuelve el agente activo para la encapsulación. Existe una relación inversa entre osmolaridad y la carga de fármaco aumentando generalmente la carga de agente activo a medida que disminuye la osmolaridad del componente acuoso (Patente de Estados Unidos Núm. 6.106.858). La osmolaridad es la suma de las concentraciones molares de los solutos presentes en la solución acuosa, incluyendo cualquier excipiente añadido. Por lo tanto, para cualquier concentración seleccionada de enzima de degradación de hialuronano que se utilice, la carga de fármaco durante la fabricación puede ser modulada variando las contribuciones hechas por los excipientes en solución a la osmolaridad global del primer componente acuoso.

Los excipientes osmóticos incluyen aquellos que pueden facilitar la actividad del agente activo, es decir una enzima de degradación de hialuronano. Por ejemplo, los iones de calcio se pueden co-encapsular en forma de un contraión para aumentar la vida útil o facilitar la biodisponibilidad del agente. Además, se pueden utilizar diversos estabilizantes. Los excipientes osmóticos que se pueden utilizar para formar liposomas multivesiculares y para modular la carga de fármaco del agente encapsulado a partir de liposomas multivesiculares incluyen, pero no se limitan a, glucosa, sacarosa, trehalosa, succinato, glicilglicina, ácido glucónico, ciclodextrina, arginina, galactosa, manosa, maltosa, manitol, glicina, histidina, lisina, citrato, fosfato, sorbitol, dextrano y combinaciones de los mismos.

Se puede añadir un hidrocloreuro a uno o ambos de los primeros componentes acuosos y el componente lipídico antes de la primera emulsificación. La adición de suficiente hidrocloreuro puede ser un factor para lograr una elevada eficacia de encapsulación y para una velocidad de liberación controlada de la enzima encapsulada (véase, p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 5.723.147). Los hidrocloreuros que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a,

ácido clorhídrico, hidrocloreto de lisina, clorhidrato de histidina, hidrocloreto de arginina, hidrocloreto de trietanolamina, hidrocloreto de piridina y combinaciones de los mismos. También se pueden utilizar otros ácidos hidrohalogenados, tales como ácido clorhídrico, ácido fluorhídrico, ácido bromhídrico y ácido yodhídrico. Por ejemplo, la modulación de la velocidad de liberación de la enzima encapsulada se puede lograr ajustando la concentración de hidrocloreto presente en el componente lipídico o en el primer acuoso utilizado para formar la emulsión de agua en aceite durante la formación de los liposomas multivesiculares para llegar a la velocidad de liberación deseada, es decir una velocidad de liberación terapéuticamente eficaz de la enzima. Se debe tener en cuenta que, dependiendo de la concentración de hidrocloreto utilizada, la velocidad de liberación de la enzima a partir de los liposomas multivesiculares puede aumentar o disminuir con respecto a la obtenida cuando no se utiliza el hidrocloreto en la fabricación de los liposomas. La cantidad de hidrocloreto utilizada con cualquier formulación de liposomas multivesicular particular dependerá de las propiedades químicas del liposoma (es decir, la combinación de lípidos utilizada en la formulación), la solución acuosa encapsulada en el liposoma, el entorno en el que se coloca el liposoma, así como de la enzima particular encapsulada.

En otro ejemplo, se puede añadir un ácido no hidrohalogenado a uno o ambos de los primeros componentes acuosos y el componente lipídico antes de la primera emulsificación. La adición de un ácido no hidrohalogenado puede ser un factor en el control de la velocidad de liberación de la enzima desde el LMV (véase p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 5.766.627). Los ácidos incluyen, pero no se limitan a, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido glucurónico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido tricloroacético, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y combinaciones de los mismos. La cantidad de ácido utilizada es la eficaz para proporcionar una velocidad de liberación deseada y controlada, en particular una velocidad de liberación que da como resultado niveles terapéuticamente eficaces de la enzima encapsulada en el estroma prostático. Por ejemplo, la concentración del ácido no hidrohalogenado en el componente lipídico o el primer componente acuoso al que se puede añadir puede estar entre 0,1 mM y 0,5 M, por ejemplo, de 10 mM a 200 mM, tal como al menos 0,1 mM, 10 mM, 100 mM o 200 mM.

Otros excipientes que se pueden utilizar incluyen aquellos que conservan o aumentan la estabilidad de la enzima y/o aumentan la velocidad de encapsulación de la enzima. Se ha encontrado en la presente memoria que el ácido hialurónico (hialuronano, HA) cuando se incluye en la primera fase acuosa, aumenta la encapsulación de la enzima de degradación de hialuronano. El HA también conserva y/o mejora la estabilidad de la enzima de degradación de hialuronano. Por lo tanto, se proporcionan en la presente memoria formulaciones de LMV que contienen una enzima de degradación de hialuronano y HA. Tales formulaciones de LMV se obtienen utilizando durante la fabricación un primer componente acuoso que contiene una enzima de degradación de hialuronano, un ácido hialurónico en un intervalo entre aproximadamente 1 mg/mL de HA y 100 mg/mL de HA, por ejemplo de 10 mg/mL de HA a 75 mg/mL HA, tal como de 15 mg/mL HA a 50 mg/mL HA, y en particular al menos o aproximadamente 1 mg/mL HA, 2 mg/mL HA, 3 mg/mL HA, 4 mg/mL HA, 5 mg/mL de HA, 6 mg/mL de HA, 7 mg/mL de HA, 8 mg/mL de HA, 9 mg/mL de HA, 10 mg/mL de HA, 11 mg/mL de HA, 12 mg/mL de HA, 13 mg/mL de HA, 14 mg/mL de HA, 15 mg/mL de HA, 16 mg/mL de HA, 17 mg/mL de HA, 18 mg/mL de HA, 19 mg/mL de HA, 20 mg/mL de HA, 25 mg/mL de HA, 30 mg/mL de HA, 40 mg/mL de HA, 50 mg/mL de HA o más. En algunos ejemplos, las formulaciones de LMV se obtienen utilizando durante la fabricación un primer componente acuoso que contiene una razón molar de HA con respecto a enzima de degradación de hialuronano, que es, o es de aproximadamente 1:500, 1:400, 1:300, 1:200, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 200:1, 300:1, 400:1, 500:1, o más. Dependiendo de la eficacia de la encapsulación, las formulaciones de LMV resultantes contienen una HA encapsulado que es al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85% o más del HA utilizado en el proceso de fabricación. Por ejemplo, las formulaciones de LMV resultantes contienen HA en una cantidad que es, o está entre 0,05 mg/mL y 90 mg/mL, por ejemplo, de 0,75 mg/mL a 13,0 mg/mL, tal como de 1 mg/mL a 10 mg/mL, generalmente al menos 0,1 mg/mL de HA. En algunos ejemplos, la razón molar de HA con respecto a enzima de degradación de hialuronano es de aproximadamente 1:500, 1:400, 1:300, 1:200, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 200:1, 300:1, 400:1, 500:1, o más.

ii. Formulaciones de LMV-enzima de degradación de hialuronano ilustrativas

Se proporcionan en la presente memoria formulaciones que contienen una enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo una hialuronidasa tal como PH20 o PH20 recombinante, que está encapsulada en un liposoma multivesicular (LMV). Las formulaciones de LMV se obtienen utilizando durante la fabricación un primer componente acuoso que contiene una concentración de enzima de degradación de hialuronano disuelta inferior a 2 mg/mL de enzima de degradación de hialuronano, tal como entre, o aproximadamente entre 0,1 y 1,9 mg/mL de enzima o entre 0,25 y 1,9, por ejemplo de 0,5 mg/mL a 1,5 mg/mL, tal como de 0,75 mg/mL a 1,25 mg/mL y en particular al menos, o aproximadamente 1 mg/mL de enzima de degradación de hialuronano pero menos de 2 mg/mL enzima. Las formulaciones de LMV resultantes contienen entre, o aproximadamente entre 0,1 mg/mL y 1 mg/mL de enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo de 0,2 mg/mL a 0,5 mg/mL, tal como al menos o aproximadamente 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,8 mg/mL, 0,9 mg/mL de

enzima y en particular al menos 0,3 mg/mL de enzima en la concentración de la suspensión.

En algunos ejemplos, el primer componente acuoso utilizado en la preparación de la formulación está a, o cerca del pH neutro. Está dentro del nivel de un experto en la técnica ajustar el pH de un tampón o solución acuosa. Generalmente, las formulaciones de LMV se obtienen utilizando durante la fabricación una primera solución acuosa que tiene un pH que está entre o aproximadamente en el intervalo de 6,0 a 7,5, 6,0 a 7,0 o 6,0 a 6,5, y en particular al menos o aproximadamente 6,0, tal como al menos, o aproximadamente 6,5.

En otros ejemplos, el primer componente acuoso puede contener uno o más excipientes, tales como excipientes osmóticos. En particular, los excipientes son aquellos que aumentan la estabilidad de la enzima de degradación de hialuronano, aumentan la velocidad de encapsulación de la enzima de degradación de hialuronano o que aumentan la estabilidad y aumentan la velocidad de encapsulación de la enzima de degradación de hialuronano. Los ejemplos no limitantes de los excipientes son sacarosa, cloruro de calcio (CaCl_2), glicerol, dextrano, PEG (p.ej. PEG-6000), ácido hialurónico (HA), prolina, Arg-HCl, sorbitol, trehalosa o albúmina de suero humano (HSA) o combinaciones de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo, se obtienen formulaciones de LMV ilustrativas utilizando durante la fabricación un primer componente acuoso que contiene CaCl_2 de 1 mM a 50 mM, por ejemplo CaCl_2 de 5 mM a 25 mM, tal como CaCl_2 de 10 mM a 20 mM y en particular al menos o aproximadamente CaCl_2 10 mM, 15 mM o 20 mM. En otro ejemplo, se obtienen formulaciones de LMV ilustrativas utilizando mezclador Vortex durante la fabricación de un primer componente acuoso estratificado sobre una interfase que contiene de 10 μl a 500 μl de glicerol, por ejemplo de 100 μl a 200 μl , tal como al menos o aproximadamente 150 μl de glicerol para minimizar la exposición inicial de la enzima de degradación de hialuronano a la fase de disolvente orgánico. En un ejemplo adicional, se obtienen formulaciones de LMV ilustrativas utilizando durante la fabricación un primer componente acuoso que contiene dextrano entre, o aproximadamente entre 0,01% y 1% (p.ej. dextrano 40.000), por ejemplo dextrano de 0,05% a 0,5% tal como por al menos o aproximadamente dextrano al 0,1%. En otros ejemplos, se obtienen formulaciones de LMV ilustrativas utilizando durante la fabricación un primer componente acuoso que contiene PEG entre, o aproximadamente entre 0,01% y 1% (p.ej. PEG-6000), por ejemplo PEG de 0,05% a 0,5% tal como PEG al menos o aproximadamente al 0,1%. En otro ejemplo, se obtienen formulaciones de LMV ilustrativas utilizando durante la fabricación un primer componente acuoso que contiene prolina entre, o aproximadamente entre 1 mM y 1 M, por ejemplo prolina de 10 mM a 500 mM tal como prolina al menos o aproximadamente 100 mM. En un ejemplo adicional, se obtienen formulaciones de LMV ilustrativas utilizando durante la fabricación un primer componente acuoso que contiene Arg-HCl entre, o aproximadamente entre 1 mM y 1 M (p.ej. pH 6,44), por ejemplo, Arg-HCl de 10 mM a 500 mM, tal como Arg-HCl al menos o aproximadamente 100 mM. En un ejemplo adicional, se obtienen formulaciones de LMV ilustrativas utilizando durante la fabricación un primer componente acuoso que contiene sorbitol entre, o aproximadamente entre 1% y 20%, por ejemplo sorbitol del 5% al 15%, tal como sorbitol a al menos o aproximadamente 5%, 6 %, 7%, 8%, 9%, 10% o más. En algunos ejemplos, se obtienen formulaciones de LMV ilustrativas utilizando durante la fabricación un primer componente acuoso que contiene trehalosa entre, o aproximadamente entre 1% y 20%, por ejemplo trehalosa del 5% al 15%, tal como trehalosa al menos, o aproximadamente 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10% o más. Se entiende que se puede utilizar una combinación de cualquiera de los anteriores.

En los ejemplos particulares, se obtienen formulaciones de LMV utilizando durante la fabricación un primer componente acuoso que contiene un ácido hialurónico (HA) en un intervalo de, o entre aproximadamente 1 mg/mL de HA y 100 mg/mL de HA, por ejemplo 10 mg/mL de HA a 75 mg/mL de HA, tal como 15 mg/mL de HA a 50 mg/mL de HA, y en particular al menos o aproximadamente 1 mg/mL de HA, 2 mg/mL de HA, 3 mg/mL de HA, 4 mg/mL de HA, 5 mg/mL de HA, 6 mg/mL de HA, 7 mg/mL de HA, 8 mg/mL de HA, 9 mg/mL de HA, 10 mg/mL de HA, 11 mg/mL de H, 12 mg/mL de HA, 13 mg/mL de HA, 14 mg/mL de HA, 15 mg/mL de HA, 16 mg/mL de HA, 17 mg/mL de HA, 18 mg/mL de HA, 19 mg/mL de HA, 20 mg/mL de HA, 25 mg/mL de HA, 30 mg/mL de HA, 40 mg/mL de HA, 50 mg/mL de HA o más. Dependiendo de la eficacia de la encapsulación, las formulaciones de LMV resultantes contienen un HA encapsulado que es al menos 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 85% o más del HA utilizado en el proceso de fabricación. Por ejemplo, las formulaciones de LMV resultantes contienen HA en una cantidad que está, o está entre 0,05 mg/mL a 90 mg/mL, por ejemplo, de 0,75 mg/mL a 13,0 mg/mL, tal como de 1 mg/mL a 10 mg/mL, generalmente al menos 0,1 mg/mL de HA.

Las formulaciones de LMV proporcionadas en la presente memoria que encapsulan una enzima de degradación de hialuronano se preparan conteniendo una mezcla de lípidos neutros, una mezcla de lípidos anfipáticos. Los lípidos neutros y los lípidos anfipáticos ilustrativos para las formulaciones de lípidos se proporcionan anteriormente. Generalmente, las formulaciones también contienen colesterol. En algunos ejemplos, las formulaciones contienen además DPPG. Por ejemplo, el componente lipídico neutro contiene una mezcla de un lípido neutro de liberación lenta (p.ej. trioleína u otro lípido neutro de liberación lenta) y un lípido neutro de liberación rápida (p.ej. tricaprilina u otro lípido neutro de liberación rápida) a una razón molar de 25/75 (lento/rápido), 50/50, 75/25 ó 90/10, y en particular 50/50. El componente lipídico anfipático también es generalmente una mezcla que contiene DEPC y DOPC a una razón molar (DEPC/DOPC) de 50/50, 75/25 ó 90/10 y en particular 50/50. Por ejemplo, las formulaciones de LMV se obtienen utilizando durante la fabricación un lípido anfipático y un lípido neutro en un disolvente orgánico volátil como una mezcla 50:50 de una mezcla que contiene DEPC 19,8 mM, colesterol 30 mM,

trioleína 3,75 mM y una mezcla que contiene DOPC 19,8 mM, colesterol 30 mM y tricaprilina 3,75 mM. Las formulaciones de LMV ilustrativas se exponen en la Tabla 19.

iii. Co-Formulaciones de LMV

en la presente memoria se proporcionan co-formulaciones de LMV que contienen adicionalmente otro agente terapéutico co-encapsulado con la enzima de degradación de hialuronano. El otro agente terapéutico puede ser cualquier fármaco o agente conocido por un experto en la técnica. El otro agente puede ser hidrófilo o hidrófobo. Generalmente, al generar tales formulaciones de liposomas, se pueden utilizar los procedimientos y parámetros descritos anteriormente en la Sección D.2, y en particular las subsecciones i. y ii.. Por ejemplo, las formulaciones de LMV se preparan generalmente utilizando durante la fabricación una mezcla de lípidos neutros y anfipáticos. Como se describe en la presente memoria, los lípidos neutros y anfipáticos se pueden proporcionar cada uno como una mezcla. Generalmente, las formulaciones también contienen colesterol. En algunos ejemplos, las formulaciones contienen adicionalmente DPPG.

En algunos ejemplos, las co-formulaciones de LMV se preparan mezclando un primer componente acuoso que contiene la enzima de degradación de hialuronano y otro agente con el componente lipídico en disolvente orgánico. En otros ejemplos, el otro agente es un fármaco hidrófobo y las co-formulaciones de LMV se preparan mezclando un primer componente acuoso que contiene la enzima de degradación de hialuronano y el componente lipídico en disolvente orgánico que también contiene el fármaco hidrófobo. Se encuentra en la presente memoria que la inclusión del fármaco hidrófobo con el componente lipídico en disolvente orgánico da como resultado la encapsulación o intercalación del fármaco hidrófobo en la fase lipídica del LMV. Por lo tanto, cuando se generan combinadas con una enzima de degradación de hialuronano, las formulaciones de LMV contienen un fármaco hidrófilo e hidrófobo co-encapsulado en la misma formulación, por lo que la enzima de degradación de hialuronano está en la fase acuosa y el fármaco hidrófobo está en la fase lipídica. Cualquier fármaco hidrófobo conocido por un experto en la técnica puede ser co-encapsulado en una formulación de LMV con una enzima de degradación de hialuronano. Tales fármacos hidrófobos incluyen, pero no se limitan a, docetaxel, prednisona, prednisolona, ibuprofeno, clotriamazol, risperidona, citrato de tamoxifeno, diasepina, insulina NPH, benzodiazepina, clofibrato, clorfeniramina, dinitrato, digoxina, digitoxina, tartrato de ergotamina, estradiol, fenofibrato, griscofulvina, hidroclorotiazida, hidrocortisona, isosorbida, medrogestona, oxifenbutazona, politiazida, progesterona, espironolactona, tolbutamida, 10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5-carboxamida, 5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5-carboxamida, inhibidores de la 5 α -reductasa tales como finasterida o dutasterida, y otros conocidos por un experto en la técnica.

Con respecto a la generación de co-formulaciones de LMV que contienen un fármaco hidrófobo, se encuentra en la presente memoria que la morfología de las partículas de co-formulación de lípidos puede verse afectada por la concentración de fármaco y la concentración de lípidos. Está dentro del nivel de 09/03/2015 para un experto en la técnica determinar las concentraciones óptimas de fármaco y lípidos con el fin de obtener una partícula de morfología suficiente para aplicaciones terapéuticas a la vez que se mantiene la actividad de los fármacos encapsulados activos. Los ejemplos ilustran procedimientos para evaluar y verificar la morfología y las actividades.

En un ejemplo, se generan co-formulaciones de LMV en las que la concentración de fármaco hidrófobo es de aproximadamente 5 mg/mL o inferior a 5 mg/mL y generalmente entre o entre aproximadamente 0,1 mg/mL y 5 mg/mL. Además, se pueden generar co-formulaciones de LMV que utilizan una concentración de lípidos total elevada durante la fabricación de la co-formulación. Por ejemplo, al generar las co-formulaciones proporcionadas en la presente memoria, la concentración de lípidos puede incluir una cantidad de un lípido anfifático (p.ej. DEPC o DOPC o mezclas de los mismos), que es superior a 20 mM, tal como de 20 mM a 100 mM, por ejemplo, de 30 mM a 60 mM; una cantidad de un lípido neutro (p.ej. trioleína o tricaprilina o sus mezclas) en una cantidad que es o es mayor de 3 mM tal como 4 mM a 20 mM, por ejemplo 5 mM a 12 mM; una cantidad de DPPG que es mayor de 3 mM, tal como 4 mM a 20 mM, por ejemplo 5 mM a 12 mM; y/o una cantidad de colesterol que es superior a 15 mM, por ejemplo, 15 mM a 100 mM, tal como 20 mM a 80 mM o 30 mM a 60 mM, tal como al menos 30 mM.

En los ejemplos concretos de la presente invención, el otro agente es un agente que es adecuado para tratar la HBP como se describe en la presente memoria. Tales agentes incluyen cualquiera de los enunciados en la Sección F siguiente. Por ejemplo, el agente puede ser un antiandrógeno, tal como un antiandrógeno esteroideo, un antiandrógeno no esteroideo o inhibidores de la 5 α -reductasa; un agente bloqueador alfa tal como un antagonista de adrenerreceptores alfa1; o toxina botulínica o una toxina botulínica modificada. En ejemplos concretos, el otro agente consiste en inhibidores hidrófobos de la 5 α -reductasa, finasterida o dutasterida. Por ejemplo, las formulaciones de LMV proporcionadas en la presente memoria incluyen aquéllas en las que la enzima de degradación de hialuronano está en la fase acuosa y la finasterida o dutasterida está en la fase lipídica. Las co-formulaciones de LMV ilustrativas se exponen en el Ejemplo 8 de la presente memoria y en la Tabla 20. Tales co-formulaciones de LMV se pueden utilizar en el tratamiento de la HBP como se describe en la presente memoria.

iv. Evaluación de la Encapsulación y la Eficiencia

Los análisis para evaluar las cantidades relativas de proteína presentes en una muestra de liposomas son conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, tales análisis incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de exclusión por tamaño-HPLC (SEC-HPLC) para caracterizar proteínas de alto peso molecular (HMWP), tales como agregados, y análisis de contenido mediante RP-HPLC. En estos ejemplos, se encuentra en la presente memoria que los métodos de extracción de fármacos proteicos hidrófilos requieren detergentes concretos. Por ejemplo, el uso de dodecilsulfato de sodio al 1% (SDS) para el análisis de contenido mediante RP-HPLC. En otro ejemplo, el uso de octilglucósido al 1% para el análisis SEC-HPLC para caracterizar los agregados de HMWP.

Por ejemplo, la eficacia de la encapsulación puede evaluarse determinando el contenido de la enzima de degradación de hialuronano u otro fármaco (concentración en suspensión y/o concentración libre en porcentaje) de la formulación de LMV resultante, por ejemplo, utilizando RP-HPLC como se describe en la presente memoria. Se puede determinar la eficacia de la encapsulación. El porcentaje de encapsulación se puede determinar como la razón de la cantidad de compuesto encapsulado en la suspensión final del procedimiento de fabricación de liposomas a la cantidad total de compuesto que se debe encapsular utilizada en la primera solución acuosa del procedimiento multiplicada por 100. El porcentaje de encapsulación generalmente es al menos o es de aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85% o más.

En otros ejemplos, se puede determinar la capacidad de carga del fármaco, es decir la cantidad del agente activo (p.ej. enzima de degradación de hialuronano u otro fármaco) cargado en la suspensión de liposomas del producto. Es una medida de la cantidad de agente activo disponible en un volumen unitario de formulación de liposomas y es la razón de fármaco encapsulado por unidad de volumen de suspensión de liposomas a volumen porcentual encapsulado en los propios liposomas. Es aproximadamente igual a la concentración del agente activo en la suspensión dividida por el lipocrito de la suspensión para el fármaco libre de bajo porcentaje. El lipocrito es la razón entre el volumen ocupado por los liposomas y el volumen de suspensión total multiplicado por 100.

En otro ejemplo, la estabilidad de la enzima de degradación de hialuronano encapsulada u otro fármaco se puede determinar evaluando la agregación, la solubilidad y/o la actividad del agente activo (p.ej. enzima de degradación de hialuronano, tal como PH20 u otro fármaco) en las formulaciones. Por ejemplo, se puede determinar la actividad de la enzima de degradación de hialuronano (actividad total y/o porcentaje de actividad enzimática libre) como se ilustra en la presente memoria mediante análisis que evalúan la escisión o degradación del sustrato. Dichos análisis son conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, el análisis USP XXII para la hialuronidasa determina indirectamente la actividad midiendo la cantidad de sustrato de ácido hialurónico, o hialuronano (HA) no degradado, después de que la enzima se deja reaccionar con el HA durante 30 min a 37°C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Se puede utilizar una solución Hyaluronidase Reference Standard (USP) o National Formulary (NF) Standard Hyaluronidase en un análisis para determinar la actividad, en unidades, de cualquier hialuronidasa. En un ejemplo, la actividad se mide utilizando un ensayo de microturbidez. Esto se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une a albúmina sérica. La actividad se mide incubando hialuronidasa con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un periodo de tiempo determinado (p.ej. 10 minutos) y a continuación precipitando el hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina sérica acidulada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un periodo de desarrollo adicional. La disminución de la turbidez resultante de la actividad hialuronidasa sobre el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad enzimática de la hialuronidasa. En otro ejemplo, la actividad hialuronidasa se mide utilizando un análisis de microtitulación en el que se mide el ácido hialurónico residual biotinilado 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 se biotinilan y el sustrato de ácido hialurónico biotinilado se acopla 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 patrones de hialuronidasa de actividad conocida. Otros análisis para medir la actividad de hialuronidasa también se conocen en la técnica y se pueden utilizar en los métodos de la presente invención (véanse p.ej. Delpech et al., (1995) Anal. Biochem. 229:35-41; Takahashi et al., (2003) Anal. Biochem. 322:257-263).

E. Dosificación, administración y métodos de tratamiento

Se puede administrar cualquiera de las enzimas de degradación de hialuronano anteriores, en particular formulaciones de liberación sostenida de una enzima de degradación de hialuronano, tales como formulaciones de LMV, para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada a hialuronano. Por ejemplo, se puede administrar cualquiera de las enzimas de degradación de hialuronano anteriores, en particular formulaciones de liberación sostenida de una enzima de degradación de hialuronano, tales como formulaciones de LMV, para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata (HBP).

Las composiciones y formulaciones se pueden administrar por cualquier vía deseada, por ejemplo, intratumoral, intraarticular (en las articulaciones), intraocular, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa,

intralinfática, oral y submucosa y bucal (p.ej., sublingual). Las composiciones proporcionadas en la presente memoria se formulan típicamente para su administración por vía intraprostática (transuretral, transperineal y transrectal). Las formulaciones adecuadas para tales rutas son conocidas por un experto en la técnica. La administración puede ser local, tópica o sistémica. La administración local a una zona que necesita tratamiento puede conseguirse, por ejemplo, pero sin limitarse a, infusión local durante la cirugía, inyección o instilación 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, ya sea secuencialmente, intermitentemente o en la misma composición. La administración también puede incluir sistemas de liberación controlada que incluyen formulaciones de liberación controlada y liberación controlada del dispositivo, tal como por medio de una bomba.

La vía más adecuada en cada caso depende de una variedad de factores, tales como el progreso de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad, la composición o composiciones concretas que se utilizan para el tratamiento. Para los fines de la presente invención, se desea que las hialuronidasas y otros agentes se administren de manera que alcancen una alta concentración terapéutica y se localicen en la próstata. De este modo, se contempla la administración directa a la próstata, tal como por medio de inyección intraprostática. Por ejemplo, la administración local puede conseguirse por medio de inyección, tal como a partir de una jeringa u otro artículo de fabricación que contiene un dispositivo de inyección tal como una aguja. En otro ejemplo, la administración local puede conseguirse por infusión, lo que puede facilitarse mediante el uso de una bomba u otro dispositivo similar. También se contemplan otros modos de administración. La composición farmacéutica se puede formular en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

La administración de agentes directamente a la próstata es un procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Los sitios de inyección preferidos en la glándula prostática hipertrofiada incluyen los lóbulos laterales derecho e izquierdo y el lóbulo medial. El volumen de la inyección o de las inyecciones, se inyecten uno o más lóbulos y posiciones dentro de cada lóbulo puede ser determinado por el médico a carga utilizando los datos en los que se basa el diagnóstico de HBP o utilizando la información recopilada mediante equipo de ultrasonido para ayudar a la administración de los agentes.

Las inyecciones intraprostáticas se realizan mediante una aguja larga y fina insertada en la próstata bajo control rectal digital y/o guía ultrasónica. Las inyecciones se realizan generalmente bajo anestesia local. La solución inyectable puede diluirse con lidocaína. Durante la inyección, la aguja puede ser frecuentemente reubicada para obtener la mejor distribución posible de la composición o composiciones. Un volumen típico de líquido o gel inyectado en la próstata es aproximadamente 20-30% del volumen prostático. Existen varias vías de inyección para la introducción de la composición descrita en la próstata.

Una vía de administración es mediante inyección transuretral intraprostática (intralesional). La técnica transuretral es precedida inmediatamente por cateterización. El volumen, de la composición inyectada típicamente varía de 1 a 20 cc/lóbulo. Para optimizar los efectos de la composición inyectada, puede ser deseable dilatar la uretra prostática con un balón inflable. El balón insertado cistoscópicamente inhibe la salida inmediata de la solución de enzima inyectada a través del sistema de conducto poroso que desemboca en la uretra. La ventaja de esta vía de inyección es que el método permite la visualización citoscópica directa de las zonas de patología nodular y el emplazamiento de una alta concentración de la composición en el lugar deseado sin riesgo de inactivación metabólica. El dolor y la incomodidad experimentados por los pacientes durante la inyección directa de la próstata son típicamente mínimos y comparables a las inyecciones intramusculares.

Alternativamente, se pueden utilizar las vías transperineal o transrectal de inyección prostática. La vía transperineal de inyección implica el emplazamiento de 22 g x 20 cm de aguja de biopsia por aspiración a través del perineo en la próstata guiada por ultrasonido y/o palpación digital. De nuevo, se inyectan típicamente de 1 a 20 cc de la composición descrita a cada lóbulo lateral de la próstata. Las inyecciones se realizan generalmente bajo anestesia local. Durante la inyección, la aguja se reubica frecuentemente para obtener la mejor distribución posible de la composición. La posición de la aguja puede ser guiada por ultrasonido mientras se mantiene bajo control rectal digital constante. La vía de inyección transperineal puede ser una mejor alternativa que las rutas transuretral o transrectal en términos de reducción de las posibles complicaciones debidas a la infección bacteriana post-inyección.

La vía transrectal permite la introducción de la aguja a través de la pared rectal y la inyección de la próstata mientras se realiza la palpación rectal digital. La inyección a través de la vía transrectal puede realizarse con una aguja de biopsia por aspiración flexible de 22 g x 20 cm ligeramente curvada. El uso de una guía de aguja de Franzen (Precision Dynamics, San Fernando, CA), por ejemplo, permite que la aguja sea dirigida con seguridad hacia una lesión sospechosa bajo técnicas de guía ultrasónicas y/o táctiles. La guía de la aguja de próstata esterilizada se coloca en un dedo índice enguantado. Se coloca un dedil sobre la guía de la aguja. El dedo índice y la guía de la aguja se insertan en el recto y se palpan las lesiones sospechosas de la próstata. La aguja se inserta a través de la guía y se introduce en el tejido. Aproximadamente se pueden inyectar de 1 a 20 cc de la solución a los lóbulos laterales de la próstata. Para inyectar material suficiente, la aguja se puede mover hacia atrás y hacia adelante de tres a cinco veces. Se puede aplicar una gelatina anestésica antes de la inyección para reducir el dolor durante la

punción de la aguja. Otros dispositivos son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden aplicarse y utilizarse en los métodos de la presente invención. Por ejemplo, un Tratamiento de Inyección de Gel Intra-prostática con GelTx™, combinado con obtención de imágenes por ultrasonido (p.ej. utilizando una sonda Trans-Rectal biplano) puede proporcionar una excelente guía de imagen para la colocación de la aguja de inyección (véase, p.ej. ProSurg, San José, CA).

La concentración del agente o de los agentes farmacéuticamente activos se ajusta de manera que una inyección proporcione una cantidad eficaz para producir el efecto farmacológico deseado. La dosis exacta depende de la edad, el peso y el 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 de polvo reconstituido, que contiene el agente o agentes farmacéuticamente activos, está en función de la gravedad de la enfermedad y del artículo de fabricación concreto elegido para el envase. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles, como es conocido y puesto en practica en la técnica.

Se pueden emplear métodos de administración para disminuir la exposición de agentes seleccionados a procesos degradativos, tales como degradación proteolítica e intervención inmunológica a través de respuestas antigénicas e inmunogénicas. Los ejemplos de tales métodos incluyen administración local en el sitio de tratamiento. Se ha informado de que la pegilación de agentes terapéuticos aumenta la resistencia a la proteólisis, aumenta la semivida plasmática y disminuye la antigenicidad y la inmunogenicidad. Los ejemplos de las metodologías de pegilación son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Lu and Felix, Int. J. Peptide Protein Res., 43: 127-138, 1994; Lu and Felix, Peptide Res., 6: 140-6, 1993; Felix et al., Int. J. Peptide Res., 46 : 253-64, 1995; Benhar et al., J. Biol. Chem., 269: 13398-404, 1994; 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 *en vivo*. Por ejemplo, la pegilación de adenovirus puede aumentar la estabilidad y la transferencia génica (véase, p.ej., Cheng et al. (2003) Pharm. Res. 20(9): 1444-51).

Los agentes terapéuticamente activos desde el punto de vista farmacéutico y sus derivados se formulan y administran típicamente en formas de dosificación unitaria o formas de dosificación múltiples. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de agente terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, asociado con los portadores, vehículos, o diluyentes farmacéuticos requeridos. Los ejemplos de formas de dosis unitarias incluyen ampollas y jeringas y comprimidos o cápsulas envasadas individualmente. Las formas de dosis unitarias se pueden administrar en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiples es una pluralidad de formas de dosificación unitarias idénticas envasadas en un solo recipiente para ser administradas en formas de dosis unitarias segregadas. Los ejemplos de formas de dosis múltiples incluyen viales, botes de comprimidos o cápsulas o botes de litros o galones. Por lo tanto, la forma de dosis múltiples es un múltiplo de dosis unitarias que no están segregadas en el envase. Generalmente, se pueden preparar formas de dosificación o composiciones que contienen ingrediente activo en el intervalo de 0,005% a 100% formando el resto a partir de un portador no tóxico.

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). Por ejemplo, se puede administrar cualquiera de las formulaciones de LMV u otras formulaciones de liberación sostenida. El porcentaje de agente activo contenido en tales composiciones depende en gran medida de su naturaleza específica, así como de la actividad del agente y de las necesidades del sujeto. Las formulaciones de liberación controlada y sostenida también se pueden proporcionar en formas de dosis única y múltiple.

Por ejemplo, las formulaciones de lípidos, tales como las formulaciones de LMV proporcionadas en la presente memoria, se proporcionan en una jeringa. En algunos ejemplos, la jeringa tiene una cámara única que contiene las vesículas de membrana. En otros ejemplos, la jeringa tiene dos cámaras, por lo que las vesículas de membrana están en una cámara y otro agente para tratar la HBP está en otra cámara. La jeringa puede ser de inyección de uso único o de uso múltiple. En otros ejemplos, las formulaciones se proporcionan en un recipiente estéril, por ejemplo un recipiente de un solo uso o de uso múltiple. Si se proporciona como un recipiente de uso múltiple, generalmente se incluye un conservante. Adicionalmente, se proporcionan kits que contienen una jeringa o un recipiente e instrucciones de uso.

En ejemplos concretos, se administra un agente terapéutico en una cantidad o régimen de dosificación que es terapéuticamente eficaz para mejorar o reducir los síntomas de la HBP. Una cantidad terapéuticamente eficaz es la dosificación suficiente para reducir uno o más síntomas de la HBP en un sujeto durante al menos una semana, generalmente al menos un mes, por ejemplo, al menos dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses o más. Los indicadores de mejoría o tratamiento satisfactorio incluyen la reducción del tamaño del tejido prostático obstructivo y el alivio de los síntomas de obstrucción urinaria. La evaluación objetiva de los efectos del tratamiento puede medirse por medio de métodos convencionales, incluyendo análisis de flujo

urodinámico, examen transuretral, ultrasonografía transrectal o por medio de un cuestionario de puntuación de síntomas obstructivos, como el Índice Internacional de Síntomas de la Próstata (IPSS) o el Índice de Síntomas de la Asociación Urológica Americana (Índice AUA).

El agente terapéutico para la HBP 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 un agente terapéutico seleccionado en la composición depende de las velocidades de absorción, inactivación y excreción, las características fisicoquímicas, el programa 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 se está tratando y se puede determinar empíricamente utilizando protocolos de ensayo conocidos o por extrapolación de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Debe observarse que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la edad del individuo tratado. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ser ajustados en el tiempo de acuerdo con 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 enunciados en la presente memoria son únicamente ilustrativos y no se pretende que limiten su alcance. La cantidad de los uno o varios agentes terapéuticos seleccionados para la HBP que se van a administrar para el tratamiento de la HBP se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Además, se pueden emplear análisis ensayos *in vitro* y modelos animales para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos.

Por lo tanto, la dosificación precisa, que se puede determinar empíricamente, puede depender de la preparación terapéutica concreta, del régimen y del programa de dosificación, de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, las dosificaciones y cantidades precisas son conocidas por los expertos en la técnica o pueden determinarse empíricamente basándose en la bibliografía o en experimentos *in vitro* o *in vivo* (p.ej. modelo animal). Por ejemplo, la dosificación o cantidad para administración intraprostática puede ser una dosificación y una cantidad que se utilizan para administraciones orales o intravenosas o la dosificación o la cantidad se pueden extrapolar a partir de esa dosificación. Un experto en la técnica está familiarizado con los regímenes de dosificación para la administración de agentes terapéuticos para la HBP concretos.

Se proporciona una hialuronidasa soluble en las combinaciones, formulaciones y composiciones proporcionadas en la presente memoria. La hialuronidasa soluble seleccionada se incluye en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente mediante ensayos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos, tal como utilizando los análisis proporcionados en la presente memoria o conocidos en la técnica (véanse p.ej., 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 después extrapolando de allí para determinar las dosificaciones para los seres humanos.

Al mejorar el estado de un paciente, se puede administrar una dosis de mantenimiento de un compuesto o de las composiciones, si fuera necesario; y se pueden modificar la dosificación, la forma de dosificación, o la frecuencia de administración, o una de sus combinaciones. En algunos casos, un sujeto puede requerir tratamiento intermitente a largo plazo después de cualquier reaparición de los síntomas de la enfermedad o basándose de dosificaciones programadas.

En ejemplos concretos, las formulaciones de LMV, incluyendo las co-formulaciones, u otras formulaciones de lípidos proporcionadas en la presente memoria se administran en volúmenes de dosificación para infección o infusión de 0,1 mL a 50 mL, por ejemplo, 0,5 mL a 10 mL, tal como 1 mL a 2 mL. Generalmente, se suministra al menos 1 mL de una formulación de LMV u otra formulación de lípidos encapsulada con una enzima de degradación de hialuronano. Las formulaciones se pueden inyectar en un sitio o múltiples sitios prostáticos diferentes. Por ejemplo, se realiza una inyección en cada lóbulo de la próstata. Para propósitos de tratamiento de la HBP, la formulación de LMV se administra mediante inyección transrectal, transuretral o transperineal en la próstata bajo ultrasonografía transrectal. Las formulaciones de LMV se administran en un régimen de dosificación al menos una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, una vez cada siete meses, una vez cada nueve meses, una vez cada diez meses, una vez cada once meses o una vez al año. Por ejemplo, las formulaciones de LMV se administran cada 3 a 6 meses.

F. Terapia combinada para el tratamiento de la hipertrofia prostática benigna

Se puede administrar cualquiera de las enzimas de degradación de hialuronano anteriores, en particular formulaciones de liberación sostenida de una enzima de degradación de hialuronano, tales como las formulaciones de LMV descritas anteriormente, junto con uno o más de otros agentes adecuados para el tratamiento de la HBP. Los otros agentes se pueden administrar secuencialmente (p.ej. antes de o posteriormente o intermitentemente) o simultáneamente a la enzima de degradación de hialuronano (p.ej. LMV que contiene una enzima encapsulada que degrada el hialuronano). Las enzimas que degradan el hialuronano y otros agentes terapéuticos con modos terapéuticos complementarios mejoran el tratamiento de la HBP si se administran simultánea o secuencialmente. Por ejemplo, se puede combinar una enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo una hialuronidasa tal como PH20, y en particular cualquiera encapsulada en una vesícula de membrana como se proporciona en la presente memoria, con uno o más de antiandrógenos, bloqueadores alfa, toxinas botulínicas y otros agentes útiles para tratar la HBP. Los antiandrógenos incluyen, por ejemplo, anti-andrógenos esteroideos, anti-andrógenos no esteroideos y/o inhibidores de la 5 α -reductasa. Se contempla cualquier combinación. Además, tal como se ha descrito anteriormente, pueden generarse formulaciones de liberación sostenida, tales como co-formulaciones de LMV que contienen adicionalmente otro agente terapéutico encapsulado en los mismos, tal como un agente adecuado para tratar la HBP. Por lo tanto, en tales ejemplos, la enzima de degradación de hialuronano y otro agente se administran simultáneamente tras la administración de las co-formulaciones de LMV. Otros agentes adecuados para el tratamiento de la HBP pueden administrarse adicionalmente en combinación con una co-formulación LMV como se proporciona en la presente memoria.

Como se describe en la presente memoria más adelante, en la técnica se conocen otros agentes para el tratamiento de la HBP. Tales agentes se pueden utilizar solos o en diversas combinaciones con las formulaciones de enzimas de degradación de hialuronano proporcionadas en la presente memoria. Por ejemplo, se conocen combinaciones de agentes para la HBP. Las combinaciones administradas oralmente de un inhibidor de la 5 α -reductasa y un agente bloqueador alfa, finasterida y terazosina (Patente de Estados Unidos Núm. 5.753.641), extracto de palmito enano y terazoína (Patente de Estados Unidos Núm. 6.200.573) y dutasterida y tamsulosina (sitio web de GSK) se han utilizado para tratar la HBP. La combinación de un inhibidor de la 5 α -reductasa, tal como la finasterida, y un antiandrógeno no esteroideo, tal como la flutamida o la bicalutamida, se ha utilizado para el cáncer de próstata (Patente de Estados Unidos Núm. 5.994.362). Además, la toxina botulínica se ha utilizado como un complemento en la terapia con la terapia combinada. Los pacientes que recibieron tratamiento combinado de un inhibidor de la 5 α -reductasa y un bloqueador alfa a los que se les administró una sola inyección intraprostática de toxina Botulínica A (200-600U) mostraron una reducción del volumen de la próstata y una mejora de las puntuaciones de los síntomas del tracto urinario en comparación con los pacientes que recibieron únicamente terapia combinada en el plazo de 6 meses de tratamiento. A los 12 meses después del tratamiento no se observó diferencia entre los pacientes que recibieron terapia combinada y los que recibieron terapia combinada más Botox añadido durante la terapia (Kuo et al., Scand J Urol Nephrol. 43(3):206 (2009).

En la presente memoria se proporcionan composiciones farmacéuticas y combinaciones de composiciones de enzima de degradación de hialuronano con uno o más agentes de tratamiento de la HBP. La enzima de degradación de hialuronano y los otros agentes pueden administrarse por separado o conjuntamente. Cuando se formulan por separado, las composiciones separadas se pueden administrar secuencialmente, intermitentemente o posteriormente a los otros componentes. El agente de tratamiento de la HBP y la enzima de degradación de hialuronano pueden envasarse como composiciones separadas para administración conjunta, secuencialmente o intermitentemente. Las combinaciones se pueden envasar como un kit.

Las vías de administración para la enzima de degradación de hialuronano y los otros agentes pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, se administra un agente por vía oral o intravenosa y se administra otro agente mediante administración intraprostática. Por ejemplo, cuando la enzima de degradación de hialuronano se administra con un antiandrógeno o un agente bloqueador alfa, el agente antiandrógeno o de bloqueo alfa puede administrarse por vía oral mientras que la enzima típicamente se administra intravenosamente o directamente a la próstata. Para los propósitos de tratamiento de la HBP, un modo particularmente útil de administrar combinaciones terapéuticas es suministrando los agentes directamente a la próstata como una co-formulación. Pueden administrarse directamente a la próstata una enzima de degradación de hialuronano combinada con uno o más anti-andrógenos, agentes bloqueadores alfa, toxina botulínica y otros agentes terapéuticos para la HBP, p.ej. mediante inyección intraprostática, transuretral, transperineal o transrectal. Como se discute en la presente memoria, es ventajoso adicionalmente formular tales combinaciones de enzima de degradación de hialuronano y uno o más de otros agentes de modo que una vez introducidos en la glándula prostática, los agentes se liberen lentamente durante un periodo de tiempo prolongado dando como resultado un efecto terapéutico prolongado y una reducción del número de tratamientos requeridos para lograr un efecto terapéutico.

La dosis de otros agentes terapéuticos (p.ej., antiandrógenos, agentes bloqueadores alfa y toxina botulínica) puede variar dependiendo de las condiciones, es decir, el tamaño de la próstata y la gravedad de los síntomas, las vías de administración, el paciente y la combinación particular de agentes terapéuticos que se estén administrando.

Es particularmente ventajoso utilizar concentraciones y dosificaciones de la hialuronidasa combinada con otros

agentes, formulaciones específicas y modos de administración para reducir el número de tratamientos al número mínimo requerido para obtener el efecto terapéutico deseado. La inyección intraprostática de formulaciones de una enzima de degradación de hialuronano proporcionada en la presente memoria combinada con otros agentes terapéuticos debe permitir que el tratamiento se administre sólo mensualmente, trimestralmente, bianualmente, anualmente u óptimamente sólo una vez.

También se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento para agentes y combinaciones de agentes pueden determinarse empíricamente utilizando protocolos de ensayo conocidos o por extrapolación a partir de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Debe observarse que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección que se vaya a aliviar. Debe entenderse adicionalmente que para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse en el 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 enunciados en la presente memoria son únicamente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance o el uso de las composiciones y combinaciones que las contienen. Las composiciones se pueden administrar diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o una vez. Generalmente, los regímenes de dosificación se eligen para limitar la toxicidad. Debe observarse que el médico asistente sabrá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia a dosificación más baja debido a la toxicidad, o a disfunciones de la médula ósea, el hígado, el riñón u otros tejidos. Por el contrario, el médico asistente también sabrá cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no fuera la adecuada (excluyendo los efectos secundarios tóxicos). La administración de un agente terapéutico no debe exceder los niveles máximos de dosificación enunciados por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos o publicados en Physician's Desk Reference.

Si fuera necesario, se puede determinar o extrapolar empíricamente una dosificación y una duración y un protocolo de tratamiento particulares. Por ejemplo, se pueden utilizar dosis ilustrativas de agentes terapéuticos para la HBP administrados oralmente o intravenosamente como punto de partida para determinar dosificaciones apropiadas para inyección directa en la próstata. Para cualquiera de los agentes terapéuticos para la HBP, se puede estimar inicialmente una dosis particular que es terapéuticamente eficaz utilizando una variedad de mecanismos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante que incluya la CI_{50} como se determina en el cultivo celular. Puede determinarse el intervalo de dosificación apropiado para sujetos humanos, por ejemplo utilizando los datos obtenidos a partir de análisis de cultivo celular y otros estudios en animales.

Los niveles y regímenes de dosificación pueden determinarse basándose en dosificaciones y regímenes conocidos o pueden determinarse empíricamente basándose en una variedad de factores. Estos factores incluyen el peso corporal del individuo, la salud general, la edad, la actividad de los agentes específicos empleados, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la frecuencia de administración, la tasa de excreción, las combinaciones específicas de los agentes terapéuticos, la gravedad y el curso de la enfermedad del paciente, la disposición del paciente a la enfermedad, la reducción deseada de los síntomas, el criterio del médico a cargo del tratamiento y otros factores bien conocidos que afectan a la eficacia de los agentes farmacéuticos administrados.

A continuación se proporcionan ejemplos de otros agentes para el tratamiento de la HBP. Los agentes para el tratamiento de la HBP son conocidos por un experto en la técnica. Se entiende que la discusión de agentes terapéuticos para el tratamiento de HBP proporcionada a continuación es únicamente ilustrativa. Está dentro del nivel de un experto en la técnica el uso de cualquier agente para el tratamiento de la HBP en las composiciones y combinaciones de la presente invención.

1. Antiandrógenos

El papel de los andrógenos en el desarrollo de la hiperplasia benigna de próstata en los hombres está bien documentado (Wilsom, N. Engl. J. Med. 317, 628 (1987)). En la próstata, la testosterona es convertida en la potente hormona androgénica 5 α -dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5 α reductasa. La expansión de la glándula prostática depende de la DHT. La DHT está ligada a los receptores de andrógenos del citosol dentro del citoplasma y el complejo del receptor DHT es transportado al núcleo de la célula, donde efectúa la transcripción de los genes implicados en el crecimiento.

Los antiandrógenos son una amplia clase de agentes que ejercen su efecto ya sea interfiriendo en la unión de los andrógenos al receptor de andrógenos evitando así que las hormonas androgénicas entren en el núcleo y ejerzan su efecto androgénico sobre la próstata o interfiriendo en la producción de andrógenos. Los antiandrógenos que actúan a través del receptor de andrógenos se clasifican como antiandrógenos esteroideos o no esteroideos basándose en su estructura química. Los anti-andrógenos esteroideos tienen la estructura de un esteroide, es decir un hidrocarburo tetracíclico compuesto por tres anillos de ciclohexano y uno de ciclopentano. Los anti-andrógenos no esteroideos no tienen la estructura química de un esteroide.

Los antiandrógenos que inhiben competitivamente la acción de las hormonas androgénicas al unirse a los receptores de andrógenos son una clase de fármacos que han sido aprobados para el tratamiento de la HBP. Estos fármacos antiandrogénicos incluyen fármacos esteroideos y fármacos no esteroideos.

5 a. Anti-andrógenos esteroideos

Los fármacos anti-andrógenos esteroideos incluyen, pero no se limitan a, compuestos de progestina tales como acetato de ciproterona (CPA) (disponible fuera de los EE.UU. como Androcur® (Schering, Alemania)) o Cyprostat® (Bayer, plc, Reino Unido), acetato de megestrol (Megace®, Strativa Pharmaceuticals, Woodcliff Lake, New Jersey), acetato de medroxiprogesterona (Provera®, Pfizer, Nueva York), acetato de clormadinona (CMA) (disponible en Japón), Zanolterona (denominada WIN 49596, LGM Pharmaceuticals, Inc., Boca Raton, Florida) y acetato de osaterona (TZP - 4238) (Takezawa et al. Prostate 1992; 21(4):315-329; Takezawa et al. Prostate 1993; 27:321-328). El alilestemol es un esterodide sintético con actividad progestacional que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la HBP (véase Noguchi et al., International Journal of Urology 5(5):466-470 (2007)).

Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar empíricamente una dosis que se va a combinar en la presente memoria para su uso en el tratamiento de la HBP. Se inyectó intraprostáticamente una dosis única de acetato de clormadinona de liberación sostenida (CMA-SR) de 8 mg/kg o 25 mg/kg en ratas (Goya et al. (2006) Journal Compilation BJU International, 99:202-206).

20 b. Anti-andrógenos no esteroideos

Los fármacos antiandrógenos no esteroideos incluyen, pero no se limitan a, bicalutamida (Casodex®, AstraZeneca Wilmington, Del), nilutamida (Nilandron®, Sanofi Aventis, Bridgewater, N.J); Anandron® (Sanofi Aventis Australia Pty Ltd, Macquarie Park NSW 2113), flutamida (Eulexin®, Schering Laboratories, Kenilworth, Nueva Jersey); y RU 58642 (Battman y col., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 64,103 (1998)). El antiandrógeno no esteroide RU 58841 (Kouting Chemical Co. Ltd., Shanghai) se ha explorado como un tratamiento tópico para la pérdida del cabello, pero también puede ser eficaz en la terapia hormonal para las enfermedades de la próstata.

El nombre químico de la bicalutamida es $(\pm)\text{N}[4\text{-ciano-3-(trifluorometil)fenil}]-3-[(4\text{-fluorofenil)sulfonil}]-2\text{-hidroxi-2-metilpropanimida}$ (descrita en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.636.505 de Tucker, que se incorpora a la presente memoria como referencia). El enantiómero R de la bicalutamida tiene la mayor parte de la actividad. Las pautas de dosificación para Casodex® publicadas en *The Physician's Desk Reference* informan de que una dosis típica en una terapia combinada (es decir, Casodex® combinado con un análogo de LHRH) para el carcinoma prostático es una administración oral una vez al día de un comprimido de 50 mg. Se ha informado de que las dosis hasta 200 mg por día son bien toleradas en las pruebas clínicas a largo plazo.

Nilandron® ha sido aprobado para el tratamiento del cáncer de próstata a una dosis recomendada de 300 mg/día durante 30 días, seguido de 150 mg/día después de eso (ver Información sobre la Prescripción de Nilandron, products.sanofi-aventis.us/nilandron/nilandron.ht mL).

Otros antiandrógenos no esteroideos adecuados incluyen antiandrógenos no esteroideos descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 3.875.229 de Gold, la Patente de Estados Unidos Núm. 4.097.578 de Perronnet, et al., la Patente de Estados Unidos Núm. 4.239.776 de Glen, et al., la Patente de Estados Unidos Núm. 4.386.080 de Crossley, et al., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.994.362 de GormLey, et al. o la Patente de Estados Unidos Núm. 5.872.150 de Elbrecht, et al. (el contenido completo de cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia).

Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar empíricamente una dosis que se va a combinar en la presente memoria para su uso en el tratamiento de la HBP. Por ejemplo, Nilutamida (Nilandron®) 150Casodex 50 mg diarios combinada con un análogo de la hormona liberadora de la hormona lutenizante para el tratamiento del carcinoma metastásico de la próstata.

55 c. Inhibidores de 5 α -reductasa

Otra clase de fármacos anti-andrógenos que han recibido aprobación para el tratamiento de la HBP son los inhibidores de la enzima 5 α -reductasa. La enzima 5 α -reductasa existe en dos formas de Tipo I y Tipo II. El Tipo II se expresa predominantemente en la próstata. El tratamiento con un inhibidor de la 5 α -reductasa puede reducir la producción de DHT y retardar el crecimiento del tejido prostático. Los inhibidores de la 5 α -reductasa ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, finasterida, dutasterida, FR146687O PNU 157706. A estos inhibidores de la 5 α -reductasa, incluyendo finasterida y dutasterida, se les han atribuido la prevención de la progresión del crecimiento de la próstata y la retracción real de la próstata.

La finasterida es un compuesto 4-azasteroide sintético, y actúa inhibiendo la forma de Tipo 5 de la 5 α -reductasa. La

finasterida está disponible bajo el nombre comercial Proscar® (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J.). La finasterida tiene el nombre químico (5 α ,17 β)-N-(1,1-dimetiletil)-3-oxo-4-azaandrost-1-eno-17- carboxamida. La finasterida inhibe la 5 α -reductasa formando un complejo estable con la enzima. Se ha informado de que la finasterida no tiene afinidad por los receptores de andrógenos del citoplasma. Las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.220.735, 4.377.584, 4.760.071 y 4.859.681 de Rasmusson et al. describen la síntesis de finasterida y describen otros compuestos 4-azasteroides adecuados útiles para tratar la HBP. La dosificación de finasterida puede determinarse tomando en consideración el modo de administración, el efecto terapéutico de la enzima de degradación de hialuronano y otros agentes terapéuticos incluidos en la composición, la gravedad de la enfermedad y generalmente está de acuerdo con las pautas aceptadas para el tratamiento de la HBP. A modo de ejemplo, la dosis diaria recomendada de finasterida es de 5 mg, administrada oralmente.

La dutasterida (Duagen®, Avodart®, GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC), (5 α ,17 β)-N-[2,5-bis(trifluorometil)fenil]-2-oxo-4-azaandrost-1-eno-17-carboximida, es un fármaco 4-azasteroide sintético aprobado que se informa que inhibe la 5 α -reductasa tanto de Tipo I como de Tipo II. La dosis oral recomendada de dutasterida es de 0,5 mg al día.

FR156687 es también un inhibidor que se ha demostrado que reduce el crecimiento de la próstata in vivo e in vitro (véase p.ej. Nakayama et al. (1997) Prostate, 31:241-9). Otro denominado "inhibidor dual" se denomina PNU 157706, [N-(1,1,1,3,3,3-hexafluorofenil-propil)-3-oxo-4-aza-5 α -androst-1-eno-17 β -carboxamida] (diSalle, et al., J Steroid Biochem. Mol. Biol. 64,179 (1998)).

El suplemento herbal de palmito enano, se ha tomado para la salud de la próstata, y contiene un inhibidor de la 5 α -reductasa.

Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar empíricamente una dosis que se va a combinar en la presente memoria para su uso en el tratamiento de la HBP. La finasterida se administra a 5 mg/día por vía oral durante un período de tratamiento de años (Lam et al. Urología, 2003 Feb;61(2):354-8). La dutasterida (Avodart®) se administra a 0,5 mg/día por vía oral durante un período de tratamiento de años.

2. Agentes bloqueadores alfa

Se han utilizado antagonistas de adrenorreceptores alfa (bloqueadores α o bloqueantes α) en el tratamiento de la HBP. Los fármacos aprobados incluyen terazosina (Hytrin®, Deflox®, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois), doxazosina (Cardura®, Pfizer. Nueva York), tamosina (Flomax®, Boehringer Ingelheim, Ridgefield, CT), alfuzosina (Uroxatral® Sanofi-Aventis, Bridgewater, Nueva Jersey), naftopidil (Flivas®, Asahi Kasei Pharma Corp., Tokio, Japón) y silodosin (Rapaflo®, Watson Pharmaceuticals, Inc, Corona, CA)). Estos fármacos actúan para relajar la musculatura lisa de la próstata y el cuello de la vejiga, reduciendo la resistencia uretral y produciendo una mejora del flujo de orina. Los antagonistas de los receptores adrenérgicos sólo tratan los síntomas de la HBP y no reducen el tamaño de la próstata.

Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar empíricamente una dosis que se va a combinar en la presente memoria para su uso en el tratamiento de la HBP. Por ejemplo, la dosis oral mínima/máxima diaria de terazosina es de 1,0 mg/20,0 mg; la silodosina se administra por vía oral a 8 mg/día; la alfuzosina (SR, liberación sostenida) se administra a 5 mg dos veces al día (Debruyne et al. Eur Urol 1998; 34:169-175); La tamsulosina (Flomax®) tiene una dosis oral eficaz de 0,4 mg al día o 0,8 mg al día. La dosificación oral de Hytrin se incrementa gradualmente de 1 mg/día a 2 mg/día a 5 mg/día.

Típicamente, cuando se ha administrado más de un tratamiento para la BHP al mismo tiempo a un paciente, tal como un inhibidor de la 5 α -reductasa y un agente bloqueador alfa, cada agente se ha proporcionado a la dosis determinada cuando se administra solo. Dutasterida un inhibidor de la 5 α -reductasa 0,5 mg/día y tamsulosina un bloqueador alfa 0,4 mg/día.

3. Toxina botulínica y toxinas botulínicas modificadas

La toxina botulínica se ha utilizado en el tratamiento de la HBP para reducir el tamaño de la próstata agrandada. Un centenar de unidades de toxina botulínica de tipo A formuladas en Poloxamer 407 al 20% (BASF, Florham Park, New Jersey) en cloruro de sodio al 0,9% para liberación sostenida cuando se inyectó transperinealmente a cada uno de los lóbulos bilaterales de la próstata dio como resultado efectos beneficiosos durante aproximadamente seis meses (Solicitud de Estados Unidos Núm. 20090214685)

La toxina botulínica incluye la neurotoxina producida por Clostridium botulinum; la toxina botulínica (o la cadena ligera o la cadena pesada) preparada de forma recombinante por una especie no Clostridial; los serotipos A, B, C, D, E, F y G de la toxina botulínica; un complejo de toxina botulínica (los complejos de 300, 600 y 900 kDa); una toxina botulínica modificada, una toxina botulínica pegilada, una toxina botulínica quimérica, una toxina botulínica

recombinante, una toxina botulínica híbrida y una toxina botulínica modificada químicamente. Una toxina botulínica modificada es una toxina botulínica que tiene al menos uno de sus aminoácidos suprimido, modificado o reemplazado, en comparación con una toxina botulínica nativa. Una toxina botulínica modificada puede ser una neurotoxina producida de forma recombinante, o un derivado o fragmento de una neurotoxina producida de forma recombinante. Una toxina botulínica modificada conserva al menos una actividad biológica de la toxina botulínica nativa.

Las composiciones farmacéuticas que contienen toxina botulínica disponibles comercialmente incluyen Botox®, complejo de neurotoxina de toxina Botulínica tipo A en albúmina de suero humano y cloruro de sodio (Allergan, Inc., Irvine, CA); Dysport®, complejo de hemaglutinina de toxina del tipo A de Clostridium botulinum con albúmina sérica humana y lactosa (Ipsen Limited, Berkshire, UK) y Myobloc®, toxina botulínica tipo B, succinato de sodio de albúmina humana y cloruro de sodio (Solstice Neurosciences, Inc., South San Francisco, CA).

La toxina botulínica útil para las composiciones de la presente memoria incluyen la toxina de tipo A, la toxina botulínica de tipo B, la toxina botulínica de tipo C, la toxina botulínica de tipo D, la toxina botulínica de tipo E, la toxina botulínica de tipo F y la toxina botulínica de tipo G. Las toxinas botulínicas preferidas para su uso incluyen la toxina botulínica tipo A y la toxina botulínica tipo B. Otras formas de toxina botulínica que son útiles son las toxinas botulínicas quiméricas o híbridas, véase, p.ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.939.070, que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad; toxinas botulínicas preparadas de manera recombinante, véase, p.ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.919.665, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad; y toxinas botulínicas redirigidas, véanse, p.ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.989.545 y/o 6.461.617, que se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad. Las toxinas botulínicas dirigidas hace referencia a toxinas botulínicas que están unidas a un radical de direccionamiento no nativo con afinidad por el tejido diana seleccionado. Las formulaciones de toxina botulínica que son compatibles con las combinaciones de la presente invención incluyen formulaciones retardadas, p.ej., Implantes poliméricos, microesferas, obleas y geles, para liberación sostenida o controlada. Véanse, p.ej., las Patentes de Estados Unidos Núm.: 6.585.993; 6.506.399; 6.306.423; 6.312.708; 6.383.509, todas las cuales se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad.

Típicamente, la cantidad de toxina botulínica administrada a un paciente es de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 unidades de toxina botulínica de tipo A o de aproximadamente 50 a aproximadamente 25.000 unidades de toxina botulínica de tipo B.

La preparación y el uso de toxina botulínica se describe en Patentes de Estados Unidos Núm.: 7.579.010, 7.556.817, 7.491.799, 7.491.403, 7.465.457, 7.455.845, 7.452.697, 7.449.192, 7.445.914, 7.262.291, 7.233.577, 7.189.541, 7.148.041, 7.041.792, 5.955.368, 5.837.265 y 5.696.077, que se incorporan como referencia en su totalidad.

Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar empíricamente una dosis que se va a combinar en la presente memoria para su uso en el tratamiento de la HBP. Por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada Núm. 7.153.514 describe un tratamiento único de la hiperplasia benigna de próstata mediante tres inyecciones intraprostáticas de 50 unidades de hialuronidasa seguidas de tres inyecciones de 50 unidades de inyección de toxina botulínica tipo A. En otro ejemplo, el tratamiento de la HBP es inyectando en la próstata de 100 UI/70 kg a 1200 UI/70 kg de toxina botulínica tipo A en una dosis única o dividida (véase p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 7.153.514). Véase también Chuang et al. Journal Compilation BJU International 98:28-32 (2006).

4. Otros agentes

Otros agentes que son útiles para el tratamiento de la HBP pueden administrarse con una enzima de degradación de hialuronano (p.ej. hialuronidasa) y, en particular, formulaciones de liberación sostenida, en lugar de o junto con los antiandrógenos, agentes bloqueadores alfa y toxinas botulínicas. Los siguientes son algunos ejemplos de otros agentes útiles para el tratamiento de la HBP y no se pretende que sean limitantes.

PRX302 es una protoxina bacteriana activada por PSA que se puede inyectar intraprostáticamente para tratar la HBP. (Protox Therapeutics véase www.protox.com WO2006/133553).

Los productos conjugados útiles para tratar la HBP incluyen oligopéptidos con secuencias de aminoácidos que se escinden selectivamente mediante PSA, ligados químicamente a agentes citotóxicos alcaloides de vinca (USP 20040081659).

NX-1207 (2,5 mg) se administra mediante inyección intraprostática, tratamiento único (Nymox Pharmaceuticals).

Se ha demostrado que el extracto de polen Cernilton® mejora el flujo de orina y disminuye el volumen de la próstata cuando se administra a pacientes con HBP (véase Dutkiewicz, International Urology and Nephrology 28(1):49-53 (1996)).

El elocalcitol es un agonista de la vitamina D no hipercalcémico que se ha demostrado que detiene el crecimiento de la próstata cuando se administra por vía oral a una dosis de 150 mcg/día (véase el sitio web de BioXell, www.bioxell.com).

- 5 En el tratamiento de la HBP se puede utilizar la ablación con etanol (véanse, p.ej. Ditrollo et al. (2002) *Journal of Urology*, 167:2100-2104; Grise et al. (2004) *Eur. Urol.*, 46:496-501). Por lo tanto, en los ejemplos de la presente invención, se puede utilizar una enzima de degradación de hialuronano (p.ej. hialuronidasa) y, en particular, formulaciones de liberación sostenida, combinada con la ablación con etanol para tratar la HBP.

10 5. Artículos de Fabricación

Los compuestos farmacéuticos de agentes terapéuticos seleccionados pueden envasarse combinados con una formulación enzimática de degradación de hialuronano como artículos de fabricación que contienen material de envasado, una composición farmacéutica que es eficaz para tratar HBP y una etiqueta que indica que el agente o los
15 agentes seleccionados se deben utilizar para tratar la enfermedad o trastorno. Las combinaciones de una formulación enzimática de degradación de hialuronano y uno o más de antiandrógenos, agentes bloqueadores alfa, toxina botulínica y otros agentes de tratamiento de HBP se pueden envasar en un artículo de fabricación.

Los artículos de fabricación proporcionados en la presente memoria contienen materiales de envasado. Los
20 materiales de envasado para su uso en el envasado de productos farmacéuticos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.323.907, 5.052.558 y 5.033.252, cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria en su totalidad. Los ejemplos de materiales de envasado farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, envases de tipo burbuja, botes, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringuillas, botellas y cualquier material de envasado adecuado para una
25 formulación seleccionada y modo de administración y tratamiento previstos. Los artículos de fabricación pueden incluir una aguja u otro dispositivo de inyección para facilitar la administración con fines de inyección local. Se contempla una amplia gama de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionados en la presente memoria, así como una variedad de tratamientos para la HBP.

La elección del envase depende de la enzima de degradación del hialuronano y de otros agentes, y de si tales composiciones se envasarán juntas o por separado. En general, el envase no es reactivo con las composiciones contenidas en el mismo. En un ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano puede envasarse como una mezcla con uno o más de antiandrógenos, agentes bloqueadores alfa, toxinas botulínicas y otro agente de
30 tratamiento de HBP. Por ejemplo, se contempla una formulación de liberación sostenida de una enzima de degradación de hialuronano y un inhibidor de la 5 α -reductasa, tal como finasterida o dutasterida. En otros ejemplos, algunos de los componentes se pueden envasar en forma de una mezcla. En otros ejemplos, todos los componentes se envasan por separado. Así, por ejemplo, los componentes se pueden envasar en forma de composiciones separadas que, al mezclarse inmediatamente antes de la administración, se pueden administrar directamente en conjunto. Alternativamente, los componentes se pueden envasar en forma de composiciones separadas para
40 administración por separado.

Los componentes pueden envasarse en un recipiente. El recipiente puede tener un único compartimento que contiene una formulación enzimática de degradación de hialuronano y que es susceptible de adición de uno o más de los otros agentes por el usuario, por ejemplo a través de una abertura en el compartimento. Se contempla
45 cualquier recipiente u otro artículo de fabricación que sea susceptible de tener un espacio de definición para la contención de hialuronidasa y que sea susceptible de manipulación sencilla para permitir la adición de los componentes finales. Los otros componentes se añaden antes de su uso.

En otros ejemplos, los componentes se envasan por separado en el mismo recipiente. Generalmente, los ejemplos de tales recipientes incluyen aquellos que tienen un espacio cerrado y definido que contiene hialuronidasa, y un espacio separado, cerrado y definido que contiene los otros componentes o componente de tal manera que las áreas subsiguientes se separan por una membrana fácilmente extraíble que, después de su retirada, permite que se
50 mezclen los componentes. Se contempla cualquier recipiente u otro artículo de fabricación, siempre y cuando la hialuronidasa se separe de los otros componentes antes de la administración. Para las realizaciones adecuadas véanse, p.ej., los recipientes descritos en Patentes de Estados Unidos Núm. 3.539.794 y 5.171.081.

Por ejemplo, un aparato de una sola cámara incluye aquellos en los que el aparato contiene una sola cámara o recipiente y, si es necesario, medios de inyección. Los alojamientos o recipientes de una sola cámara incluyen cualquier artículo en el que se incluye una hialuronidasa en el recipiente. La enzima de degradación de hialuronano
60 se aloja en el recipiente en fase líquida o en forma de polvo u otra pasta u otra composición conveniente. Los otros componentes, p.ej., el antiandrógeno, el agente bloqueador alfa o la toxina botulínica se introducen inmediatamente antes de su uso o se administran por separado.

En otros ejemplos, un aparato contemplado para uso en la presente invención es un recipiente de doble cámara o de

varias cámaras. En general, este aparato tiene al menos dos cámaras o compartimentos que mantienen de este modo la enzima de degradación de hialuronano separada del anti-andrógeno y/o agente bloqueador alfa o toxina botulínica hasta que se desee su mezcla. El aparato puede incluir una cámara de mezclado para permitir la mezcla de los componentes antes de la dispensación del aparato. Alternativamente, el mezclado puede ocurrir mediante la eyección de un componente de una cámara a una segunda cámara que contiene la hialuronidasa. Por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano puede proporcionarse en forma liofilizada, y la reconstitución puede conseguirse mediante la eyección del agente antiandrógeno o bloqueador alfa, tal como en una solución líquida, desde una primera cámara a la segunda cámara que contiene la hialuronidasa liofilizada.

En algunos ejemplos, un aparato de doble cámara o de varias cámaras emplea un mecanismo de bombeo mecánico en su funcionamiento. En tal ejemplo, el aparato dispensador mantiene los componentes en cámaras separadas. El mecanismo de bombeo funciona para retirar el contenido de cada cámara y dentro de una cámara de mezclado, o desde una cámara a la segunda cámara. El mecanismo de bombeo puede accionarse manualmente, por ejemplo, mediante un émbolo. Los ejemplos de tales aparatos de doble cámara incluyen jeringas de doble cámara (véanse p.ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.972.005, 6.692.468, 5.971.953, 4.529.403, 4.202.314, 4.214.584, 4.983.164, 5.788.670, 5.395.326; y las Solicitudes de Patentes Internacionales Núm. WO2007006030 y WO2001047584).

Otro ejemplo de un aparato dispensador de fluido de cámara doble o de cámara múltiple contemplado para su uso en la presente memoria adopta la forma de un bote o tubo compresible u otro dispositivo similar. El dispositivo tiene al menos dos compartimentos en su interior que mantienen los componentes separados. La tapa del dispositivo puede servir como una cámara de mezclado, una cámara de mezclado puede estar situada entre las dos cámaras y la tapa, o se puede lograr una mezcla dentro de una de las cámaras. Los componentes son impelidos mediante compresión desde los compartimentos separados a la cámara de mezcla. A continuación se dispensan desde la cámara de mezclado. Por ejemplo, los contenidos mezclados pueden ser retirados del dispositivo uniendo un aparato de émbolo/jeringa al extremo de dispensación y retirando el contenido a través del mismo. Tales dispositivos son conocidos en la técnica (véase p.ej., Solicitud de Patente Internacional. Núm. WO1994015848).

6. Kits

Las composiciones y combinaciones seleccionadas de una enzima de degradación de hialuronano y uno o más de un agente anti-andrógeno, bloqueador alfa, toxina botulínica u otro agente terapéutico de HBP, incluyendo artículos de fabricación de los mismos también se pueden proporcionar como kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente memoria y un artículo para su administración proporcionado como un artículo de fabricación. Por ejemplo, se pueden suministrar una enzima de degradación de hialuronano y uno o más de antiandrógenos, agentes bloqueadores alfa, toxinas botulínicas y otros agentes terapéuticos de HBP con un dispositivo para administración, tal como una jeringa. Las composiciones pueden estar contenidas en el artículo para su administración o pueden proporcionarse de forma separada para añadirse con posterioridad. Por ejemplo, se contempla una jeringuilla de un solo uso precargada con 1-2 mL de una enzima de degradación de hialuronano formulada y antiandrógeno, tal como finasterida. Generalmente, los kits contienen un artículo con una formulación o composición de enzima de degradación de hialuronano, y una composición antiandrogénica y/o una composición de agente bloqueador alfa y/o toxina botulínica. El kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones de aplicación que incluyen dosificaciones, regímenes de dosificación e instrucciones para modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente memoria y un artículo para el diagnóstico. Por ejemplo, tales kits pueden incluir un elemento para medir la concentración, cantidad de PSA en el sujeto.

G. Métodos de evaluación de la eficacia

Una de las principales metas del tratamiento de la HBP es aliviar la obstrucción urinaria y los síntomas que la acompañan. La reducción del tamaño del tejido prostático obstructivo y el posterior alivio de los síntomas de obstrucción urinaria son indicativos de una terapia exitosa. Fundamental para el papel desempeñado por las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, es la metodología implicada en la evaluación de la terapia. La evaluación objetiva de los efectos de la terapia puede medirse por métodos convencionales incluyendo análisis de flujo urodinámico, examen transuretral o ultrasonografía transrectal junto con una tabla de puntuación de síntomas obstructivos.

Para evaluar el papel de los presentes métodos, composiciones y combinaciones en el alivio de los síntomas obstructivos de la HBP, son esenciales medios precisos para cuantificar el tamaño de la próstata y determinar el flujo urinario máximo. La evaluación de la respuesta al tratamiento de la HBP debe basarse en criterios objetivos. Se ha demostrado que las técnicas actuales de obtención de imágenes de próstata y los métodos de análisis urodinámico son eficaces en la evaluación de tratamientos terapéuticos para la HBP. En vista de la variabilidad del curso clínico de la HBP en general y en el paciente individual en particular, existe la necesidad de evaluaciones de referencia ampliadas antes y después del tratamiento. La evaluación inicial del paciente debe incluir: historial; examen físico; puntuación de los síntomas; cistoscopia; recuento sanguíneo completo y perfil bioquímico; medición de la orina

residual; y el caudal urinario. El tamaño de la próstata se puede determinar con ultrasonografía transrectal tridimensional. Después de un curso de tratamiento, se debe realizar una evaluación de seguimiento. El seguimiento post-terapia de los pacientes tratados de hipertrofia prostática puede incluir: examen físico; cistoscopia; estudios de laboratorio; y procedimientos de obtención de imágenes. Los pacientes que se consideran beneficiados de la terapia son aquellos que tienen mejoría clínica, por ejemplo con respecto a las tasas de flujo urinario máximo y las puntuaciones de los síntomas.

Una convención para estimar el tamaño de la próstata en el examen físico implica una escala de clasificación que varía de normal a 4+. Una glándula normal es aproximadamente del tamaño de una castaña, pesa aproximadamente 10 gm y se presenta como una impresión mínimamente perceptible en el examen rectal. Una próstata agrandada 1+ es aproximadamente del tamaño de una ciruela, pesa aproximadamente 25 g y ocupa un poco menos de una cuarta parte de la luz rectal. Una próstata agrandada 3+ alcanza el tamaño de una naranja, alcanza un peso de aproximadamente 75 gm y llena aproximadamente tres cuartos de un diámetro rectal. Una glándula 4+ puede alcanzar el tamaño de un pequeño pomelo, pesar más de 100 gm y llenar tanto la luz rectal que es difícil un examen adecuado.

Los avances recientes en instrumentación y técnicas ultrasónicas de obtención de imágenes han demostrado su utilidad en el diagnóstico, la estadificación y el tratamiento de enfermedades que afectan a la próstata. Se ha demostrado que las técnicas de obtención de imágenes tridimensionales empleando equipos transrectales (TRUS) o ultrasonidos transuretrales son precisas y valiosas para evaluar la respuesta local de la próstata al tratamiento. Se inserta una sonda en el ano para comprobar la próstata. La sonda se utiliza para hacer rebotar las ondas de sonido de los órganos internos para producir un sonograma. Los estudios de micción sonográfica proporcionan información más útil desde el punto de vista clínico que los estudios convencionales que se emplean actualmente. Además, el uso de ultrasonografía transrectal mejora la precisión de las inyecciones prostáticas al permitir la colocación de la aguja, bajo guía ultrasónica, directamente en zonas sospechosas. La ultrasonografía transrectal de la próstata permite visualizar las porciones anteriores de la próstata, que no pueden ser palpadas digitalmente. También pueden ser visualizadas la anatomía intraprostática, la integridad de la cápsula y las vesículas seminales.

Se ha demostrado que el uso de ultrasonografía transrectal en la determinación del volumen prostático es un método fiable y se ha demostrado que es exacto hasta en 5% del peso prostático real. La gravedad específica de la próstata es cercana a 1,0 y el volumen prostático en centímetros cúbicos se considera igual a su peso en gramos. El peso prostático se puede calcular utilizando la fórmula simple: $\text{Peso} = 0,5 (D1 \times D2 \times D3)$ representando D1, D2 y D3 los diámetros de las tres dimensiones de la próstata. Se cree que la reproducibilidad diaria de esta técnica es de aproximadamente 95%. Otros procedimientos de obtención de imágenes que se pueden emplear incluyen pielogramas del tracto urinario, tomografía computarizada y técnicas de resonancia magnética.

Los pielogramas intravenosos tienen un valor limitado en la valoración del tamaño prostático. La tomografía computarizada puede revelar el área periprostática y revelar el tamaño del ganglio linfático. El detalle intraprostático, sin embargo, es pobre con masas raramente visualizadas. La detección de nodos ampliados es altamente sensible; sin embargo, los nódulos de tamaño normal pueden contener carcinoma microscópico. La resonancia magnética, como la ultrasonografía transrectal, revela la anatomía intraprostática. La técnica es tan precisa y sensible como la ultrasonografía transrectal o la tomografía computarizada para demostrar la adenopatía pélvica, la invasión periprostática y la afectación de las vesículas seminales.

1. Modelos animales

Los sistemas de modelos de mamíferos *in vivo* desarrollados para evaluar la terapia para la HBP deben proporcionar datos con respecto a las dosis eficaces, así como información sobre posibles efectos secundarios tóxicos o inmunológicos. De los animales experimentales, el cánido ha sido considerado el modelo más apropiado para el estudio de la HBP humana. El tamaño grande de la próstata canina, así como la aparición espontánea de HBP en perros de edad avanzada proporcionan analogías con el sistema humano. A pesar de las diferencias morfológicas y bioquímicas, la próstata canina ofrece un modelo experimental adecuado para evaluar los efectos de la terapia.

Se pueden diseñar estudios *in vivo* para evaluar la seguridad y eficacia de las composiciones descritas y el método de administración en el modelo animal canino. El efecto en el tejido prostático causado por la inyección intraprostática *in vivo* de las composiciones puede ser evaluado por medio de barridos ultrasónicos *in vivo* e *in vitro* de la próstata y por el examen macroscópico y microscópico del tejido de necropsia. La evaluación histopatológica de los efectos de la composición inyectada incluyó el examen de la próstata, la uretra, la vejiga, los testículos, los riñones, el hígado, el corazón y los pulmones. Además, se pueden examinar evidencias de estenosis, fistulas, adherencias y granulomas en los tejidos vecinos al sitio de inyección. Siguiendo un curso de las inyecciones intraprostáticas *in vivo* de las composiciones que se deben someter a ensayo, de acuerdo con un protocolo de GLP aprobado para estudios con cánidos *in vivo*, el animal puede ser sacrificado con una sobredosis de pentobarbital sódico. La próstata puede ser expuesta mediante una incisión de la línea media, retirada, desprovista del exceso de restos, y pesada. Tras la extracción, la próstata se coloca en un recipiente con solución salina normal y a

continuación se explora mediante ultrasonidos. Las imágenes ultrasónicas de la próstata se registran en una película. Las exploraciones ultrasónicas se realizan de modo que los hallazgos ultrasónicos e histológicos puedan ser comparados en las mismas zonas con la mayor exactitud posible. Después de la exploración, toda la próstata puede ser cortada en serie en secciones de 0,5 cm, fotografiada y preparada para el examen histopatológico microscópico. Se debe tener cuidado de preservar la correcta orientación anatómica para la comparación con los ultrasonogramas. Cuando la próstata es explorada *in vitro*, no hubo tejido intermedio entre el transductor y el tejido diana y, por lo tanto, proporcionó una imagen ultrasónica óptima. Los patrones ultrasónicos de las exploraciones de la próstata *in vivo* no es idéntica al patrón obtenido *in vitro* debido a la circulación de sangre y tejidos interpuestos. Sin embargo, se pueden realizar comparaciones y encontrar buenas correlaciones entre las exploraciones ultrasónicas *in vivo* e *in vitro*.

Debido a las limitaciones en la extrapolación de datos obtenidos de los experimentos con animales a las condiciones humanas, la evaluación final de cualquier agente terapéutico biológico debe realizarse en seres humanos. Los resultados del alivio de la obstrucción urinaria secundaria a la HBP por métodos quirúrgicos actualmente en uso son buenos. Los métodos no quirúrgicos, para ser aceptables, deben proporcionar resultados igualmente eficaces y estar libres de efectos secundarios adversos. Los ensayos clínicos correctamente contruidos son esenciales y difíciles de realizar en una población de edad avanzada debido a las limitaciones en el seguimiento del curso de la enfermedad y su respuesta a la terapia durante largos períodos de tiempo. Los estudios clínicos que evalúan el tratamiento deben incluir mediciones doble ciego controladas con placebo que continúen durante al menos tres años después del tratamiento. Los efectos del tratamiento pueden variar con la proporción de componentes estromales y epiteliales o con la dosis y duración del tratamiento. Con el fin de seleccionar de forma más objetiva a los candidatos para el tratamiento con el método no quirúrgico de terapia y para verificar con mayor precisión los efectos de la composición descrita, los criterios necesarios para que los hombres con HBP se clasifiquen como candidatos para la terapia farmacológica deberían incluir síntomas de moderados a severos con caudales urinarios máximos inferiores a 15 mL/segundo. Los pacientes que se deben excluir son aquellos con prostatectomía previa, retención urinaria aguda, infección, vejiga neurogénica, estenosis uretral, carcinoma de la próstata u otra enfermedad potencialmente mortal.

Los estudios clínicos que involucran sujetos humanos pueden implicar uno o más de los siguientes parámetros con el fin de establecer el modo óptimo de terapia para el tratamiento de la HBP. Se escruta la población prospectiva de pacientes que presentan síntomas obstructivos cuantitativos debidos a HBP y se seleccionan candidatos adecuados para la terapia. Los pacientes seleccionados se someten a pruebas cutáneas para detectar reacciones alérgicas mediante la inyección intradérmica de 0,1 cc de una solución farmacéuticamente aceptable de los agentes terapéuticos. Se realizan inyecciones prostáticas intralesionales con diversas combinaciones y concentraciones de agentes. Las cantidades adecuadas y eficaces de los agentes terapéuticos se pueden determinar a partir de estudios que varían en términos de: concentración, combinación, formulación de los agentes terapéuticos, volumen de inyección, localización y número de inyecciones requeridas para el alivio de los síntomas obstructivos. La terapia experimental debe terminarse cuando se consiga la reducción deseada del tejido prostático o cuando no se observe ninguna mejora adicional de los síntomas entre los tratamientos.

2. Procedimientos *in vitro*

Los estudios *in vitro* incluyeron la inyección de tejido prostático en chips de tejido prostático disponibles comercialmente, obtenidos de muestras órganos enteros, extirpados quirúrgicamente, de cobaya, cánido, y ser humano de próstatas de cobaya y cánido

Los especímenes de tejido prostático humano de individuos que presentan HBP (que pueden obtenerse de autopsias, donantes de trasplante de órganos de cadáveres, o pacientes sometidos a prostatectomía) también se pueden inyectar con agentes terapéuticos. Las muestras tratadas pueden evaluarse mediante microscopia convencional de campo claro, epifluorescente y de contraste de fase.

Se han desarrollado procedimientos para la preparación de secciones de tejido congeladas teñidas con hematoxilina y eosina con el fin de comparar y evaluar los cambios histológicos microscópicos en tejido prostático causados por la inyección intraprostática de diversos agentes terapéuticos. Para el examen histológico, la próstata se divide en serie en secciones transversales de aproximadamente 0,5 cm. Es importante que estas secciones atraviesen la porción media de la próstata e incluyan porciones de la uretra prostática. Todas las secciones deben incluir la mucosa uretral y el margen externo de la cápsula prostática. Las secciones transversales de tejido se congelan a -20°C, se montan en un mandril de criostato preenfriado y se preparan secciones congeladas finas de 8 µl en un criostato a -40°C. Las secciones finas se descongelan en portaobjetos de microscopio, se fijan inmediatamente en etanol al 95%, se tiñen con hematoxilina y eosina y se recubren con cubreobjetos Permount (Fisher, Pittsburgh, PA). Alternativamente, las secciones transversales de los tejidos se pueden fijar inmediatamente en formalina del 4 al 10% a pH 7,2, embeber en parafina, cortar en secciones finas en serie, montar y teñir con hematoxilina y eosina. Se obtienen secciones de tejido fino cada 100 lm con un total de al menos 20 secciones finas examinadas microscópicamente para cada próstata. El tejido prostático se corta transversalmente con un bisturí y se congela para cortar secciones finas en un

criostato. Las secciones transversales de los tejidos se pueden congelar a -20°C o congelar instantáneamente a -80°C por inmersión en soluciones de hielo seco/acetona. Si se debe retrasar el corte en secciones finas, el tejido se puede almacenar en un recipiente sellado durante varios días a -20°C. Antes del corte en secciones finas, las secciones transversales de tejido congelado se llevan a la temperatura de corte (-30 a -40°C) colocándolas en el criostato durante al menos una hora. Las láminas de microscopio se limpian sumergiéndolas en etanol del 70% al 95%. Se preparan secciones finas congeladas adecuadas para tinción con H & E (6 a 8 lm de espesor) en un criostato. La temperatura de corte, el ángulo y el filo de la cuchilla y la humedad ambiental influyen en la calidad de las secciones finas. Si la temperatura es demasiado baja, el tejido tiende a fracturarse y fragmentarse. Si la temperatura es demasiado alta, las secciones tienden a enrollarse y pegarse a la cuchilla. La baja humedad parece impedir el curvado de las secciones sobre la cuchilla, lo que produce una menor distorsión de la morfología del tejido. A medida que las secciones de tejido se desprenden de la hoja de la cuchilla, pueden ser ayudadas en el portaobjetos del microscopio con un pincel pequeño de pelo de camello para artistas. El almacenamiento de los portaobjetos limpios a temperatura ambiente también ayuda a separar las secciones de tejido de la hoja de la cuchilla y en la fusión de la sección al portaobjetos. Las láminas preparadas se fijan inmediatamente en etanol del 95% a 22°C y se someten al protocolo para la tinción con H & E de secciones congeladas.

El procedimiento de tinción con Hematoxilina y Eosina (H y E) para secciones congeladas se puede realizar de la siguiente manera utilizando soluciones de hematoxilina Harris (James Phillips Co., Minneapolis, MN), Lerner Eosin Y (Baxter, McGaw Park, IL), carbonatode litio al 1% (Sigma) y Americlear (Baxter). Las secciones de tejido congelado (8 lm) se fijan en etanol del 95% durante 1 a 30 minutos. Las portaobjetos se tratan mediante las siguientes etapas:

Aclarado en H₂O desionizada durante 30 segundos;
Tinción en hematoxilina durante 1 minuto; lavado en H₂O del grifo caliente durante 15 segundos;
Inmersión en Li₂CO₃ diluido, 2-4 inmersiones (Li₂CO₃ al 50 11 1% en 50 mL de H₂O desionizada);
Lavado en H₂O desionizada durante 15 segundos;
Inmersión en eosina Y, 10 inmersiones; inmersión en etanol del 70%, 5 inmersiones;
Inmersión en etanol del 95%, 5 inmersiones; inmersión en etanol del 100%, 10 inmersiones;
Inmersión nuevamente en etanol del 100%, 10 inmersiones;
Inmersión en Americlear, 10 inmersiones;
Inmersión nuevamente en Americlear, 10 inmersiones; y
Recubrimiento inmediato con cubreobjetos Permount.

H. Ejemplos

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

Ejemplo 1

Expresión de ácido hialurónico en el tejido HBP humano

En este ejemplo, se analizó la expresión de ácido hialurónico (HA) en muestras humanas de tejido de próstata tanto normales como con hiperplasia benigna de próstata (HBP) mediante tinción histológica con proteína de unión a HA (HABP) y sustrato de peroxidasa de 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

Se obtuvieron secciones histológicas pre-cortadas de tejido incluido en parafina (FFPE) de US BioMax Inc (Núm. de Cat. PR804, PR806 y PR808, Rockville, MD). En resumen, la HBP y los tejidos prostáticos normales se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% en PBS durante 24 horas, se deshidrataron con un gradiente de etanol, se aclararon con xileno y se embebieron en parafina. Las secciones de tejido se desparafinaron, se rehidrataron y a continuación se incubaron con albúmina de suero bovino (BSA) al 3% a 37°C durante 30 minutos. Después de enjuagar con solución salina tamponada con fosfato libre de calcio y magnesio (PBS-CMF), se añadieron 0,3 mL de proteína biotinilada de unión a HA (bHABP, Núm. de Cat. 400763-1A, Associates of Cape Cod, MA) diluida 1:100 en tampón HABP (tampón de fosfato de sodio 0,25 M, pH 7,0, que contenía NaCl 1,5 M, guanidina-HCl 0,3 M, BSA al 0,08% y azida de sodio al 0,02%, pH 7,0). Las placas se incubaron después a 4°C durante una noche. A continuación, las láminas se aclararon en PBS-CMF y se transfirieron a H₂O₂ al 0,6% en metanol a temperatura ambiente. Después de enjuagar en PBS-CMF, se añadió estreptavidina-HRP (1 mg/mL, Núm. de Cat. SA5004, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) a las secciones y se desarrollaron con tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB, Núm. de Cat. D3939, Sigma) y se contratiñeron en hematoxilina de Mayer (Núm. de Cat. S3309, Dako, Carpintería, CA).

Se analizaron un total de 67 muestras de tejido HBP y 19 de tejido prostático normal. En el conjunto de muestras, la edad media de los donantes de tejido HBP y tejido normal de próstata fue de 69,7 ± 7,9 años y de 36,7 ± 5,4 años, respectivamente. Los resultados para la tinción de HA del tejido de HBP se muestran en la Tabla 4 a continuación. La expresión de HA se puntuó de acuerdo con los siguientes criterios:

HA Alto - Tinción en células/Área del estroma (>70 - 80%) de la Sección de Tejido
 HA Moderado - Tinción en > 40% a 70% de las Células/Área del estroma de la sección de tejido
 HA Bajo - Tinción en <40% de las Células/Área Estromal de la Sección de Tejido
 HA negativo - No se observó tinción

En la región del estroma, la tinción de HA fue de moderada a alta en 85% (57/67) de las muestras de HBP en comparación con 31,6% (6/19) en las muestras normales de próstata. En las células basales, 40% de las muestras de HBP eran ricas en HA, como se evidenció por tinción alta de HA en comparación con 0% en muestras normales de próstata. La tinción de HA en células epiteliales fue negativa en más de la mitad (38/67) de las muestras de HBP.

Tabla 4. Puntuación de HBP Humana

	Alto		Moderado		Bajo negativo			
	HBP	Normal	HBP	Normal	HBP	Normal	HBP	Normal
Células basales	27 (40%)	0	33 (49%)	1 (5,3%)	6 (9%)	8 (42,1%)	1 (1,5%)	10 (52,6%)
Células estromales	18 (27%)	0	30 (45%)	1 (5,3%)	16 (24%)	11 (57,9%)	3 (4%)	7 (36,8%)
Estroma	26	0	31	6	10	9	0	4
	(39%)		(46%)	(31,6%)	(15%)	(47,4%)		(21,1%)
Células epiteliales	1 (1,5%)	0	14 (21%)	0	14 (21%)	0	38 (56,5%)	0

Ejemplo 2

Modelo de Rata de Hiperplasia Prostática Inducida por Enantato de Testosterona

En este ejemplo, se examinó la capacidad del enantato de testosterona (TE) para inducir hiperplasia prostática en la próstata de rata. Brevemente, a dos ratas Sprague-Dawley (Harlan, EE.UU.) macho de veinticinco (25) semanas de edad se les administraron dosis mediante inyección intramuscular de 25 mg de TE (Núm. de Lote 80G010A, Abraxis Bioscience, Phoenix, AZ) por rata, una vez a la semana, los días 0, 7, 14 y 21. Se sacrificaron cinco (5) de 25 ratas antes del tratamiento con TE y 5 de las 20 ratas restantes se sacrificaron semanalmente. Los lóbulos ventrales de las próstatas se cosecharon para su análisis. El tratamiento con TE dio como resultado el crecimiento de la próstata, con un aumento de tamaño aproximado de 3 veces después del tratamiento una vez por semana durante un mes. Adicionalmente, el aumento en el peso prostático de rata estaba relacionado linealmente con la exposición sostenida a TE. La semivida de TE en la sangre de rata fue de aproximadamente 10,5 días (Anderson RA, J Clin Endocrinol Metab., (1996) 81(3):896-901).

Ejemplo 3

Efecto de PEGPH20 sobre la próstata normal de rata y la hiperplasia prostática de rata inducida por TE

En este ejemplo, se examinó PH20 pegilada (PEGPH20) para determinar su efecto sobre el tejido normal de próstata de rata y sobre el tejido prostático hiperplásico inducido por TE (modelo HBP de rata descrito en el Ejemplo 2 anterior).

A. Efecto de PEGPH20 sobre la Próstata Normal de Rata

En este ejemplo, se examinó el efecto de PEGPH20 sobre el tejido prostático normal. A cinco ratas Sprague-Dawley (Harlan, EE.UU.) macho de 8 semanas de edad se les administraron dosis por vía intravenosa de PEGPH20 (diluido en solución salina normal) a 0,82 mg/kg cada Lunes, Miércoles y Viernes durante 2 semanas. Cinco (5) ratas no tratadas sirvieron como grupo de control. El día 12 después del tratamiento con PEGPH20, se sacrificaron las ratas y se recogieron los lóbulos ventrales de las próstatas para su análisis. El peso de la próstata se midió utilizando una balanza electrónica. La administración de PEGPH20 no causó un cambio significativo en el peso prostático de la próstata normal de rata en comparación con el tratamiento con vehículo solo (P = 0,18).

B. Efecto de PEGPH20 en el HA Estromal Prostático

En este ejemplo, se analizó el efecto de PEGPH20 sobre el estroma prostático y el HA estromal de ratas con hiperplasia prostática normal y inducida por TE mediante histología prostática, incluyendo tinción con hematoxilina y eosina y tinción con IHC. La proliferación estromal se determinó comparando visualmente el tamaño del estroma. Las ratas Sprague-Dawley macho de ocho semanas de edad se dividieron en 4 grupos que se trataron como se indica en la Tabla 5 a continuación. Se administró enantato de testosterona por medio de inyección intramuscular y

PEGPH20 (diluida en solución salina normal) y el control se administraron por vía intravenosa. Después del tratamiento, los animales se sacrificaron y los lóbulos ventrales de las próstatas se cosecharon para su análisis.

Tabla 5. Régimen de dosificación

Grupo	Núm. de Ratas tratadas	TE		PEGPH20		Vehículo	Día de sacrificio
		Dosis	Días	Dosis	Días		
1	5	---	---	---	---	Ninguno	12
2	5	---	---	0,82 mg/kg	12	---	12
3	4	25 mg/rata	0 y 8	---	---	Solución Salina	18
4	5	25 mg/rata	0 y 8	0,82 mg/kg	10	---	18

5 Los tejidos de próstata se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% en PBS durante 24 horas, se deshidrataron con etanol en gradiente, se aclararon con xileno y se embebieron en parafina. El bloque de parafina se cortó a secciones de 5 µm. Las secciones de tejido se desparafinaron, se rehidrataron y se procesaron mediante tinción convencional de hematoxilina y eosina (H y E). La localización histoquímica de HA se llevó a cabo utilizando una sonda HABP biotinilada (bHABP, Núm. de Cat. 400763 - 1A, Associates of Cape Cod, MA). Las secciones se desparafinaron en xileno, 2 x 5 min, se hidrataron en etanol del 100%, durante 2 x 3 min y en etanol del 95% durante 1 min, a continuación se aclararon en agua destilada, se incubaron a 37°C durante 20 min en una solución de tripsina, y se aclararon en PBS durante 2 x 2 min. Después de la incubación en suero de cabra al 2% y BSA al 1% en PBS durante 30 min, las secciones se incubaron con solución de bloques de avidina y biotina (Núm. de Cat. MB-1220, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) y se lavaron con PBS; las secciones se incubaron con 4 µg/mL de bHABP en BSA al 1% en PBS a 37°C durante 1 hora. Después de enjuagar en PBS-Tween 20 al 0,05% durante 3 x 3 min, las secciones se incubaron en FITC-estreptavidina (Núm. de Cat. CB4741954, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, diluido 1:500 en PBS) a RT durante 30 min, se montaron en medio de montaje DAPI (Núm. de Cat. H-1200, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) y se sellaron con esmalte de uñas transparente. Los portaobjetos fueron observados de forma ciega por un investigador bajo un microscopio fluorescente Axioskop equipado con el filtro apropiado. Se tomaron micrográficas de cada sección con un escáner con cámara y un programa de imagen avanzado SPOT (DIAGNOSTIC Instrument, Inc.).

25 Los resultados se exponen en la Tabla 6 a continuación. El tratamiento del tejido prostático normal con PEGPH20 degradó el ácido hialurónico en el estroma. El tratamiento del tejido prostático normal con TE dio como resultado un aumento de la proliferación estromal así como un aumento de los niveles de HA en el estroma. El tratamiento con TE para inducir la hiperplasia prostática seguido por tratamiento con PEGPH20 dio como resultado la disminución de los niveles de ácido hialurónico en el estroma y la disminución de la proliferación estromal de tal manera que el estroma fue comparable en tamaño al del control.

Tabla 6. Efectos de PEGPH20, TE y TE + PEGPH20 sobre el estroma de próstata de rata		
Grupo	Efecto sobre HA	Efecto sobre el estroma
1 Control	Ninguno	Ninguno
2 PEGPH20	Completamente degradado	Ninguno
3 TE	Aumento	Mayor proliferación
4 TE + PEGPH20	Completamente degradado	Disminución de la proliferación (en comparación con el tratado con TE)

30 C. Efecto de PEGPH20 sobre el peso de la próstata en el modelo de hiperplasia prostática de rata inducida por TE

35 En este ejemplo, se administró PEGPH20 a ratas con hiperplasia prostática inducida por TE para evaluar su efecto sobre el peso de la próstata. Las ratas Sprague-Dawley macho de ocho semanas de edad se dividieron en 2 grupos que se trataron como se indica en la Tabla 7 a continuación. Se administró enantato de testosterona por medio de inyección intramuscular y se administró PEGPH20 (diluida en solución salina normal) por vía intravenosa. Después del tratamiento, los animales se sacrificaron y los lóbulos ventrales de las próstatas se cosecharon para su análisis. El peso de la próstata se midió utilizando una balanza electrónica.

40

Tabla 7. Régimen de dosificación

Grupo	Núm. de Ratras tratadas	TE		PEGPH20		Día sacrificado
		Dosis	Días	Dosis	Días	
1	5	25 mg/rata	0	---	---	7
2	4	25 mg/rata	0,7 y 14	Solución Salina		18
3	5	25 mg/rata	0 y 7	0,82 mg/kg	7, 9, 11	12
4	5	25 mg/rata	0,7 y 14	0,82 mg/kg	7, 9, 11, 13	14
5	5	25 mg/rata	0,7 y 14	0,82 mg/kg	7, 9, 11, 13, 15	16
6	5	25 mg/rata	0,7 y 14	0,82 mg/kg	7, 9, 11, 13, 15, 17	18
7	5	---	---	0,82 mg/kg	QOD, días 0-11	12
8	5	---	---	Solución Salina		12

QOD - administrado cada dos días.

El peso de la próstata aumentó en 18,9% y 85,7% el día 7 y el día 18, respectivamente, después de la exposición a TE. El tratamiento de ratas a las que se administró TE con PEGPH20, a partir del día 7, inhibió el aumento del peso prostático en 26,5% ($P < 0,001$). Además, el aumento de peso de la próstata causado por TE se detuvo después de aproximadamente 5 días de la dosificación de PEGPH20 y con la dosificación continua no se observó aumento en el tamaño de la próstata.

D. Evaluación de la duración de la dosificación de PEGPH20

En este ejemplo, se evaluó el efecto de la duración del tratamiento con PEGPH20 administrando TE y PEGPH20 durante diferentes lapsos. Se administró TE durante 2, 3 ó 4 semanas y se administró PEGPH20 durante 1 semana o 2 semanas.

Las ratas macho de ocho semanas de edad se dividieron en 8 grupos que se trataron como se indica en la Tabla 8 a continuación. Se administró enantato de testosterona por medio de inyección intramuscular y se administró PEGPH20 (diluida en solución salina normal) por vía intravenosa. Después del tratamiento, los animales se sacrificaron y los lóbulos ventrales de las próstatas se cosecharon para su análisis. El peso de la próstata se midió utilizando una balanza electrónica.

Tabla 8. Régimen de dosificación

Grupo	Núm. de Ratras tratadas	TE		PEGPH20		Día de sacrificio
		Dosis	Días	Dosis	Días	
1	4	25 mg/rata	0, 7	---	---	28
2	8	25 mg/rata	0, 7	0,82 mg/kg	QOD, días 7-20	21
3	4	25 mg/rata	0, 7, 14, 21	---	---	28
4	8	25 mg/rata	0, 7, 14, 21	0,82 mg/kg	QOD, días 7-20	28
5	4	25 mg/rata	0, 7	---	---	21
6	8	25 mg/rata	0, 7	0,82 mg/kg	QOD, días 7-20	21
7	4	25 mg/rata	0, 7, 14	--	---	21
8	8	25 mg/rata	0, 7, 14	0,82 mg/kg	QOD, días 7-20	21

QOD - administrado cada dos días.

Los resultados se exponen en la Tabla 9 a continuación. Los resultados muestran que el tratamiento con PEGPH20 es a la vez dependiente de la dosificación y del tiempo.

Tabla 9. Efectos de varios regímenes de dosificación de TE y PEGPH20

	1 Vs 2	3 Vs 4	5 Vs 6	7 Vs 8
Tratamiento	2 Wk TE, 1 semana PEGPH20, Sac Día 21 y 28	4 semanas TE, 1 semana PEGPH20, Sac Día 28	2 semanas TE, 2 semanas PEGPH20, Sac Día 21	3 semanas TE, 2 semanas PEGPH20, Sac Día 21
Valor P	0,01	0,76	<0,01	0,03
% de inhibición	15,4	11,4	30	14,8
Término del tratamiento	TE más corto, PEGPH20 más corto, sac más temprano	TE más largo, PEGPH20 más corto, sac más tardío	TE más corto, PEGPH20 más largo, sac más temprano	TE más largo, PEGPH20 más largo, sac más temprano

E. Evaluación del tiempo de la primera administración

En este ejemplo, se evaluó la dependencia temporal del tratamiento de HBP de rata con PEGPH20 administrando PEGPH20 en diversos puntos de tiempo. En resumen, las ratas Sprague-Dawley macho de 8 semanas de edad se dividieron en 8 grupos que se trataron como se indica en la Tabla 10 a continuación. Se administró enantato de testosterona por medio de inyección intramuscular y se administró PEGPH20 (diluida en solución salina normal) por vía intravenosa. Después del tratamiento, los animales se sacrificaron y los lóbulos ventrales de las próstatas se cosecharon para su análisis. El peso de la próstata se midió utilizando una balanza electrónica.

Tabla 10. Régimen de dosificación

Grupo	Núm. de Ratadas	TE		PEGPH20		Día de sacrificio
		Dosis	Días	Dosis	Días	
1	4	25 mg/rata	0, 7	---	---	28
2	4	25 mg/rata	0, 7, 14, 21	---	---	28
3	4	25 mg/rata	0, 7	---	---	21
4	4	25 mg/rata	0, 7, 14	---	---	21
5	8	25 mg/rata	0, 7	0,82 mg/kg	QOD, días 7-14	21
6	8	25 mg/rata	0, 7	0,82 mg/kg	QOD, días 7-20	21
7	8	25 mg/rata	0, 7, 14, 21	0,82 mg/kg	QOD, días 7-14	28
8	8	25 mg/rata	0, 7, 14	0,82 mg/kg	QOD, días 7-20	21

QOD - administrado cada dos días.

Los resultados se exponen en la Tabla 11 a continuación. Cuatro semanas de inducción de HBP con TE (grupo 2) dieron como resultado el mayor peso prostático. En todos los grupos, el tratamiento con PEGPH20 redujo el peso prostático promedio en comparación con el tratamiento con TE solo. La co-administración de PEGPH20 con TE, a partir del día 7, dio como resultado la mayor disminución del peso prostático medio. Por lo tanto, se observa una mejor eficacia con una administración más larga de PEGPH20.

El peso del agua prostática se midió pesando la próstata en un tubo seguido de congelación rápida en nitrógeno líquido. Los tubos se colocaron en un liofilizador durante 7 días y la próstata en el tubo se pesó de nuevo después de secarla completamente. El contenido de agua de la próstata se calculó a partir del peso húmedo y del peso seco. Se encontró que el contenido de agua prostática de cada grupo era el mismo para todos los grupos (~ 80%). Por lo tanto, el cambio en el peso de la próstata no se puede atribuir a la disminución del agua de los tejidos.

Tabla 11. Efecto del tiempo de la primera administración

Grupo	Peso Prostático (g) Media ± DT
1	1,49 ± 0,47
2	1,76 ± 0,18
3	1,57 ± 0,09

Tabla 11. Efecto del tiempo de la primera administración	
Grupo	Peso Prostático (g) Media $\pm$ DT
4	1,54 $\pm$ 0,07
5	1,26 $\pm$ 0,14
6	1,10 $\pm$ 0,14
7	1,55 $\pm$ 0,12
8	1,31 $\pm$ 0,17

Ejemplo 4

Efectos de PEGPH20 y Finasterida sobre la hiperplasia prostática de rata inducida por TE

En este ejemplo, se compararon los efectos del tratamiento de la hiperplasia prostática de rata inducida por TE con PEGPH20 con el tratamiento con finasterida, un antiandrógeno que es un inhibidor de la 5 α -reductasa que se usa para tratar la HBP. Además, se evaluó la terapia combinada con PEGPH20 y finasterida.

A. Comparación del tratamiento con PEGPH20 frente a Finasterida

En este ejemplo, se comparó el efecto del tratamiento con PEGPH20 con el tratamiento con finasterida utilizando el modelo de hiperplasia prostática por TE en rata. Las ratas macho de ocho semanas de edad se dividieron en 3 grupos que se trataron como se indica en la Tabla 12 a continuación. Se administró enantato de testosterona por medio de inyección intramuscular, se administró PEGPH20 (diluida en solución salina normal) por vía intravenosa y se administró finasterida por vía intraperitoneal. El día 21 se sacrificaron los animales y se recogieron los lóbulos ventrales de las próstatas para su análisis. El peso de la próstata se midió utilizando una balanza electrónica.

Tabla 12. Régimen de dosificación							
Grupo	Núm. de Ratas tratadas	TE		PEGPH20		Finasterida	
		Dosis	Días	Dosis	Días	Dosis	Días
1	4	25 mg/rata	0, 7	---	---	---	---
2	8	25 mg/rata	0, 7	0,82 mg/kg	QOD, días 7-20		
3	8	25 mg/rata	0, 7	---	---	25 mg/kg	Diariamente, días 7-20
QOD, cada dos días.							

Los resultados muestran que la administración de PEGPH20 produce aproximadamente 30% de inhibición del crecimiento de la próstata, mientras que el tratamiento con finasterida da como resultado aproximadamente una inhibición de 37% del crecimiento de la próstata. La disminución del peso prostático de ambos grupos tratados, en comparación con el grupo 1 que fue tratado con TE solo, es estadísticamente significativa ($P < 0,01$ para ambos). El contenido de agua prostática de cada grupo se calculó a partir del peso húmedo y el peso seco y se encontró que era el mismo para todos los grupos (~80%). Por lo tanto, el cambio en el peso de la próstata no se puede atribuir a la disminución del agua de los tejidos.

B. Co-administración de PEGPH20 y finasterida

En este ejemplo, se evaluó el efecto de la terapia combinada con PEGPH20 y finasterida. Se administró PEGPH20 a una dosis de 0,82 mg/kg (dosis baja) o 2 mg/kg (dosis alta). En resumen, las ratas Sprague-Dawley macho de 8 semanas de edad se dividieron en 6 grupos que se trataron como se indica en la Tabla 13 a continuación. Se administró enantato de testosterona por medio de inyección intramuscular, se administró PEGPH20 (diluida en solución salina normal) por vía intravenosa y se administró finasterida por vía intraperitoneal. El día 21 se sacrificaron los animales y se recogieron los lóbulos ventrales de las próstatas para su análisis. El peso de la próstata se midió utilizando una balanza electrónica.

Tabla 13. Régimen de dosificación							
Grupo	Núm. de Ratas tratadas	TE		PEGPH20		Finasterida	
		Dosis	Días	Dosis	Días	Dosis	Días

Tabla 13. Régimen de dosificación

Grupo	Núm. de Rat ^a s tratadas	TE		PEGPH20		Finasterida	
		Dosis	Días	Dosis	Días	Dosis	Días
1	8	25 mg/rata	0, 7, 14	---	---	---	---
2	8	25 mg/rata	0, 7, 14	0,82 mg/kg	QOD, comenzando el día 7	---	---
3	8	25 mg/rata	0, 7, 14	2 mg/kg	QOD, comenzando el día 7	---	---
4	8	25 mg/rata	0, 7, 14	---	---	25 mg/kg	Diariamente, a partir del día 7
5	8	25 mg/rata	0, 7, 14	0,82 mg/kg	QOD, comenzando el día 7	25 mg/kg	Diariamente, a partir del día 7
6	8	25 mg/rata	0, 7, 14	2 mg/kg	QOD, comenzando el día 7	25 mg/kg	Diariamente, a partir del día 7

QOD, cada dos días.

Los resultados se exponen en la Tabla 14 a continuación. El porcentaje (%) de inhibición se determinó de acuerdo con la fórmula: ((Control-tratado)/Control) x 100. El tratamiento con una dosis baja de PEGPH20, finasterida sola o terapia combinada con una dosis baja de PEGPH20 + finasterida dio como resultado aproximadamente 25% de inhibición del crecimiento de la próstata. La terapia combinada de una dosis alta de PEGPH20 (2 mg/kg) + finasterida dio como resultado la mayor inhibición del crecimiento de la próstata (41%, P <0,001). El contenido de agua prostática de cada grupo se calculó a partir del peso húmedo y el peso seco y se encontró que era el mismo para todos los grupos (~ 80%). Por lo tanto, el cambio en el peso de la próstata no se puede atribuir a la disminución del agua de los tejidos.

Tabla 14. Tratamiento combinado con PEGPH20 y Finasterida

	1	2	3	4	5	6
Tratamiento	3 semanas TE	3 semanas TE PEGPH20 Baja (2 semanas)	3 semanas TE PEGPH20 Alta (2 semanas)	3 semanas TE finasterida (2 semanas)	3 semanas TE PEGPH20 Baja + finasterida (2 semanas)	3 semanas TE PEGPH20 Alta + finasterida (2 semanas)
Peso Prostático (g) Media ± DT	1,33 ± 0,23	0,98 ± 0,17	1,08 ± 0,21	1,00 ± 0,19	0,99 ± 0,14	0,79 ± 0,17
Valor P	N/A	0,003	0,038	0,007	0,003	<0,001
% Inhibición	N/A	26,6	19	25,2	25,9	41

Ejemplo 5**Apoptosis de células estromales después de la eliminación de HA en una hiperplasia prostática de rata inducida por TE**

En este ejemplo, se analizó la capacidad de PEGPH20 para causar la apoptosis de células estromales. La detección in situ de la apoptosis celular mediante análisis TUNEL se basó en una reacción para marcaje de final de corte de UTP biotinilada mediada por desoxinucleotidil-transferasa (TdT) terminal in situ (TUNEL). Esto se realizó esencialmente utilizando el ADN FragEL (Núm. de Cat. QIA39-1EA, Calbiochem, Gibbstown, NJ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las secciones de tejido desparafinado se trataron con proteinasa K (0,02 mg/mL, Núm. de Cat. 25530, Invitrogen, Carlsbad, CA). Los portaobjetos se lavaron a continuación en solución salina tamponada con Tris (TBS) y la peroxidasa endógena se bloqueó durante 5 min en H₂O₂ al 3% diluido en metanol. Después de lavados en TBS, las secciones se trataron con tampón de equilibrado de TdT 1 vez a temperatura ambiente durante 30 min y posteriormente se incubaron con una mezcla de reacción de marcaje TdT (57 mL de tampón de equilibrado más 3 mL de enzima TdT) durante 1,5 h a 37°C. Los portaobjetos se enjuagaron en TBS y se montaron utilizando medios de montaje Fluorein-FragEL, a continuación se sellaron con esmalte de uñas. El número de células positivas para TUNEL se contó en cada sección a 200 aumentos bajo un microscopio

óptico.

La tinción inmunohistoquímica reveló que la apoptosis era inducida únicamente en las células del estroma. En la Tabla 15 a continuación se expone el régimen de tratamiento, el número medio de células apoptóticas por sección y el valor P, en comparación con TE 7d más TE 18d. La PEGPH20 no indujo la apoptosis del estroma en la próstata no tratada con testosterona. El tratamiento con PEGPH20 de ratas con hiperplasia prostática inducida por TE produjo una apoptosis significativa en las células estromales de la próstata.

Tabla 15. Apoptosis de las células del estroma		
Grupo	Células apoptóticas/sección Media $\pm$ DT	Valor P
No tratado	0	N/A
PEGPH20 12d	0,8 $\pm$ 1,79	N/A
TE 7d	4,6 $\pm$ 2,51	N/A
TE 18d	1,75 $\pm$ 1,71	N/A
TE 12d, PEGPH20 5d	25,6 $\pm$ 20,16	0,006
TE 14d, PEGPH20 7d	36,8 $\pm$ 21,99	0,001
TE 16d, PEGPH20 9d	13,4 $\pm$ 5,73	0,001
TE 18d, PEGPH20 1d	7,8 $\pm$ 2,71	0,010

Ejemplo 6

Efectos de Depo-PH20 sobre la hiperplasia prostática inducida por TE

En este ejemplo, se examinó Depo-PH20 para determinar su capacidad para tratar la hiperplasia prostática de rata inducida por TE, en comparación con el tratamiento con PEGPH20. Depo-PH20 contiene PH20 y un gel fosfolipídico en un portador fluido.

Las ratas Sprague-Dawley macho de ocho semanas de edad se dividieron en 5 grupos que se trataron como se indica en la Tabla 16 a continuación. Se administró enantato de testosterona por medio de inyección intramuscular, se administró PEGPH20 por vía intravenosa o por medio de inyección intraprostática y se administró vehículo DepoGel o DepoPH20 por medio de inyección intraprostática. El día 21 se sacrificaron los animales y se recogieron los lóbulos ventrales de las próstatas para su análisis. El peso de la próstata se midió utilizando una balanza electrónica.

Tabla 16. Régimen de dosificación							
Grupo	Núm. de Ratas tratadas	TE		PEGPH20		DepoGel	DepoPH20 (0,095 mg/mL)
		Dosis	Días	Iv	Inyección intraprostática (3,3 mg/mL)		
1	10	25 mg/rata	0, 7, 14	---	---	---	---
2	10	25 mg/rata	0, 7, 14	QOD, comenzando el día 7	---	---	---
3	10	25 mg/rata	0, 7, 14	---	100 μ L, días 7 y 14	---	---
4	10	25 mg/rata	0, 7, 14	---	---	100 μ L, día 7	---
5	10	25 mg/rata	0, 7, 14	---	---	---	100 μ L, día 7

QOD, cada dos días.

Los resultados se exponen en la Tabla 17 a continuación. El tratamiento con PEGPH20, ya sea intravenosamente o

por medio de inyección intraprostática, dio como resultado una próstata significativamente más pequeña, como se evidencia por una reducción en el peso prostático. No se observó diferencia significativa en el peso prostático entre los grupos tratados con DepoGel (control) y Depo-PH20, y además, el tratamiento con Depo-PH20 no produjo una reducción significativa del peso prostático, en comparación con el tratamiento con TE solo. La formulación en gel Depo-PH20 que se administró era espesa y se observaron grumos de color blanco visibles en las próstatas de las ratas tratadas con esta formulación. Estos grupos de color blanco también se observaron en las próstatas de las ratas tratadas con el Depo-Gel solo. Dado que el tamaño y el peso totales de una próstata de rata es inherentemente pequeño, la presencia de estos grupos puede estar contribuyendo a la falta de efecto observado para el tratamiento con Depo-PH20.

Tabla 17. Efectos de Depo-PH20 en la hiperplasia prostática inducida por TE

Grupo	Peso Prostático Media $\pm$ DT (g)	% de inhibición	Valor P (vs ctl)	Valor P (DepoGel vs Depo - PH20)
TE 3 semanas	1,64 $\pm$ 0,12	N/A	N/A	N/A
TE 3 semanas, DepoGel 2 semanas	1,55 $\pm$ 0,21	5,8	0,225	N/A
TE 3 semanas, Depo-PH20 2 semanas	1,50 $\pm$ 0,24	8,7	0,107	0,64
TE 3 semanas, PEGPH20 IV 2 semanas	1,36 $\pm$ 0,16	17,3	0,0003	N/A
TE 3 semanas, PEGPH20 intraprostata 2 semanas	1,38 $\pm$ 0,17	16,0	0,0009	N/A

Ejemplo 7

Formulaciones de Liposomas Multivesiculares (LMV) de PH20

Se prepararon diversas formulaciones de liposomas multivesiculares de PH20 (LMV-PH20) de liberación prolongada utilizando el siguiente procedimiento general. Las soluciones de lípidos contenían mezclas de diversos lípidos neutros, incluyendo triglicéridos (TG) trioleína ($C_{18:1}$), tricaprilina ($C_{8:0}$) y colesterol, y lípidos con cargas positivas y negativas, incluyendo fosfatidilcolinas (PC), dioleoil fosfatidilcolina (DOPC, $C_{18:1}$), dielucoyl fosfatidilcolina (DEPC, $C_{22:1}$) y dipalmitoil fosforilglicerol (DPPG, $C_{16:1}$). La concentración total de PC fue de hasta 19,8 mM, la concentración de colesterol fue de 30 mM, la concentración de TG fue de hasta 3,9 mM y la concentración de DPPG fue de 4,2 mM.

A. Generación de formulaciones de LMV-PH20

Se prepararon formulaciones de LMV que contenían un porcentaje molar variable de DEPC y DOPC (0-100%) y un porcentaje en moles variable de trioleína y tricaprilina (0-100%), DPPG, colesterol y 0,1, 0,25, 0,5, 1 ó 2 mg/mL de PH20. En resumen, en la primera etapa, los lípidos en cloroformo (fase oleosa) y PH20 en una primera solución acuosa (fase acuosa) se combinaron y emulsionaron para formar una emulsión de agua en aceite, por lo que la PH20 fue encapsulada por la monocapa de fosfolípido. En la segunda etapa, se añadió una segunda solución acuosa y se emulsionó, con lo que se formó una emulsión de agua en aceite en agua. Posteriormente, después de la adición de una segunda alícuota de la segunda solución acuosa, se evaporó el disolvente de cloroformo y el producto resultante que contenía liposomas multivesiculares se lavó varias veces en una tercera solución acuosa y se resuspendió hasta lipocrito de aproximadamente 50% (volumen de partículas empaquetadas) y se almacenó a 2-8°C.

Específicamente, las formulaciones se prepararon utilizando un mini vórtice o se prepararon a mayor escala utilizando un mezclador Omni (Omni Macro ES, Omni International, Kennesaw, GA). En el último método con el mezclador Omni, se emulsionó la solución lipídica en cloroformo (6 mL) a 7000 rpm durante 8 min con un mezclador Omni con 6 mL de la primera solución acuosa (His-HCl 10 mM, pH 6,5 con sacarosa al 5% que contenía concentraciones variables de PH20) produciendo una emulsión de agua en aceite. Una emulsión subsiguiente a 4500 rpm durante 1-3 minutos con 20 mL de una segunda solución acuosa de glucosa al 3,2% que contenía lisina 40 mM, pH 10,0, dio como resultado una segunda emulsión de agua en aceite en agua. La segunda emulsión se transfirió por igual a dos matraces Erlenmeyer y se añadió otra alícuota de 50 mL de la segunda solución acuosa a ambos matraces. El cloroformo se eliminó lavando con un chorro de nitrógeno la superficie de la emulsión a 35°C. Las partículas de LMV que contenían PH20 se lavaron tres veces con 50 mL de una tercera solución acuosa (tampón His-HCl 25 mM, pH 6,0 que contenía NaCl 120 mM) añadiendo la solución, mezclando el tubo de centrifuga por inversión y centrifugando a 3500 rpm durante 10 min a 4°C en una centrifuga de mesa refrigerada. Finalmente, las partículas de LMV se resuspendieron en la tercera solución acuosa para formar una formulación de lipocrito

aproximadamente al 50% y se almacenaron refrigeradas a 2-8°C. El procedimiento de mini vórtice fue similar, utilizando los parámetros expuestos en la Tabla 18.

5 La Tabla 18 a continuación resume la primera, segunda y tercera soluciones acuosas. La Tabla 18 también resume los volúmenes, las concentraciones de reactivos y otros parámetros de cada etapa del procedimiento LMV.

Tabla 18. Formulación y parámetros del procedimiento LMV-PH20					
1ª Solución acuosa	His-HCl 10 MM, pH 6,5 con sacarosa al 5%				
2ª Solución acuosa	glucosa al 3,2% que contiene lisina 40 mM, pH 10,0				
3ª Solución acuosa	His - HCl 25 mM, pH 6,0 que contiene NaCl 120 mM				
1ª Mezcla de Emulsión	Mezclador Vortex		Mezclador Omni		
PH20 en la 1ª solución acuosa	600 µL		6 mL		
Solución de lípido en cloroformo	600 µL		6 mL		
Volumen total	10,2 mL		12 mL		
1ª Velocidad de emulsión	RPM máximas		7000 RPM		
Tiempo	8 Min		8 Min		
Concentración de proteína PH20 de partida (actividad)	0,25 mg/mL (30,000 U/ mL)	0,5 mg/mL (60,000 U/ mL)	0.5 mg/mL (60.000 U/ mL)	1.0 mg/mL (120.000 U/ mL)	2.0 mg/mL (240.000 U/ mL)
PC	15,8-19,8 mM		15,8-19,8 mM		
Colesterol	30 MM		30 MM		
TG	3,75-3,9 mM		3,75-3,9 mM		
DPPG	4,2 mM		4,2 mM		
Tipo de hoja 1	No aplicable		Afilada en los lados		
Tipo de hoja 2	No aplicable		Afilada en los lados y en el interior		
Tipo de hoja 3	No aplicable		Plana por todas partes, no afilada		
2ª Mezcla de Emulsión	Mezclador Vortex		Mezclador Omni		
2Nd Solución acuosa	2,5 mL		20 mL		
Volumen total	3,7 mL		32 mL		
Velocidad	RPM máximas		4500 RPM		
Tiempo	15 segundos		1-3 min		
Evaporación del disolvente	Mezclador Vortex		Mezclador Omni		
2ª Solución acuosa	10 mL		100 mL		
Volumen total	13,7 mL		132 mL		
Velocidad del baño de agua agitada	100-130 RPM		100-130 RPM		
Hora	11 Min		15 Min		
Temperatura	35 DO		35 DO		
Lavado, cambio de tampón y resuspensión	Mezclador Vortex		Mezclador Omni		
Muestra	Muestra completa		17 mL		
3ª Solución Acuosa	50 mL		50 mL		
Volumen total	50 mL		200 mL		
Velocidad de centrifugación	3500 RPM		3500 RPM		

Tabla 18. Formulación y parámetros del procedimiento LMV-PH20

Tiempo	10 Min	10 Min
Número de lavados	3	3
Volumen de resuspensión	0,3-0,5 mL	3-5 mL
LIPOCRIT	Mezclador Vortex	Mezclador Omni
Volumen de sedimento	Varía	Varía
3ª Solución acuosa	Varía	Varía
Velocidad	3500 Rpm	3500 Rpm
Tiempo (min)	10 Min	10 Min
Volumen Solución + Sedimento	Varía	Varía
% Lipocrito Ajustado a	~50%	~50%

B. Resumen de las formulaciones de LMV-PH20

Se prepararon diversas formulaciones de LMV-PH20 que contenían razones molares variables de lípidos, PH20 y otros aditivos utilizando los mismos procedimientos generales que se han descrito anteriormente. Los diversos aditivos adicionales se incluyeron en la 1ª solución acuosa para mejorar y preservar la estabilidad de PH20 encapsulada. Por ejemplo, las formulaciones F68 y F69 contenían cloruro de calcio. La formulación F82 contenía 150 µL de glicerol como una interfase que separaba la fase de cloroformo de 600 µL y la primera fase de solución acuosa de 600 µL. La formulación F83 contenía dextrano 40.000 al 0,1% y PEG - 6000 al 0,1%. Las formulaciones F85-F87 contenían oligómeros de ácido hialurónico (HA). Diversas formulaciones variaron en sus procedimientos de mezcla/emulsificación. Por ejemplo, para la formulación F66, se llevó a cabo la primera etapa de emulsificación durante 4 minutos, en lugar de 8 minutos, dando como resultado sedimentos liposomales más pequeños. La formulación F67 se mezcló con una rueda de rotor, en lugar de un mini vórtice para generar menor cizallamiento durante la mezcla.

La Tabla 19 a continuación presenta varias formulaciones de LMV-PH20, incluyendo el número de formulación, las razones en % molar de PC (fosfatidilcolina) y TG (triglicérido) de la formulación, la concentración de PH20 de partida en mg/mL, el mezclador utilizado para preparar las emulsiones y aditivos cualesquiera que se incluyeran en la primera solución acuosa.

Tabla 19. Formulaciones de LMV con PH20

Formulación	% Molar de la Formulación de PC y TG	Concentración de PH20 mg/mL de partida	Mezclador	Aditivos en la Primera Solución Acuosa
F40	DEPC con Trioleína	0,25	Mini Vortex	N/A
F41	DEPC con Trioleína	0	Mini Vortex	N/A
F42	DEPC con Trioleína	0,25 marcado fluorescente	Mini Vortex	AlexaFluor 488 con la etiqueta PH20
F53	DEPC/DOPC 25/75; Trioleína/Tricap 25/75	0,25	Mini Vortex	N/A
F54	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Mini Vortex	N/A
F55	DEPC/DOPC 75/25; Trioleína/Tricap 75/25	0,25	Mini Vortex	N/A
F56	DEPC/DOPC 90/10; 90/10 Trioleína/Tricap	0,25	Mini Vortex	N/A
F61	DEPC/DOPC 50/50; 50/50 Trioleína/Tricap	0,25	Omni	N/A
F66	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Mini Vortex ¹	N/A

Tabla 19. Formulaciones de LMV con PH20

Formulación	% Molar de la Formulación de PC y TG	Concentración de PH20 mg/mL de partida	Mezclador	Aditivos en la Primera Solución Acuosa
F67	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Rueda Del Rotor	N/A
F68	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Mini Vortex	CaCl ₂ 20 mM de
F69	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Mini Vortex	CaCl ₂ 10 MM de
F70	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,0	Omni	N/A
F71	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Omni	N/A
F72	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,5	Omni	N/A
F73	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,5	Omni	N/A
F74	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	N/A
F75	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	2,0	Omni	N/A
F77 ²	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	
F78	DEPC con Trioleína	1,0	Omni	N/A
F79	DEPC con Trioleína	1,0	Omni	N/A
F80	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	N/A
F81	DEPC con Trioleína	0,5	Omni	N/A
F82	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,5	Mini Vortex	150 µL de Glicerol como interfase
F83	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	Dextrano 40,000 al 0,1% PEG-6000 al 0,1%
F84	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni ³	N/A
F85	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	15 mg/mL HA 74.000
F85R1	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	15 mg/mL HA 74.000
F86	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	50 mg/mL HA 74.000
F87	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	Prolina 100 µM
F88	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	Arg - HCl 100 mM, pH 6,44
F89	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	Sorbitol al 6%
F90	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	Trehalosa al 6%

¹Menor tiempo de mezclado de la primera emulsión (4 min)

²Se utiliza colesterol derivado de animales en lugar del colesterol derivado de plantas en la solución de lípidos

³Menor tiempo de mezclado de la primera emulsión (4 min) y menor tiempo de mezclado de la segunda emulsión (30 s)

Ejemplo 8

Co-Formulaciones de Liposomas Multivesiculares (LMV)

Se prepararon varios liposomas multivesiculares que contenían formulaciones combinadas de finasterida, dutasterida o PH20 utilizando el siguiente procedimiento general. Las soluciones de lípidos contenían mezclas de diversos lípidos neutros, incluyendo triglicéridos (TG) trioleína (C_{18:1}), tricaprilina (C_{8:0}) y colesterol, y lípidos con cargas positivas y negativas, incluyendo fosfatidilcolinas (PC), dioleoil fosfatidilcolina (DOPC, C_{18:1}), Dierucoil fosfatidilcolina (DEPC, C_{22:1}) y dipalmitoil fosforilglicerol (DPPG, C_{16:1}). La concentración total de PC fue de hasta 19,8 mM, la concentración de colesterol fue 30 mM. La concentración de TG fue de hasta 3,9 mM y la concentración de DPPG fue de 4,2 mM. En algunas formulaciones, la concentración total de todos los componentes lipídicos se incrementó, y en algunos otros, el contenido de colesterol se redujo. Se prepararon soluciones de finasterida o dutasterida en la solución lipídica.

A. Generación de Formulaciones combinadas de LMV-finasterida, dutasterida o PH20

Se prepararon formulaciones de LMV que contenían concentraciones variables de finasterida o dutasterida ya sea sin PH20, o con 0,1 mg/mL de PH20 en la primera solución acuosa. En resumen, en la primera etapa, se combinaron la finasterida o dutasterida y los lípidos en cloroformo (fase oleosa) y PH20 en una primera solución acuosa (fase acuosa) y se emulsionaron para formar una emulsión de agua en aceite, por lo que la PH20 fue encapsulada por la monocapa de fosfolípidos, y la finasterida o dutasterida se incorporaron a la capa lipídica. En la segunda etapa, se añadió una segunda solución acuosa y se emulsionó, con lo que se formó una emulsión de agua en aceite en agua. Posteriormente, después de la adición de una segunda alícuota de la segunda solución acuosa, se evaporó el cloroformo disolvente y el producto resultante que contenía liposomas multivesiculares se lavó varias veces en una tercera solución acuosa y se resuspendió hasta un lipocrito de aproximadamente 50% (volumen de partículas empaquetadas) y se almacenó a 2-8°C.

Específicamente, las formulaciones se prepararon utilizando un mini Vortex. El procedimiento con el mini Vortex fue similar al descrito en el ejemplo 7 utilizando los parámetros presentados en la Tabla 18, excepto que el volumen de la primera fase de solución acuosa fue 500 µL en lugar de 600 µL.

B. Resumen de Co-Formulaciones de LMV-finasterida, dutasterida o PH20

Se prepararon varias formulaciones combinadas que contenían LMV-finasterida, dutasterida o PH20 utilizando los mismos procedimientos generales que se han descrito anteriormente. Se prepararon formulaciones con concentraciones variables de finasterida o dutasterida. También se sometieron a ensayo diversas concentraciones de lípidos. Por ejemplo, las formulaciones F3 y F4 contenían menor concentración de colesterol; 15 mM en lugar de 30 mM. Las formulaciones F5, F6 y F7 contenían mayores concentraciones de todos los lípidos. La Tabla 20 a continuación presenta varias formulaciones combinadas de LMV-finasterida, dutasterida y PH20, incluyendo el número de formulación, la composición de lípidos y las concentraciones de partida de finasterida, dutasterida o PH20 en mg/mL.

Tabla 20. Formulaciones de LMV con finasterida, o dutasterida, o PH20, y combinación

Formulación	Composición de lípidos	Concentración de finasterida en solución (mg/mL)	Concentración de dutasterida en solución (mg/mL)	Concentración de PH20 en la primera solución acuosa (mg/mL)
F1	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	25	N/A	0,1
F2	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	5	N/A	Sin PH20

Tabla 20. Formulaciones de LMV con finasterida, o dutasterida, o PH20, y combinación

Formulación	Composición de lípidos	Concentración de finasterida en solución lipídica (mg/mL)	Concentración de dutasterida en solución lipídica (mg/mL)	Concentración de PH20 en la primera solución acuosa (mg/mL)
F3	DEPC 19,8 mM, 3,9 mM de Trioleína, DPPG 4,2 mM, colesterol 15 mM	0	N/A	Sin PH20
F4	DEPC 19,8 mM, 3,9 mM de Trioleína, DPPG 4,2 mM, colesterol 15 mM	5	N/A	Sin PH20
F5	52,8 mM de DEPC, 10,4 mM de Trioleína, 11,2 mM de DPPG, colesterol 80 mM	5	N/A	Sin PH20
F6	52,8 mM de DEPC, 10,4 mM de Trioleína, 11,2 mM de DPPG, colesterol 80 mM	2,5	N/A	Sin PH20
F7	52,8 mM de DEPC, 10,4 mM de Trioleína, 11,2 mM de DPPG, colesterol 80 mM	1,25	N/A	Sin PH20
F12	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	0,5	N/A	Sin PH20
F13	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	0,5	N/A	0,1
F18	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	10	N/A	Sin PH20
F19	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	10	N/A	0,1
F20	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	10	N/A	0,1
F21	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	15	N/A	Sin PH20
F22	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	15	N/A	0,1
F23	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	20	N/A	Sin PH20

Tabla 20. Formulaciones de LMV con finasterida, o dutasterida, o PH20, y combinación

Formulación	Composición de lípidos	Concentración de finasterida solución (mg/mL)	de en lipídica	Concentración de dutasterida solución (mg/mL)	de en lipídica	Concentración de PH20 en la primera solución acuosa (mg/mL)
F24	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	20		N/A		0,1
F25	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	N/A		N/A		0,1
F27	19,8 mM DEPC, 3,9 mM Trioleína, 4,2 mM DPPC, 30 mM colesterol	N/A		0,5		Sin PH20
F28	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	N/A		0,5		0,1
F29	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	N/A		5		Sin PH20
F30	DEPC 19,8 mM, Trioleína 3,9 mM, DPPG 4,2 mM, colesterol 30 mM	N/A		5		0,1

Ejemplo 9**Métodos Analíticos y Caracterización de Formulaciones**

En este ejemplo, se describen varios métodos y procedimientos de ensayo analíticos para la caracterización de las formulaciones y co-formulaciones de LMV-PH20. Los métodos de ensayo permiten la determinación del contenido de PH20, la actividad de PH20 y la caracterización de partículas de LMV, tales como tamaño de partícula, lipocrito, observación microscópica y liberación *in vitro* de PH20.

A. Contenido de PH20, finasterida y dutasterida por HPLC de Fase Inversa (RP)

En este ejemplo, se determinó el contenido de PH20, incluyendo la concentración de suspensión y el porcentaje de concentración de PH20 libre, mediante HPLC de fase inversa. La columna de HPLC y los parámetros del método se exponen en la Tabla 21 a continuación. La separación se realizó utilizando el gradiente de HPLC como se expone en la Tabla 22 a continuación.

Tabla 21. Columna RP-HPLC y Parámetros del Método

Columna	Columna Agilent Zorbax 300 SB-C18 (4,6 x 250 mm) (Número de Cat. 880995-902) con un tamaño de partícula de 5 micras y filtro en línea
Volumen de inyección	50 µL
Detección λ	210 nm y 280 nm
Velocidad de flujo	1,0 mL/min
Temperatura de la columna	40°C ± 1°C
Cargador de Muestras	Ambiente

Tabla 21. Columna RP-HPLC y Parámetros del Método	
Disolvente A	100% Agua, ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%
Disolvente B	100% Acetonitrilo, TFA al 0,1%
Tiempo de Ejecución	60 Min
Patrones de PH20	0,5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL en SDS al 1% en primer tampón acuoso (His-HCl 10 mM, pH 6,5 con sacarosa al 5%)
Patrones de finasterida o dutasterida	0,5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL en isopropanol al 90%/HCl 2N al 10%

Tabla 22. Gradiente de HPLC		
Tiempo (min)	% Disolvente A	% Disolvente B
0-15	95	5
15-15,5	75	25
15,5-25,5	50	50
25,5-26	20	80
26-39	5	95
39-40	5	95
40-60	95	5
60	95	5

1. Concentración total de PH20 (suspensión)

- 5 La concentración en suspensión de PH20 es la concentración de PH20 en la suspensión de LMV. Cuando el lipocrito se ajusta a 50%, la concentración de formulación de PH20 es la mitad de la carga del fármaco. Para determinar la concentración de suspensión de PH20, se llevó la formulación de LMV a temperatura ambiente y se volvió a suspender realizando un movimiento oscilante suavemente hacia atrás y hacia adelante hasta que la suspensión fue homogénea, colocándola en un Mezclador de Sangre Hemavet durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se
- 10 añadieron 50 µl de la suspensión de LMV a 450 µl de SDS al 1% en un primer tampón acuoso (His-HCl 10 mM, pH 6,5 con sacarosa al 5%) en un tubo de microcentrífuga Eppendorf. El tubo se sometió a vórtice a fondo y posteriormente se dejó reposar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. El material de extracción se centrifugó a 14.000 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante se retiró para su análisis mediante RP-HPLC, como se ha descrito anteriormente. La concentración de PH20 se calculó frente a una curva patrón determinada de acuerdo
- 15 con la Tabla 20 anterior y se presentó como la concentración total. También se presentaron el porcentaje de pureza del pico principal, el porcentaje de picos de oxidación, clips y otros degradantes después de restar los picos no proteicos del cromatograma.

2. Porcentaje de Concentración de PH20 Libre

- 20 Porcentaje de PH20 libre es la cantidad de PH20 no encapsulada que está en el sobrenadante, expresada como un porcentaje de la cantidad total de PH20 en la formulación. Para determinar el porcentaje de concentración de PH20 libre, la formulación de LMV se llevó a temperatura ambiente y se volvió a suspender realizando un movimiento oscilante suavemente hacia atrás y hacia adelante hasta que la suspensión fue homogénea, colocándola en un
- 25 Mezclador de Sangre Hemavet durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0,5 mL de la suspensión de LMV a un tubo de microcentrífuga Eppendorf y se centrifugaron durante 10 min a 3.000 rpm. Se transfirieron 100 µl de sobrenadante a un inserto de viales de HPLC, asegurándose de no alterar el sedimento de liposomas. Se añadieron 100 µl de SDS al 2% en primer tampón acuoso al inserto y el contenido se mezcló completamente pipeteando y posteriormente se dejó incubando durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se
- 30 colocaron en un cargador de muestras y a continuación se analizaron mediante RP-HPLC a temperatura ambiente para evitar la precipitación con SDS a temperaturas más bajas. La concentración de PH20 se calculó contra una curva patrón y se utilizó para calcular el % de PH20 libre utilizando la siguiente ecuación:

35

$$\% \text{ de PH20 libre} = \frac{[\text{PH20 en el sobrenadante}] \times (100 - \text{lipocrito})}{\text{[PH20 en el sobrenadante]} \times (100 - \text{lipocrito})}$$

[PH20 Total]

B. Cromatografía de exclusión por tamaño-HPLC (SEC-HPLC)

En este ejemplo, se utilizó la SEC-HPLC para determinar las cantidades relativas de proteína de alto peso molecular (HMWP), es decir, agregados unidos covalentemente, de PH20 presente en la muestra. En resumen, la formulación de LMV se llevó a temperatura ambiente y se volvió a suspender realizando un movimiento oscilante suavemente hacia atrás y hacia adelante hasta que la suspensión fue homogénea, colocándola en un Mezclador de Sangre Hemavet durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µl de la suspensión de LMV a 450 µl de octilglucósido al 1% en un primer tampón acuoso (His-HCl 10 mM, pH 6,5 con sacarosa al 5%) en un tubo de microcentrífuga Eppendorf y el tubo se sometió a vórtice brevemente. Las muestras se agitaron a 600 rpm en un incubador a 30°C durante 30 minutos. El material extraído se centrifugó durante 2 min a 14.000 rpm y el sobrenadante se retiró para análisis SEC-HPLC, de acuerdo con la columna y los parámetros del método expuestos en la Tabla 23 a continuación. La concentración máxima de monómero se calculó a partir de la curva patrón y se informó de la concentración. Si los agregados proteicos eran detectables a partir del análisis espectral, después de excluir los picos de las micelas lipídicas, se informó de la agregación porcentual (%).

Tabla 23. Columna SEC-HPLC y Parámetros del Método

Columna	Columna SEC TSK G3000 SWXL con tamaño de partícula de 5 micras con dimensiones de columna (7,8 mm X 300 mm) con un filtro en línea
Volumen de inyección	100 µL
Detección λ	210 y 280 nm
Velocidad de flujo	1,0 mL/min
Tiempo de ejecución	24 Min
Temperatura de la columna	Ambiente
Cargador de Muestras	Ambiente
Fase Móvil (Isocrática)	Disolvente A: tampón de fosfato de sodio 300 mM pH 7,4 (Na ₂ HPO ₄ 300 mM ajustado a pH 7,4 con ácido fosfórico)
Patrones de Filtración en Gel	Mezcla de patrones de proteínas de 1,2 kDa a 660 kDa de Bio-Rad o equivalente
Primer tampón acuoso	His - HCl 10 mM, pH 6,5 con sacarosa al 5%
Patrones de PH20	0,5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL en octilglucósido al 1% en el primer tampón acuoso

C. Caracterización de Partículas**1. Análisis del tamaño de partícula**

La distribución del tamaño de partícula, o diámetro medio de la distribución, es la distribución de tamaño ponderada en volumen de los diámetros de partícula de LMV, medida por medio de un Analizador de Tamaño de Partícula mediante Difracción Láser. El diámetro medio de las partículas de LMV en suspensión se mide utilizando un Analizador de Distribución de Tamaño de Partícula mediante Dispersión láser Horiba LA-910. Brevemente, la formulación de LMV se resuspende en un Mezclador de Sangre Hemavet durante 10 min a temperatura ambiente. Se añaden 10 mL de solución salina normal a una célula de cuarzo de 12 mL de capacidad, seguido de la adición de aproximadamente 10 µl de la suspensión de LMV. El contenido de la cubeta se mezcla a fondo y se mide el tamaño de partícula.

2. Lipocrito (Volumen de Partículas Empaquetadas, PPV)

El Lipocrito es el porcentaje del volumen de partículas empaquetadas de una suspensión de LMV. Los lipocritos se determinaron añadiendo 70 µl de suspensión de LMV al tubo capilar de Micro-Hematocrito, taponando un extremo utilizando Crit-O-Seal o una masilla de sellado similar y centrifugando los tubos durante 10 min a 600 g. Después de centrifugar, se midieron las longitudes de sobrenadante y de sedimento. El lipocrito se calculó tomando el cociente de la longitud del sedimento respecto a la longitud combinada de sobrenadante/sedimento x 100 para proporcionar el % de PPV o % de Lipocrito. El lipocrito objetivo es 50%.

3. Observación microscópica de partículas de LMV

Las partículas de LMV se observaron utilizando microscopía de contraste de fase. Brevemente, la suspensión de LMV se resuspendió a fondo y se añadió una alícuota de 50 µL en un tubo Eppendorf que contenía 50-200 µL de solución salina normal. La muestra se mezcló invirtiendo suavemente el tubo y se transfirieron 10 µL a un portaobjetos de microscopio. Se colocó suavemente un cubreobjetos sobre la muestra de LMV y se examinó la muestra bajo un microscopio utilizando un aumento de 10X, 20X y 40X. Las imágenes fueron grabadas con una cámara digital conectada al microscopio.

Las formulaciones LMV se caracterizaron mediante microscopía óptica o microscopía fluorescente.

D. Actividad enzimática de PH20

1. Análisis de Actividad Enzimática de HA Biotinilada

La actividad de PH20 se evaluó utilizando un análisis enzimático rápido de HA biotinilada, en el que se midió la actividad enzimática utilizando un análisis de microtitulación en el que se mide el ácido hialurónico residual biotinilado después de la incubación con hialuronidasa (véanse p.ej. Frost y Stem (1997) Anal. Biochem. 251:263-269, Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 20050260186). En tales análisis, los grupos carboxilo libres sobre los residuos de ácido glucurónico del ácido hialurónico fueron biotinilados y el sustrato de ácido hialurónico biotinilado se acopló covalentemente a una placa de microtitulación. Después de la incubación con hialuronidasa, se detectó el sustrato de ácido hialurónico biotinilado residual utilizando una reacción de avidina-peroxidasa, y se comparó con el obtenido después de la reacción con patrones de hialuronidasa de actividad conocida.

2. Actividad de PH20 Total (Suspensión)

La actividad PH20 total es una medida de la actividad de la PH20 que está dentro y fuera del liposoma. En resumen, la formulación de LMV se llevó a temperatura ambiente y se volvió a suspender realizando un movimiento oscilante suavemente hacia atrás y hacia adelante hasta que la suspensión fue homogénea, colocándola en un Mezclador de Sangre Hemavet durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µl de la suspensión de LMV a 450 µl de octilglucósido al 10% en un primer tampón acuoso (His-HCl 10 mM, pH 6,5 con sacarosa al 5%) en un tubo de microcentrifuga Eppendorf y el tubo se sometió a vórtice brevemente. Las muestras se agitaron a 600 rpm en un incubador a 30°C durante 30-90 minutos o durante una noche a 4°C. El material extraído se centrifugó durante 2 min a 14.000 rpm. Se retiraron las muestras, se diluyeron en tampón de ensayo que contenía octilglucósido al 1% y se cargaron en una placa de microtitulación. La actividad enzimática de PH20 se determinó utilizando un análisis rápido de hidrólisis de HA biotinilado (véase el Ejemplo D.1). La actividad fue referida en U/mL. La actividad específica se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad Específica} = \frac{\text{Actividad en U/mL}}{\text{Concentración total de proteína en suspensión en (RP-HPLC)}}$$

3. Porcentaje de Actividad de PH20 Libre

El porcentaje de actividad de PH20 libre es una medida de la actividad de PH20 que está fuera del liposoma debido al escape/PH20 residual durante la preparación de LMV-PH20. La formulación de LMV se llevó a temperatura ambiente y se volvió a suspender realizando un movimiento oscilante suavemente hacia atrás y hacia adelante hasta que la suspensión fue homogénea, colocándola en un Mezclador de Sangre Hemavet durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0,5 mL de la suspensión de LMV a un tubo de microcentrifuga Eppendorf y se centrifugaron durante 10 min a 3.000 rpm. Se transfirieron 100 µl de sobrenadante a un inserto de viales de HPLC, asegurándose de no alterar el sedimento de liposomas. Se añadieron 100 µl de SDS al 2% en primer tampón acuoso al inserto y el contenido se mezcló completamente pipeteando y posteriormente se dejó reposar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. La actividad de PH20 se determinó como se ha descrito en el Ejemplo D. anterior.

E. Resumen de caracterización de diversas preparaciones de LMV-PH20

1. Formulaciones de LMV-PH20

Se generaron diversas formulaciones de LMV-PH20 y se analizaron utilizando los métodos de ensayo descritos anteriormente. Los resultados de algunas de las formulaciones preparadas se resumen en las Tablas 24-27 a continuación. Antes de su uso, cada formulación que se generó se caracterizó como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, las formulaciones de LMV-PH20 preparadas con el mezclador Omni también se evaluaron como se ha

descrito anteriormente. Estas formulaciones exhibieron una buena encapsulación, una actividad específica para PH20 de 31.000 a 55.000 U/mg en el producto lisado total. La actividad PH20 total del producto lisado se mejoró adicionalmente, aumentando los tiempos de extracción (60-90 min) con octilglucósido, en el intervalo de 71.000 a 90.000 U/mg. La PH20 libre, filtrada del liposoma, mostró una actividad específica de >100.000 U/mg.

La Tabla 26 a continuación describe el contenido de PH20 y la actividad en las fracciones sobrenadantes de las formulaciones de LMV-PH20. El contenido total de PH20 del producto lisado (suspensión) y la actividad de las formulaciones de LMV-PH20, después de un aumento del tiempo de extracción con octilglucósido, se exponen en la Tabla 27. Además, la integridad de la PH20 se conservó durante el procedimiento de fabricación, con una pureza >90% del pico de PH20 principal del análisis mediante RP-HPLC.

Tabla 24. Caracterización de Diversas Preparaciones de LMV-PH20						
Formulación	F40	F53	F54	F55	F56	F61
Volumen (mL)	3,75	1,9	1,9	1,3	1,5	10
Lipocrito %	50	44	45	47	44	50
Concentración total (suspensión) de PH20 (mg/mL)	0,18	0,13	0,14	0,14	0,13	0,13
Concentración de partículas de PH20 empaquetadas (mg/mL)	0,36	0,3	0,31	0,3	0,3	0,26
Eficacia de la encapsulación	64	40	44	30	32	87
Actividad Total (Suspensión) de PH20 U/mL	3520	6560	6477	6587	5927	2572
RP-HPLC mg/mL (extracción de OG al 10%),	ND	ND	ND	ND	ND	0,09
% Recuperación de Actividad	17	42	39	39	38	17

Tabla 25. Análisis de las Formulaciones LMV						
Form.	% Lipocrito	Volumen (mL)	Microscopía	Actividad Total (Suspensión) de PH20 (U/mL)	[Proteína Total (Suspensión)] (mg/mL)	Actividad Específica Total (Suspensión) (U/mg)
F70	N/A	N/A	Liposoma formado	N/A	N/A	N/A
F71	51	4	Liposoma formado	1071	0,11	9739
F72	45	4,2	Liposoma formado	2151	0,23	9352
F73	50	4	Liposoma formado	1176	0,24	4900
F74	48,8	5	Liposoma formado	10293	0,33	31191
F75	40	3,5	Liposoma formado	6292	0,29	21697
F77	42	4	Liposoma formado	4993	0,26	19202
F78	46	4	Liposoma formado	2981	0,32	9316
F79	40	4	Liposoma formado, mucha espuma después de la 2ª emulsión	938	ND	NA
F80	40	4	Liposoma formado, mucha espuma después de la 2ª emulsión	930	ND	NA
F81	41	4	Liposoma formado	1375	0,23	5978
F82	45	0,5	Liposoma formado	1546	0,1	15459
F83	54,237	5	Liposoma formado	4077	0,46	8863
F84	NA	200 µL	Sedimento muy pequeño	ND	ND	NA

Tabla 25. Análisis de las Formulaciones LMV

Form.	% Lipocrito	Volumen (mL)	Microscopía	Actividad Total (Suspensión) de PH20 (U/mL)	[Proteína Total (Suspensión)] (mg/mL)	Actividad Específica Total (Suspensión) (U/mg)
F85	55	8	Liposoma formado	16116	0,363	44397
F86	51	7,5	Liposoma formado	13182,67	0,238	55389
F87	54	5,5	Liposoma formado	8346,75	0,283	29494
F88	46	9,2	Liposoma formado	14544	0,256	56813
F89	45	4,9	Liposoma formado	ND	ND	ND
F90	50	5,95	Liposoma formado	ND	ND	ND

NA: No aplicable
ND: No determinado

Tabla 26. Análisis del sobrenadante de PH20 en Formulaciones de LMV

Form.	Actividad Sobrenadante (U/mL)	del RP - HPLC Sobrenadante (mg/mL)	Actividad específica Sobrenadante (U/mg)	del % PH20 libre
F85	3246	NA	NA	NA
F85R1	3678	0,073	50384	9,21
F86	2829	0,057	49632	11,74
F87	2617,5	0,059	44364	9,59
F88	5680,67	0,092	61746	19,41

Tabla 27. Aumento de actividad de PH20 en LMV después de incrementar los tiempos de extracción (60-90 min a temperatura ambiente) con octilglucósido

Form.	[PH20 Total (Suspensión)] (mg/mL)	Actividad Total (Suspensión) de PH20 (U/mL)	Actividad específica (U/mg)
F74	0,33	23439	71027
F85	0,36	32058	88314
F88	0,26	23091	90199

5 2. Co-formulaciones de LMV-PH20

Se generaron y analizaron diversas formulaciones de LMV-finasterida, dutasterida o combinaciones que contenían también PH20 utilizando los métodos de ensayo descritos anteriormente. Los resultados muestran que a mayor concentración de finasterida o dutasterida (5-25 mg/mL), se observaron estructuras microtubulares además de las partículas características de LMV. La distribución relativa de las estructuras microtubulares fue mayor con el aumento de la concentración de finasterida o dutasterida. Se formaron partículas con una mejor morfología global en términos de estructuras lisas redondeadas a una concentración de fármaco de 5 mg/mL utilizando colesterol 30 mM; mientras que las formulaciones en las que se utilizaba colesterol 15 mM dieron como resultado una formación de partículas mala a esta concentración de fármaco. A concentraciones más bajas de finasterida o dutasterida (0,5-5 mg/mL), o utilizando un aumento de concentración lipídica total, se observó una morfología de partícula mucho mejor característica de la estructura de LMV y una mayor eficacia de incorporación del fármaco. La Tabla 28 describe características de algunas de las formulaciones. La actividad de PH20 total (suspensión) extraída de formulaciones que contenían PH20, expuesta en la Tabla 28, fue <150 U/mL.

Tabla 28. Análisis de las formulaciones de LMV-finasterida y dutasterida

Descripción de la formulación	Concentración de Partida de Finasterida/Dutasterida mg/mL	Concentración total (suspensión) de finasterida o Dutasterida mg/mL

Tabla 28. Análisis de las formulaciones de LMV-finasterida y dutasterida

Descripción de la formulación	Concentración de Partida de Finasterida/Dutasterida mg/mL	Concentración total (suspensión) de finasterida o Dutasterida mg/mL
F13 finasterida baja	0,5	0,12
F24 finasterida alta	20	8,5
F27 dutasterida baja	0,5	0,19
F29 dutasterida alta	5	4,3

Ejemplo 10**Efecto de la concentración de PH20 en 1ª fase acuosa sobre los atributos de LMV-PH20**

Las formulaciones F71-F75 que contenían cantidades de PH20 iniciales de 0,25, 0,5, 1 y 2 mg/mL se generaron como se describe en el Ejemplo 7 y se compararon con la actividad enzimática de PH20, el contenido de PH20 y el rendimiento en volumen total utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 9 para determinar el efecto de la concentración de partida de PH20 sobre estos atributos. Los resultados muestran que a medida que aumentaba la cantidad de PH20 de partida, aumentaban la actividad en U/mL y la actividad específica en U/mg aumentando ambas cinco veces y tres veces la actividad y la actividad específica, respectivamente, en formulaciones que contenían 1 mg/mL de PH20 de partida. La actividad y la actividad específica disminuyeron ligeramente en formulaciones que contenían 2 mg/mL de PH20 de partida. La concentración total de proteína aumentó para todas las formulaciones, mientras que el rendimiento de volumen total en mL fue aproximadamente el mismo para todas las formulaciones.

Ejemplo 11**Liberación de proteína *in vitro* en tampón o plasma de rata**

Las formulaciones de LMV-PH20 se evaluaron para determinar su liberación de PH20 a lo largo del tiempo en tampón o plasma de rata. Brevemente, se añadió una alícuota de 500 µl de la formulación de LMV-PH20 a 2 mL de plasma de rata que contenía azida de sodio al 0,01% o un tercer tampón acuoso y se mezcló a fondo. La mezcla se sometió a una rotación de 12 ciclos en un agitador a 37°C. Se retiraron alícuotas de 2,5 mL los días 0, 1, 3, 5 y 7 para su análisis. Se analizaron 200 µl de cada alícuota por medio de microscopía óptica. Se añadieron 2 mL de cada alícuota a 2 mL de solución salina, se transfirieron a un tubo de 15 mL y se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y se determinó su actividad PH20 en presencia de octilglucósido al 1%, como se describe en el Ejemplo 9, sección D anterior. El sedimento se lavó en solución salina, se centrifugó y se añadieron 1000 µL de SDS al 1%. El contenido de PH20 se determinó mediante HPLC.

Los resultados muestran que con el curso del tiempo, se observó una disminución del porcentaje de PH20 en el sedimento de liposomas, que se estabilizó después del día 5. Por ejemplo, en tampón, liberación de proteína *in vitro* fue aproximadamente 90% del contenido de proteína del día 0 el día 1, aproximadamente 75% del contenido de proteína del día 0 el día 3 y aproximadamente 60% del contenido de proteína del día 0 el día 5. El porcentaje de PH20 en el sedimento de liposomas no disminuyó adicionalmente el día 7, pero se mantuvo estable. En plasma de rata, la liberación de proteína *in vitro* fue aproximadamente 90% del contenido de proteína del día 0 el día 1, aproximadamente 80% del contenido de proteína del día 0 el día 3, aproximadamente 65% del contenido de proteína del día 0 el día 5, que también permaneció constante el día 7.

Los resultados también mostraron que la actividad de PH20 liberada al medio era más alta en plasma de rata que en el tercer tampón acuoso. Para cada uno, se observó un incremento inicial de la actividad observada en el medio el día 1 con una actividad de casi 200% con respecto al plasma de rata el día 0 y aproximadamente 150% de actividad con respecto al tampón el día 0. La actividad se estabilizó después del día 1 con una leve disminución hasta el día 7.

Ejemplo 12**Efecto de las Formulaciones de LMV-PH20 sobre el Tejido Hiperplásico de Próstata inducido por TE**

En este ejemplo, se evaluaron diversas formulaciones de LMV-PH20 para determinar su efecto sobre el tejido de próstata hiperplásico inducido por TE utilizando el modelo HBP de rata descrito en el Ejemplo 2 anterior.

A. Análisis histológico

1. Caracterización de las formulaciones LMV-PH20 utilizadas

Antes de los experimentos realizados en este ejemplo, las formulaciones se caracterizaron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 8. Cada una de las formulaciones que contenían PH20 contenía una cantidad de partida inicial de 0,25 mg/mL de PH20. Los resultados se exponen en la Tabla 29 a continuación. Las formulaciones de LMV-PH20_{F40} y de control de vehículo también se analizaron por medio de microscopía óptica. Los resultados mostraron la PH20 encapsulada en los liposomas. La formulación de AlexaFluor 488-PH20 se analizó mediante microscopía óptica y microscopía de fluorescencia. Los resultados mostraron que PH20 marcada con AlexaFluor 488 era encapsulada en los liposomas.

Tabla 29. Caracterización de las preparaciones de LMV-PH20

Formulación	Volumen (mL)	% Lipocrito	Encapsulación (mg/mL)	Actividad (U/mL)	% Recuperación de la Actividad
LMV-PH20 _{F40}	3,75	50	0,15	3500-5200	30
F41 Control de Vehículos	3,75	47	0	<LLOQ	N/A
Alexa488-PH20 _{F42}	3,0	50	0,15	1000	30

LLOQ: Límite inferior de cuantificación

2. Resumen del análisis histológico de la próstata tratada

A las ratas se les administraron dosis de TE con y sin LMV-PH20 similar al Ejemplo 3.B, excepto que LMV-PH20 se administró por medio de inyección intraprostática. La recolección, fijación e histología de tejido prostático para la localización de HA también se realizó como se describe en el Ejemplo 3.B.

Los resultados muestran que la mayoría del HA se degradó después de la administración de LMV-PH20_{F40} mediante inyección intraprostática el día 1 y el HA se degradó parcialmente en la zona próxima a la administración de LMV-PH20_{F40} el día 3. El HA no se degradó los días 5, 7 y 10. Se observó que las ratas a las que se habían administrado dosis de Alexa488-PH20_{F42} contenían un gran porcentaje de PH20 fluorescente que permanecía en el sitio de inyección sugiriendo un período inicial de liberación seguido de muy poca liberación. Esto se esperaba debido a los componentes lipídicos de liberación muy lenta que estabilizaban la membrana de esta formulación.

B. Tratamiento con LMV-PH20_{F40}

En un estudio separado, se sometió a ensayo el efecto de LMV-H20_{F40} sobre el Tejido con Hiperplasia Prostática inducida por TE.

1. Caracterización de las formulaciones de LMV

Cada formulación de LMV-PH20 sometida a ensayo contenía una cantidad de partida inicial de 0,25 mg/mL de PH20 y se caracterizó como se describe en el Ejemplo 9, con los resultados expuestos en la Tabla 30 a continuación.

Tabla 30. Caracterización de las preparaciones de LMV-PH20

Formulación	Volumen (mL)	% Lipocrito	Encapsulación (mg/mL)	Actividad (U/mL)	% Recuperación de la Actividad
LMV-PH20 _{F40}	3	50	0,17	5098	24
F41 Control con Vehículo	2,5	52	0	<LLOQ	N/A

LLOQ: Límite inferior de cuantificación

2. Análisis del Tejido Prostático Tratado

En este estudio, se administraron 25 mg de TE por vía intravenosa a cada rata los días 1 y 7. Se administraron intraprostáticamente 50 µl de LMV-PH20_{F40} de 4700 U/mL (0,18 mg/mL) y 50 µL de LMV-Vehículo el día 7. Las ratas fueron sacrificadas el día 9 para analizar la próstata [HA], días 8, 10 y 14 para analizar la apoptosis y el día 14 para analizar el peso de la próstata.

Los resultados muestran que 1 y 3 días después de la administración de LMV-PH20_{F40}, se retiró el HA adyacente a los LMV. Siete días después del tratamiento, estuvo presente el HA. Por lo tanto, se observó una reducción del HA de la próstata hasta 3 días después del tratamiento. Se analizó la apoptosis de las células del estroma los días 8, 10 y 14. No se observaron diferencias en los niveles de apoptosis entre la próstata tratada con vehículo y tratada con LMV-PH20_{F40} al día 1 después de la administración. Al día 3 después de la administración, se observó un aumento de la apoptosis en la próstata tratada con LMV-PH20_{F40}. El día 7 después de la administración, no se observó apoptosis inducida por PH20 en la próstata tratada con LMV-PH20_{F40}. El efecto del tratamiento con LMV-PH20_{F40} sobre el peso prostático se muestra en la Tabla 31 a continuación. Con fines comparativos, la próstata normal de rata pesa aproximadamente 0,6 g. El tratamiento con LMV-PH20_{F40} dio como resultado una disminución significativa en el tamaño de la próstata en comparación con el tratamiento con LMV-control con vehículo.

Tabla 31. Comparación del peso prostático en el día 14

		Peso Prostático (g) Media $\pm$ DT	Valor P	% Reducción relativa al control con vehículo
LMV-Control	con	1,298 $\pm$ 0,125	n/a	n/a
LMV-PH20 _{F40}		1,035 $\pm$ 0,079	< 0,0001	20,2
Próstata normal		0,6 g	n/a	n/a

C. Tratamiento con Formulaciones de LMV-PH20

Se sometieron a ensayo las formulaciones de LMV-PH20 para determinar su efecto sobre el Tejido con Hiperplasia Prostática inducida por TE.

1. Caracterización de las formulaciones de LMV-PH20

Cada formulación de LMV-PH20 sometida a ensayo contenía una cantidad de partida inicial de 0,25 mg/mL de PH20 en la 1ª solución acuosa y se caracterizó como se describe en el Ejemplo 9, con los resultados expuestos en la Tabla 32 a continuación.

Tabla 32. Caracterización de las preparaciones de LMV-PH20

Formulación	Volumen (mL)	% Lipocrito	Encapsulación (mg/mL)	Actividad de PH20 (U/mL)	% Actividad Recuperación
53	1,9	44	0,13	6560	42
54	1,9	45	0,14	6477	39
55	1,3	47	0,14	6587	39
56	1,5	44	0,13	5927	38

2. Análisis del tejido prostático tratado

En este estudio, se administraron 25 mg de TE por vía intravenosa a cada rata los días 1 y 7. Se administraron intraprostáticamente 50 μ L de LMV-PH20_{FX} al lóbulo derecho de la próstata y se administraron intraprostáticamente 50 μ L de LMV-Vehículo_{FX} al lóbulo izquierdo de la misma próstata de rata. La notación FX hace referencia a la formulación específica que se evaluó como F53, F54, F55 o F56. Las ratas se sacrificaron el día 14 y se analizaron para determinar el peso y la histología de la próstata.

Los datos se muestran en la Tabla 33 a continuación, que expone la formulación, la actividad y el porcentaje de reducción aproximada de peso de la próstata con respecto al tratamiento con el vehículo. El tratamiento con todas las formulaciones causó una reducción en el tamaño de la próstata. El tratamiento con la formulación F54 condujo a una reducción de 45% del tamaño de la próstata.

Tabla 33. Reducción de la Hiperplasia de la Próstata Inducida por TE

Formulación	Actividad de PH20 (U/mL)	% Reducción Aproximada (respecto al vehículo)
F53	6560	16

Tabla 33. Reducción de la Hiperplasia de la Próstata Inducida por TE		
Formulación	Actividad de PH20 (U/mL)	% Reducción Aproximada (respecto al vehículo)
F54	6477	45
F55	6587	9
F56	5927	8

D. Tratamiento con LMV-PH20_{F40} y LMV-PH20_{F54} y Finasterida

1. Caracterización de las formulaciones de LMV-PH20

Cada formulación de LMV-PH20 contenía una cantidad de partida inicial de 0,25 mg/mL de PH20 en la 1ª solución acuosa y se caracterizó como se describe en el Ejemplo 9, exponiéndose los resultados en la Tabla 34 a continuación. Se pronostica que LMV-PH20_{F40} tenga una velocidad de liberación de PH20 lenta y Se pronostica que LMV-PH20_{F54} tenga una velocidad de liberación de PH20 media basándose en la longitud de cadena de ácido graso de la composición de PC y TG.

Tabla 34. Caracterización de las preparaciones de LMV-PH20					
Formulación	Volumen (mL)	% Lipocrito	Encapsulación (mg/mL)	Actividad de PH20 (U/mL)	% Recuperación de la Actividad
LMV-PH20 _{F40}	4	50	0,19	1320	<10
Control de vehículos	4	47 0		<LLOQ	N/A
LMV-PH20 _{F54}	3	50	0,23	3057	12

2. Análisis del Tejido Prostático Tratado

En este estudio, se administraron por vía intravenosa 25 mg de TE a cada rata los días 1 y 7. Se administraron intraprostáticamente 50 µL de LMV-PH20_{F40} LMV-PH20_{F54} a cada rata el día 7. Se administraron 2,5 mg/kg de Finasterida por medio de inyección intraperitoneal a cada rata diariamente, comenzando el día 7. El diseño del estudio se expone en la Tabla 35 a continuación.

Tabla 35. Diseño del estudio					
Grupo	TE 25 mg/rata/semana	LMV-PH20 I-Pr día 7	Finasterida 2,5 mg/kg ip por día	Día hasta sac	n
1	Día 0, 7	-	-	14	12
2	Día 0, 7	-	Días 7-13	14	12
3	Día 0, 7	F40, día 7	-	14	12
4	Día 0, 7	F54, día 7	-	14	12
5	Día 0, 7	F40, día 7	Días 7-13	14	12
6	Día 0, 7	F54, día 7	Días 7-13	14	10
I-Pr: intraprostáticamente					

Los resultados se muestran en la Tabla 36 a continuación. El tratamiento con finasterida condujo a una reducción de 18,7% del tamaño de la próstata con respecto al control con vehículo. El tratamiento con la formulación de LMV-PH20 dio como resultado una reducción del 10-12% del tamaño de la próstata. El co-tratamiento con una formulación de LMV-PH20 y finasterida dio como resultado una reducción del 19-20% del tamaño de la próstata. Las actividades enzimáticas de PH20 de las LMV-PH20 utilizadas en este estudio fueron baja, 1320 y 3057 U/mL, respectivamente.

Tabla 36. Comparación del peso prostático el Día 14			
	Peso Prostático (g) Media ± DT	Valor P	% Reducción (respecto al control con vehículo)

Tabla 36. Comparación del peso prostático el Día 14

	Peso Prostático (g) Media $\pm$ DT	Valor P	% Reducción (respecto al control con vehículo)
Vehículo	1,108 $\pm$ 0,090		
Vehículo + Finasterida	0,901 $\pm$ 0,096	< 0,0001	18,7
LMV-PH20 _{F40}	0,996 $\pm$ 0,146	0,034	10,1
LMV-PH20 _{F54}	0,972 $\pm$ 0,112	0,0033	12,3
LMV-PH20 _{F40} + Finasterida	0,897 $\pm$ 0,138	0,0002	19,0
LMV-PH20 _{F54} + Finasterida	0,882 $\pm$ 0,083	<0,0001	20,4

La invención también se puede entender mediante la referencia a los siguientes apartados:

1. Liposoma multivesicular, que comprende:

- un lípido neutro;
- un lípido anfipático; y
- una enzima de degradación de hialuronano.

2. El liposoma multivesicular del apartado 1, que comprende adicionalmente ácido hialurónico.

3. El liposoma multivesicular del apartado 2, en donde el ácido hialurónico está en una cantidad suficiente para aumentar la encapsulación y la actividad enzimática de la enzima de degradación de hialuronano.

4. El liposoma multivesicular del apartado 2 o el apartado 3, en donde el ácido hialurónico mantiene la actividad total de la enzima de al menos 40.000 U/mg.

5. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-4, en donde la actividad total de la enzima es de al menos 40.000 U/mg.

6. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-5, en donde la actividad total de la enzima es de al menos 50.000 U/mg, 60.000 U/mg, 70.000 U/mg, 80.000 U/mg, 90.000 U/mg, 100.000 U/mg, 110.000 U/mg, 120.000 U/mg, 130.000 U/mg, 140.000 U/mg o 150.000 U/mg.

7. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-6, en donde la enzima de degradación de hialuronano es una hialuronidasa, una condroitinasa o una liasa.

8. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-7, en donde la enzima de degradación de hialuronano es una hialuronidasa seleccionada entre una hialuronidasa de tipo mamífero o una hialuronidasa bacteriana.

9. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-8, en donde la hialuronidasa es una hialuronidasa PH20.

10. El liposoma multivesicular del apartado 9, en donde la hialuronidasa PH20 se selecciona de entre PH20 ovina, de ratón, mono, bovina, bacteriana y humana.

11. El liposoma multivesicular del apartado 10, en donde la PH20 es soluble o es una forma que se secreta cuando se expresa en una célula de mamífero.

12. El liposoma multivesicular del apartado 11, en donde la célula de mamífero es una célula CHO.

13. El liposoma multivesicular de cualquiera del apartado 11 o el apartado 12, en donde la PH20 soluble es una PH20 que carece de un sitio de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) C-terminal o una porción del sitio de anclaje de GPI.

14. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 11-13, en donde la PH20 soluble tiene una secuencia de aminoácidos que es una forma truncada del polipéptido expuesto en el SEQ ID NO: 2, por lo que la PH20 soluble carece de toda o una porción del sitio de anclaje de GPI C-terminal, o tiene una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con su forma truncada.

15. El liposoma multivesicular del apartado 14, en donde la PH20 soluble se selecciona entre polipéptidos que contienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de los SEQ ID NO: 4-9 y 46-48, y variantes alélicas, variantes de especie y otras variantes de las mismas.

16. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-15, en donde la enzima de degradación de hialuronano se denomina rHuPH20.

17. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-16, en donde la enzima de degradación de hialuronano está glicosilada.

18. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-17, en donde la enzima de degradación de hialuronano se modifica por conjugación a un polímero.

19. El liposoma multivesicular del apartado 18, en donde el polímero es PEG o dextrano.
20. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-19, en donde la enzima de degradación de hialuronano está conectada, directa o indirectamente, a un marcador o radical detectable.
21. El liposoma multivesicular del apartado 20, en donde el marcador o radical detectable es una proteína fluorescente.
22. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-21, en donde la concentración de la enzima de degradación de hialuronano está entre o entre aproximadamente 0,1 mg/mL y 1 mg/mL, 0,2 mg/mL y 0,5 mg/mL, o es al menos o aproximadamente 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,8 mg/mL o 0,9 mg/mL.
23. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-22, en donde la concentración de ácido hialurónico es de 0,05 mg/mL a 50 mg/mL, 0,75 mg/mL a 13,0 mg/mL, o de 1 mg/mL a 10 mg/mL o es de al menos de aproximadamente 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL o 1 mg/mL.
24. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-23, en donde la relación de ácido hialurónico a enzima de degradación de hialuronano es 1:500, 1:400, 1:300, 1:200, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 200:1, 300:1, 400:1, 500:1.
25. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-24, en donde el lípido neutro es un diglicérido o un triglicérido.
26. El liposoma multivesicular del apartado 25, en donde el lípido neutro es un triglicérido que es trioleína o tricaprilina, o una mezcla de trioleína y tricaprilina.
27. El liposoma multivesicular del apartado 26, en donde la trioleína y la tricaprilina están a una razón molar de 50:50 (1:1).
28. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-27, en donde el lípido anfipático es un fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), fosfatidilserina (PS), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomielina o diaciltrimetilamoniopropano (DITAP).
29. El liposoma multivesicular del apartado 28, en donde el lípido anfipático es una fosfatidilcolina que es DEPC o DOPC, o una mezcla de DEPC y DOPC.
30. El liposoma multivesicular del apartado 29, en donde DEPC y DOPC están a una razón molar que es al menos o aproximadamente al menos una razón molar 50:50 (1 DEPC:1 DOPC), 75/25 o 90/10.
31. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-30, que comprende adicionalmente DPPG.
32. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-31, que comprende adicionalmente colesterol.
33. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-32, que comprende un agente terapéutico.
34. El liposoma multivesicular del apartado 33, en donde el fármaco terapéutico es hidrófilo o es hidrófobo.
35. El liposoma multivesicular del apartado 33 o el apartado 34, en donde el fármaco terapéutico se selecciona entre otro agente para tratar la hiperplasia benigna de próstata.
36. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 33-35, en donde el otro agente terapéutico se selecciona de entre antiandrógenos, bloqueadores alfa, toxinas botulínicas y una enzima hidrolítica.
37. El liposoma multivesicular del apartado 36, en donde el antiandrógeno es un antiandrógeno esteroideo, un antiandrógeno no esteroideo o un inhibidor de la 5 α -reductasa.
38. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 33-37, en donde el agente es finasterida o dutasterida.
39. Un liposoma multivesicular, preparado mediante un procedimiento o que puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende las etapas de:
 - a) formar un primer componente acuoso que comprende una enzima de degradación de hialuronano en una concentración inferior a 2 mg/mL;
 - b) formar un componente lipídico que comprende al menos un disolvente orgánico, al menos un lípido anfipático y al menos un lípido neutro;
 - c) formar una emulsión a partir del primer componente acuoso y el componente lipídico;
 - d) dispersar la emulsión a un segundo componente acuoso para formar esférulas de disolvente; y
 - e) separar el disolvente orgánico de las esférulas de disolvente para formar liposomas multivesiculares suspendidos en el segundo componente acuoso.
40. El liposoma multivesicular del apartado 39, en donde la enzima de degradación de hialuronano está en una concentración de entre o de aproximadamente entre 0,1 mg/mL y 1,9 mg/mL, 0,5 mg/mL y 1,5 mg/mL o es de aproximadamente 1 mg/mL.
41. El liposoma multivesicular del apartado 39 o el apartado 40, en donde la enzima de degradación de hialuronano es una hialuronidasa, una condroitinasa o una liasa.
42. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-41, en donde la enzima de degradación de hialuronano es una hialuronidasa seleccionada entre una hialuronidasa de tipo mamífero o una hialuronidasa bacteriana.
43. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-42, en donde la hialuronidasa es una hialuronidasa PH20.
44. El liposoma multivesicular del apartado 43, en donde la hialuronidasa PH20 se selecciona de entre PH20

ovina, de ratón, mono, bovina, bacteriana y humana.

45. El liposoma multivesicular del apartado 44, en donde la PH20 es soluble o es una forma que se secreta cuando se expresa en una célula de mamífero.

46. El liposoma multivesicular del apartado 45, en donde la célula de mamífero es una célula CHO.

47. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 45 o 46, en donde la PH20 soluble es una PH20 que carece de un sitio de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) C-terminal o una porción del sitio de anclaje de GPI.

48. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 45-47, en donde la PH20 soluble tiene una secuencia de aminoácidos que es una forma truncada del polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 2, por lo que la PH20 soluble carece de todo o de una porción del sitio de anclaje de GPI C-terminal, o tiene una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con su forma truncada.

49. El liposoma multivesicular del apartado 48, en donde la PH20 soluble se selecciona de entre polipéptidos que contienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de los SEQ ID NO: 4-9 y 46-48, y variantes alélicas, variantes de especies y otras variantes de las mismas.

50. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-49, en donde la enzima de degradación de hialuronano se denomina rHuPH20.

51. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-50, en donde la enzima de degradación de hialuronano está glicosilada.

52. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-51, en donde la enzima de degradación de hialuronano se modifica por conjugación a un polímero.

53. El liposoma multivesicular del apartado 52, en donde el polímero es PEG o dextrano.

54. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-53, en donde la enzima de degradación de hialuronano está conectada, directa o indirectamente, a un marcador o radical detectable.

55. El liposoma multivesicular del apartado 54, en donde el marcador o radical detectable es una proteína fluorescente.

56. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-55, en donde el primer componente acuoso comprende un agente terapéutico adicional.

57. El liposoma multivesicular del apartado 56, en donde el agente terapéutico es hidrófilo.

58. El liposoma multivesicular del apartado 57, en donde el agente terapéutico es adecuado para el tratamiento o para tratar la hiperplasia benigna de próstata.

59. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-58, en donde el primer componente acuoso comprende adicionalmente un excipiente seleccionado entre sacarosa, cloruro de calcio (CaCl_2), Glicerol, dextrano, PEG (p.ej. PEG-6000), ácido hialurónico (HA), prolina, Arg-HCl, Sorbitol, trehalosa, albúmina de suero humano (HSA), o una combinación de los mismos.

60. El liposoma multivesicular del apartado 59, en donde:

el primer componente acuoso comprende CaCl_2 entre o aproximadamente entre CaCl_2 1 mM y 50 mM, CaCl_2 5 mM y 25 mM, CaCl_2 10 mM y 20 mM, o al menos o aproximadamente 10 mM, 15 mM o 20 mM;

el primer componente acuoso comprende dextrano entre aproximadamente 0,01% y 1% o 0,05% y 0,5% o al menos o aproximadamente 0,1%;

el primer componente acuoso comprende PEG entre aproximadamente 0,01% y 1% o 0,05% y 0,5% o al menos o aproximadamente 0,1%;

el primer componente acuoso comprende prolina entre o aproximadamente entre prolina 1 mM y 1 M, 10 mM y 500 mM o al menos o aproximadamente o 100 mM;

el primer componente acuoso comprende arginina entre aproximadamente 1 mM y 1 M, 10 mM y 500 mM o al menos o aproximadamente o 100 mM;

el primer componente acuoso comprende sorbitol entre, o entre aproximadamente sorbitol de 1% a 20%, 5% a 15% o al menos o aproximadamente, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%; y/o

el primer componente acuoso comprende trehalosa entre aproximadamente trehalosa de 1% a 20%, 5% a 15% o al menos o aproximadamente 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%.

61. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-60, en donde el primer componente acuoso comprende ácido hialurónico (HA) entre aproximadamente 1 mg/mL y 100 mg/mL, 10 mg/mL y 75 mg/mL, o 15 mg/mL y 50 mg/mL, o al menos o aproximadamente o 1 mg/mL de HA, 2 mg/mL de HA, 3 mg/mL de HA, 4 mg/mL de HA, 5 mg/mL de HA, 6 mg/mL de HA, 7 mg/mL de HA, 8 mg/mL de HA, 8 mg/mL de HA, 10 mg/mL de HA, 10 mg/mL de HA, 11 mg/mL de HA, 12 mg/mL de HA, 13 mg/mL de HA, 14 mg/mL de HA, 15 mg/mL de HA, 16 mg/mL de HA, 17 mg/mL de HA, 18 mg/mL de HA, 19 mg/mL de HA, 20 mg/mL de HA, 25 mg/mL de HA, 30 mg/mL de HA, 40 mg/mL HA, 50 mg/mL de HA.

62. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-61, en donde el primer componente acuoso comprende una razón de ácido hialurónico a enzima de degradación de hialuronano que es o es aproximadamente 1:500, 1:400, 1:300, 1:200, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 200:1, 300:1, 400:1, 500:1.

63. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-62, en donde el primer componente acuoso tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6,0 a 7,5, 6,0 a 7,0 o 6,0 a 6,5.
64. El liposoma multivesicular del apartado 63, en donde el primer componente acuoso tiene un pH de aproximadamente 6,5 o al menos 6,5.
- 5 65. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-64, en donde el lípido neutro es un diglicérido o un triglicérido.
66. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-65, en donde el lípido neutro es un triglicérido que es trioleína o tricaprilina o es una mezcla de trioleína y tricaprilina.
- 10 67. El liposoma multivesicular del apartado 66, en donde la trioleína y la tricaprilina se proporcionan a una razón molar de 50:50 (1:1).
68. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-67, en donde el lípido anfipático es un fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), fosfatidilserina (PS), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomielina o diaciltrimetilamoniopropano (DITAP).
- 15 69. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-68, en donde el lípido anfipático es una fosfatidilcolina que es DEPC o DOPC, o una mezcla de DEPC y DOPC.
70. El liposoma multivesicular del apartado 69, en donde DEPC y DOPC se proporcionan a una razón molar de 50:50 (1:1).
71. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-70, en donde el componente lipídico comprende adicionalmente un fármaco hidrófobo.
- 20 72. El liposoma multivesicular del apartado 71, en donde el fármaco hidrófobo se selecciona entre docetaxel, prednisona, prednisolona, ibuprofeno, clotriamazol, risperidona, citrato de tamoxifeno, diazepam, insulina NPH, una benzodiazepina, clofibrato, clorfeniramina, dinitrato, digoxina, digitoxina, tartrato de ergotamina, estradiol, fenofibrato, griscofulvina, hidroclorotiazida, hidrocortisona, isosorbida, medrogestona, oxifenbutazona, politiazida, progestinona, espironolactona, tolbutamida, 10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5-carboxamida, 5H-dibenzo[a,d] ciclohepteno-5-carboxamida, y un inhibidor de la 5 α -reductasa.
- 25 73. El liposoma multivesicular del apartado 71 o el apartado 72, en donde el fármaco hidrófobo es un inhibidor de la 5 α -reductasa que es finasterida o dutasterida.
74. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 71-73, en donde el fármaco hidrófobo está a una concentración que está entre o aproximadamente entre 0,1 mg/mL y 5 mg/mL.
- 30 75. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-74, en donde el componente lipídico comprende:
- un lípido anfipático o una mezcla de lípidos anfipáticos en una cantidad entre o entre aproximadamente 20 mM y 100 mM o entre 30 mM y 60 mM; y
- 35 un lípido neutro o una mezcla de lípidos neutros en una cantidad entre o entre aproximadamente 4 mM y 20 mM o entre 5 mM y 12 mM.
76. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-75, en donde el componente lipídico comprende adicionalmente DPPG.
- 40 77. El liposoma multivesicular del apartado 76, en donde la DPPG está en una cantidad entre o cantidad entre 4 mM y 20 mM o 5 mM y 12 mM.
78. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39 a 77, en donde el componente lipídico comprende adicionalmente colesterol.
- 45 79. El liposoma multivesicular del apartado 78, en donde el colesterol está en una cantidad que está entre o aproximadamente entre 15 mM y 100 mM, 20 mM y 80 mM o 30 mM y 60 mM.
80. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-79, en donde el componente lipídico comprende una mezcla 50:50 (1:1) de una primera mezcla de lípidos que comprende aproximadamente DEPC 19,8 mM, colesterol 30 mM, trioleína 3,75 mM y una segunda mezcla de lípidos que comprende aproximadamente DOPC 19,8 mM, colesterol 30 mM y tricaprilina 3,75 mM.
- 50 81. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-80, en donde el disolvente orgánico es cloroformo.
82. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 39-81, que comprende adicionalmente la eliminación del segundo componente acuoso y la suspensión de los liposomas multivesiculares en un tercer componente acuoso.
- 55 83. El liposoma multivesicular del apartado 82, en donde el tercer componente acuoso comprende NaCl.
84. El liposoma multivesicular del apartado 83, en donde el NaCl está entre o entre aproximadamente 100 mM y 150 mM o es al menos o aproximadamente 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM o 150 mM.
85. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 82-84, en donde el tercer tampón acuoso comprende histidina.
- 60 86. El liposoma multivesicular del apartado 85, en donde la histidina está entre o aproximadamente entre 1 mM a 100 mM, 5 mM a 15 mM o es al menos o aproximadamente 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM.
87. El liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 82-86, en donde el pH del tercer tampón acuoso está comprendido entre 6,0 y 8,0 ó 6,5 y 7,5 o es de al menos aproximadamente 6,0, 6,5, 7,0 ó 7,4.

88. Una composición, que comprende un liposoma multivesicular de cualquiera de los apartados 1-87.
89. La composición del apartado 88, que comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.
90. La composición del apartado 88 o 89, que comprende NaCl.
- 5 91. La composición del apartado 90, en la que el NaCl está entre o entre aproximadamente 100 mM y 150 mM o es al menos o aproximadamente o 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM o 150 mM.
92. La composición de cualquiera de los apartados 88-91, que comprende histidina.
93. La composición del apartado 92, en donde la histidina está entre o aproximadamente entre 1 mM y 100 mM, 5 mM y 15 mM o es al menos o aproximadamente 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 10 40 mM o 50 mM.
94. La composición de cualquiera de los apartados 88-93, en donde el pH de la composición está o está entre aproximadamente 6,0 y 8,0 o 6,5 y 7,5 o es al menos aproximadamente 6,0, 6,5, 7,0 ó 7,4.
95. La composición de cualquiera de los apartados 88-94, que comprende un agente terapéutico.
96. La composición del apartado 95, en donde el agente terapéutico se formula separadamente del liposoma multivesicular.
- 15 97. La composición del apartado 95 o del apartado 96, en donde el agente terapéutico es un agente adecuado para tratar la hiperplasia benigna de próstata.
98. La composición de cualquiera de los apartados 95-97, en donde el agente terapéutico se selecciona entre antiandrógenos, bloqueadores alfa, toxinas botulínicas, y una enzima hidrolítica.
- 20 99. La composición del apartado 98, en donde el antiandrógeno es un antiandrógeno esteroideo, un antiandrógeno no esteroideo o un inhibidor de la 5 α -reductasa.
100. La composición del apartado 97, en donde el agente terapéutico es un inhibidor de la 5 α -reductasa que es finasterida o dutasterida.
101. 9. Una combinación, que comprende:
- 25 una primera composición que comprende una composición de cualquiera de los apartados 88 a 94; y una segunda composición que comprende un agente terapéutico.
102. La combinación del apartado 101, en donde el agente terapéutico es un agente adecuado para tratar la hiperplasia benigna de próstata.
- 30 103. La combinación del apartado 101 o el apartado 102, en donde el agente terapéutico se selecciona entre antiandrógenos, bloqueadores alfa, toxinas botulínicas y una enzima hidrolítica.
104. La combinación del apartado 103, en donde el antiandrógeno es un antiandrógeno esteroideo, un antiandrógeno no esteroideo o un inhibidor de la 5 α -reductasa.
- 35 105. La combinación del apartado 104, en donde el agente terapéutico es un inhibidor de la 5 α -reductasa que es finasterida o dutasterida.
106. 9. Una composición, que comprende:
- 40 una enzima de degradación de hialuronano; y ácido hialurónico, con lo que la enzima de degradación de hialuronano conserva al menos 50% de la actividad hialuronidasa durante al menos seis meses entre 28°C y 32°C o al menos un año entre 2°C y 8°C.
107. La composición del apartado 106, en donde se conserva al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o más actividad de hialuronidasa.
- 45 108. La composición del apartado 106 o el apartado 107 que es una composición farmacéutica.
109. La composición de cualquiera de los apartados 106-108 que se formula para administración directa.
110. La composición de cualquiera de los apartados 106-109, en donde la enzima de degradación de hialuronano es estable durante al menos un año o al menos dos años.
- 50 111. La composición de cualquiera de los apartados 106-110, en donde la enzima de degradación de hialuronano es una hialuronidasa, una condroitinasa o una liasa.
112. La composición de cualquiera de los apartados 106-111, en donde la enzima de degradación de hialuronano es una hialuronidasa seleccionada entre una hialuronidasa de tipo mamífero o una hialuronidasa bacteriana.
113. La composición de cualquiera de los apartados 106-112, en donde la hialuronidasa es una hialuronidasa PH20.
- 55 114. La composición del apartado 113, en donde la hialuronidasa PH20 se selecciona de entre PH20 ovina, de ratón, mono, bovina, bacteriana y humana.
115. La composición del apartado 114, en donde la PH20 es soluble o es una forma que se secreta cuando se expresa en una célula de mamífero.
- 60 116. La composición del apartado 115, en donde la célula de mamífero es una célula CHO.
117. La composición del apartado 115 o 116, en donde la PH20 soluble es una PH20 que está truncada, por lo que la PH20 carece de un sitio de unión de glicosilfosfatidilinositol (GPI) C-terminal o una porción del sitio de unión de GPI.
118. La composición de cualquiera de los apartados 115-117, en donde la PH20 tiene una secuencia de

aminoácidos que es una forma truncada del polipéptido expuesto en el SEQ ID NO: 2, en donde la PH20 soluble carece de todo o una porción del sitio de anclaje de GPI C-terminal, o tiene una secuencia de aminoácidos que presenta al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia con su forma truncada.

119. La composición del apartado 118, en donde la PH20 se selecciona entre polipéptidos que contienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de los SEQ ID NO: 4-9 y 46-48, y variantes alélicas, variantes de especie y otras variantes de las mismas que muestran actividad catalítica.

120. La composición de cualquiera de los apartados 106-119, en donde la composición comprende una enzima de degradación de hialuronano que se denomina rHuPH20.

121. La composición de cualquiera de los apartados 106-120, en donde la enzima de degradación de hialuronano está glicosilada.

122. La composición de cualquiera de los apartados 106-121, en donde la enzima de degradación de hialuronano se modifica por conjugación a un polímero.

123. La composición del apartado 122, en donde el polímero es PEG o dextrano.

124. La composición de cualquiera de los apartados 106-123, en donde la enzima de degradación de hialuronano y el ácido hialurónico en la composición están a una razón molar de aproximadamente 5000:1, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1900:1, 1800:1, 1700:1, 1650:1, 1600:1, 1500:1, 1400:1, 1300:1, 1200:1, 1100:1, 1000:1, 900:1, 800:1, 700:1, 600:1, 500:1, 100:1, 90:1, 80:1, 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:500, 1:600, 1:700, 1:800, 1:900, 1:1000, 1:1100, 1:1200, 1:1300, 1:1400, 1:1500, 1:1600, 1:1700, 1:1800, 1:1900, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000.

125. La composición de cualquiera de los apartados 106-124, en donde la concentración de enzima de degradación de hialuronano está entre aproximadamente 1 U/mL y 10000 U/mL, 10 U/mL y 5000 U/mL, 100 U/mL y 1000 U/mL o es al menos o aproximadamente o 10 U/mL, 50 U/mL, 100 U/mL, 200 U/mL, 300 U/mL, 400 U/mL, 500 U/mL, 600 U/mL, 700 U/mL, 800 U/mL, 900 U/mL, 1000 U/mL o más.

126. La composición de cualquiera de los apartados 106-125, en donde la concentración de ácido hialurónico es de aproximadamente 1 mg/mL a 100 mg/mL, 10 mg/mL a 50 mg/mL, 1 mg/mL a 20 mg/mL o es al menos o aproximadamente o 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL, 10 mg/mL, 11 mg/mL, 12 mg/mL, 13 mg/mL, 14 mg/mL, 15 mg/mL, 16 mg/mL, 17 mg/mL, 18 mg/mL, 19 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, o 50 mg/mL.

127. La composición de cualquiera de los apartados 106-126, en donde la composición se formula para uso único o múltiple.

128. La composición de cualquiera de los apartados 106-127, en donde la composición se formula en un volumen por administración de entre aproximadamente 0,5 mL a 50 mL, 1 mL a 10 mL, 1 mL a 5 mL o al menos o aproximadamente o 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL ó 50 mL.

129. La composición de cualquiera de los apartados 106-128, que comprende adicionalmente NaCl.

130. La composición del apartado 129, en donde el NaCl está entre o entre aproximadamente 100 mM y 150 mM o es al menos o aproximadamente 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM o 150 mM.

131. La composición de cualquiera de los apartados 106-130, que comprende adicionalmente histidina.

132. La composición del apartado 131, en donde la histidina está entre o aproximadamente entre 1 mM y 100 mM, 5 mM y 15 mM o es al menos o aproximadamente 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM.

133. La composición de cualquiera de los apartados 106-132, en donde el pH de la composición es o está entre aproximadamente 6,0 y 8,0 o 6,5 y 7,5 o es al menos o aproximadamente o 6,0, 6,5, 7,0 ó 7,4.

134. La composición de cualquiera de los apartados 106-133 que comprende liposomas, micelas u otras vesículas lipídicas que contienen la enzima de degradación de la hialuronidasa.

135. La composición del apartado 134, en donde el liposoma es unilamelar, multilamelar o multivesicular.

136. Un recipiente, que comprende una composición de cualquiera de los apartados 88-100 y 106-135.

137. El recipiente del apartado 136 que es una jeringa.

138. El recipiente del apartado 136 o 137, que comprende adicionalmente una aguja para inyección.

139. El recipiente de cualquiera de los apartados 136-138, en donde la composición en el recipiente es de uso único.

140. El recipiente de cualquiera de los apartados 136-139, que comprende adicionalmente una composición que comprende un agente terapéutico.

141. El recipiente del apartado 140, en donde el agente terapéutico es un agente adecuado para tratar la hiperplasia benigna de próstata.

142. El recipiente del apartado 140 o del apartado 141, en donde el agente terapéutico se selecciona entre antiandrógenos, bloqueadores alfa, toxinas botulínicas y una enzima hidrolítica.

143. El recipiente del apartado 142, en donde el antiandrógeno es un antiandrógeno esteroideo, un antiandrógeno no esteroideo o un inhibidor de la 5 α -reductasa.

144. El recipiente del apartado 143, en donde el agente terapéutico es un inhibidor de la 5 α -reductasa que es finasterida o dutasterida.

145. Un kit, que comprende el recipiente de cualquiera de los apartados 136-144, y que comprende adicionalmente instrucciones de uso.

146. Un método para tratar una enfermedad o afección asociada a hialuronano, que comprende administrar a un sujeto una composición o combinación de cualquiera de los apartados 88-135.

147. El método del apartado 146, en donde la enfermedad o afección asociada a hialuronano es la hiperplasia benigna de próstata.

148. Un método de tratamiento de hiperplasia benigna de próstata, que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende un liposoma, micelas u otras vesículas lipídicas que contienen una enzima de degradación de hialuronano.

149. El método del apartado 148, en donde el liposoma o vesícula lipídica es una vesícula de membrana sintética de gran diámetro.

150. El método de cualquiera de los apartados 146-149, en donde la composición se administra al sujeto intraprostáticamente.

151. El método del apartado 150, en donde la composición se administra mediante inyección transrectal, transuretral o transperineal.

152. El método del apartado 150 o del apartado 151, en donde la composición se administra a cada lóbulo de la próstata.

153. El método de cualquiera de los apartados 146-152, en donde la composición comprende un liposoma multivesicular que efectúa la liberación sostenida de una enzima de degradación de hialuronano localmente al estroma de la próstata.

154. El método de cualquiera de los apartados 146-153, en donde la composición se administra a o aproximadamente entre 0,5 mL y 50 mL, 1 mL y 10 mL, 1 mL y 2 mL o al menos o aproximadamente o 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL o 10 mL.

155. El método de cualquiera de los apartados 146-154, en donde la frecuencia de administración es mensual, trimestral, semestral o anual.

156. El método del apartado 155, en donde la composición se administra cada 3 a 6 meses.

157. El método de cualquiera de los apartados 146-156, que comprende adicionalmente administrar otro agente para tratar la hiperplasia benigna de próstata.

158. El método del apartado 157, en donde el otro agente se selecciona entre un antiandrógeno, alfa-bloqueante, una toxina botulínica y una enzima hidrolítica.

159. El método del apartado 158, en donde el antiandrógeno es un antiandrógeno esteroideo, un antiandrógeno no esteroideo o un inhibidor de la 5 α -reductasa.

160. El método de cualquiera de los apartados 157-159, en donde el agente es finasterida o dutasterida.

161. Una composición o combinación de cualquiera de los apartados 88-135 para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada a hialuronano.

162. La composición del apartado 161, en donde la enfermedad o afección asociada a hialuronano es la hiperplasia benigna de próstata.

163. La composición del apartado 161 o el apartado 162, en donde la composición se formula para inyección intraprostática o instilación.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Halozyme, Inc.

<120> COMPOSICIÓN Y FORMULACIÓN LIPÍDICA DE UNA ENZIMA DE DEGRADACIÓN DE HIALURONANO Y USO DE LA MISMA PARA EL TRATAMIENTO DE LA HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA

<130> SCB/JCP1/P122122EP01

<150> 61/462875

<151> 08-02-2011

<160> 189

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 509

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de PH20 humana

<400> 1

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

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 madura

<400> 2

```

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

```

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

5

<220>
 <223> Precursor de rHuPH20 soluble

<400> 3

10

```

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

```

<210> 4
 <211> 447

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-447

<400> 4

5

10

```

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

```

<210> 5

<211> 446

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-446

5

<400> 5

```

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

```

10

<210> 6

<211> 445

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-445

5

<400> 6

```

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

```

<210> 7

<211> 444

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10

ES 2 634 669 T3

<223> rHuPH20 soluble 1-444

<400> 7

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

5

<210> 8

<211> 443

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-443

<400> 8

```

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

Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
 420      425      430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
 435      440

```

5

<210> 9

<211> 442

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-442

15

<400> 9

```

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

```

- 5 <210> 10
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
- 10 <220>
 <223> hialuronidasa
- <400> 10

```

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

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

ES 2 634 669 T3

```

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

```

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

<220>
 <223> hialuronidasa A

<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
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
 <212> PRT
 <213> Vesputa vulgaris

<220>
 <223> hialuronidasa B

<400> 13

```

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

```


ES 2 634 669 T3

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

<220>
 <223> hialuronidasa

<400> 14

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

ES 2 634 669 T3

Arg Arg Asp Thr Asp Leu Ser Arg Ala Asp Leu Glu Ala Thr Leu Arg
 305 310 315 320
 Lys Ile Thr Asp Leu Gly Ala Asp Gly Phe Ile Ile Trp Gly Ser Ser
 325 330 335
 Asp Asp Ile Asn Thr Lys Ala Lys Cys Leu Gln Phe Arg Glu Tyr Leu
 340 345 350
 Asn Asn Glu Leu Gly Pro Ala Val Lys Arg Ile Ala Leu Asn Asn Asn
 355 360 365
 Ala Asn Asp Arg Leu Thr Val Asp Val Ser Val Asp Gln Val
 370 375 380

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

<220>
 <223> hialuronidasa

<400> 15

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

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

<220>
<223> hialuronidasa

5 <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

```

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

10

<220>
<223> hialuronidasa

15

<400> 17

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

<210> 18

<211> 473

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Hialuronidasa 2

10

<400> 18

```

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

```

5 <210> 19
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <223> hialuronidasa 3

<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

```

<210> 20

<211> 435

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 20

ES 2 634 669 T3

```

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

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

```

- 5 <210> 21
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa
- 10 <220>
 <223> hialuronidasa 3
- <400> 21

```

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

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

```

5 <210> 22
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

10 <220>
 <223> hialuronidasa 1
 <400> 22


```

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

```

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

<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

<210> 25

<211> 545

<212> PRT

10 <213> Oryctolagus cuniculus

<220>

<223> PH20

15 <400> 25

ES 2 634 669 T3

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

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

<220>
<223> hialuronidasa 2

<400> 26

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
						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
 <212> PRT
 <213> Ovis aries

<220>
 <223> secuencia parcial de PH20

<400> 27

ES 2 634 669 T3

```

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

```

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

<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 Ala
          130          135          140
Tyr Gln Ala Ala Ser Trp Ala Trp Ala Gln Gln Val Phe Pro Asp Leu
145          150          155          160
Asp Pro Gln Glu Gln Leu Tyr Lys Ala Tyr Thr Gly Phe Glu Gln Ala
          165          170          175
Ala Arg Ala Leu Met Glu Asp Thr Leu Arg Val Ala Gln Ala Leu Arg
          180          185          190
Pro His Gly Leu Trp Gly Phe Tyr His Tyr Pro Ala Cys Gly Asn Gly
          195          200          205
Trp His Ser Met Ala Ser Asn Tyr Thr Gly Arg Cys His Ala Ala Thr
          210          215          220
Leu Ala Arg Asn Thr Gln Leu His Trp Leu Trp Ala Ala Ser Ser Ala
225          230          235          240
Leu Phe Pro Ser Ile Tyr Leu Pro Pro Arg Leu Pro Pro Ala His His
          245          250          255
Gln Ala Phe Val Arg His Arg Leu Glu Glu Ala Phe Arg Val Ala Leu
          260          265          270

```

```

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

```

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

<220>
 <223> PH20

<400> 29

```

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

```


ES 2 634 669 T3

```

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

```

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

<220>
 <223> PH20

<400> 30

```

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

```

Gln Tyr Asn His Ser Tyr Ala Val Ala Val Ala Lys Arg Asp Phe Glu
180 185 190
Arg Thr Gly Lys Ala Phe Met Leu Glu Thr Leu Lys Leu Gly Lys Ser
195 200 205
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
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<220>
<223> PH20

<400> 31

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

ES 2 634 669 T3

Phe	Val	Trp	Val	Trp	Asn	Val	Pro	Thr	Glu	Ala	Cys	Val	Glu	Asn	Val	50	55	60
Thr	Glu	Pro	Ile	Asp	Leu	Ser	Phe	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly	Ser	Pro	Arg	65	70	75
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
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
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
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
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
Lys	Gly	Leu	Leu	Leu	Met	Thr	Thr	Leu	Ala	His	Ile	Leu	His	His	Leu	485	490	495
Pro	His	Asp	Ile	Phe	Val	Phe	Pro	Trp	Lys	Met	Leu	Val	Ser	Thr	Pro	500	505	510

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

<220>
 <223> PH20

<400> 32

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

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<223> hialuronidasa

5

<400> 33

```

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

```

ES 2 634 669 T3

Ser	His	Ser	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Met	Lys	Ser	Leu	Leu	Arg	Leu	Ser
Asp	370	Met	Asp	Asp		375	Lys	Ala	Lys	Tyr	380	Lys	Lys	Ile	Val
385	Ala	Met	Asp	Asp	390	Thr	Lys	Ala	Lys	395	Lys	Lys	Lys	Ile	Val
Ser	Ser	Val	Glu	Ser	Asp	Ser	Ser	Tyr	Lys	Gln	Asn	Asp	Tyr	Leu	Asn
				405					410					415	
Ser	Tyr	Ser	Asp	Ile	Asp	Lys	Met	Lys	Ser	Leu	Met	Thr	Asp	Asn	Ser
			420					425					430		
Ile	Ser	Lys	Asn	Gly	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Lys	Ile	Tyr	Asn	Asp	Met
		435					440					445			
Asp	Arg	Val	Thr	Tyr	His	Asn	Lys	Asp	Leu	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu
	450					455					460				
Ser	Met	Thr	Ser	Lys	Asn	Val	Ala	Arg	Tyr	Glu	Ser	Ile	Asn	Gly	Glu
465					470					475					480
Asn	Leu	Lys	Gly	Trp	His	Thr	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Asn
				485					490					495	
Ser	Asp	Val	Lys	His	Tyr	His	Asp	Asn	Phe	Trp	Val	Thr	Ala	Asp	Met
			500					505					510		
Lys	Arg	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Leu	Asp	Asn	Glu	Ile	Leu	Lys	Asp
		515					520					525			
Thr	Asp	Asp	Lys	Lys	Ser	Ser	Lys	Thr	Phe	Val	Gly	Gly	Thr	Lys	Val
	530					535					540				
Asp	Asp	Gln	His	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Asp	Phe	Glu	Asn	Gln	Asp	Lys
545					550					555					560
Thr	Leu	Thr	Ala	Lys	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ile	Leu	Asn	Asp	Lys	Ile	Val
				565					570					575	
Phe	Leu	Gly	Thr	Gly	Ile	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Pro	Val
			580					585					590		
Thr	Thr	Ile	Glu	Asn	Arg	Lys	Ala	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Thr	Asp
		595					600					605			
Asp	Lys	Gln	Thr	Thr	Asn	Ser	Asp	Asn	Gln	Glu	Asn	Asn	Ser	Val	Phe
	610					615					620				
Leu	Glu	Ser	Thr	Asp	Thr	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	His	Phe	Leu	Asn
625					630					635					640
Lys	Pro	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Ser	His	Thr	Gly	Lys	Trp	Lys
				645					650					655	
Glu	Ile	Asn	Lys	Ser	Gln	Lys	Asp	Thr	Gln	Lys	Thr	Asp	Glu	Tyr	Tyr
			660					665					670		
Glu	Val	Thr	Gln	Lys	His	Ser	Asn	Ser	Asp	Asn	Lys	Tyr	Gly	Tyr	Val
		675					680					685			
Leu	Tyr	Pro	Gly	Leu	Ser	Lys	Asp	Val	Phe	Lys	Thr	Lys	Lys	Asp	Glu
	690					695					700				
Val	Thr	Val	Val	Lys	Gln	Glu	Asp	Asp	Phe	His	Val	Val	Lys	Asp	Asn
705					710					715					720

<210> 34
<211> 371
<212> PRT
<213> bacteriófago H4489A de *Streptococcus pyogenes*

<220>
<223> hialuronidasa

<400> 34

```

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

```

<210> 35
 <211> 1628
 <212> PRT
 <213> Clostridium perfringens

<220>
 <223> hialuronidasa

<400> 35

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

Leu	Arg	Glu	Ile	Ser	Lys	His	Met	Ile	Asn	Gln	Asn	Met	Asp	Gly	Arg	
		500						505					510			
Val	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu	Ser	Val	Glu	Leu	Ala	Pro	Lys	Leu	Glu	Ala	
		515						520					525			
Phe	Lys	Gln	Lys	Tyr	Asp	Ser	Gly	Ala	Ser	Ile	Lys	Glu	Asp	Ala	Leu	
		530						535					540			
Glu	Leu	Ile	Ala	Glu	Phe	Thr	Asn	Leu	Gln	Lys	Ala	Ala	Asp	Tyr	Tyr	
		545						550					555			
Lys	Asn	Asn	Pro	Gly	Asn	Glu	Arg	Thr	Arg	Asp	Gln	Ile	Ile	Tyr	Trp	
Leu	Asn	Cys	Trp	Glu	Asp	Thr	Met	Asp	Ala	Ala	Ile	Gly	Tyr	Leu	Lys	
Ser	Ala	Ile	Ala	Ile	Glu	Glu	Gly	Asp	Asp	Glu	Ala	Ala	Trp	Ala	Asn	
Tyr	Ser	Glu	Ala	Gln	Gly	Ala	Phe	Glu	Lys	Ser	Lys	Thr	Tyr	Gly	Phe	
His	Tyr	Val	Asp	His	Thr	Glu	Tyr	Ala	Glu	Val	Gly	Val	Gln	His	Ile	
Val	Pro	Phe	Ile	Lys	Ser	Met	Gly	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Val	Ile	Gly	
Ser	Ile	Val	Asp	Pro	Asn	Arg	Ile	Ile	Ala	Thr	Tyr	Ile	Ser	Asn	Arg	
Gln	Asp	Ala	Pro	Thr	Gly	Asn	Pro	Asp	Asn	Ile	Phe	Asp	Asn	Asn	Ala	
Ser	Thr	Glu	Leu	Val	Tyr	Lys	Asn	Pro	Asn	Arg	Ile	Asp	Val	Gly	Thr	
Tyr	Val	Gly	Val	Lys	Tyr	Ser	Asn	Pro	Ile	Thr	Leu	Asn	Asn	Val	Glu	
Phe	Leu	Met	Gly	Ala	Asn	Ser	Asn	Pro	Asn	Asp	Thr	Met	Gln	Lys	Ala	
Lys	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Asp	Gly	Arg	Glu	Trp	Ile	Asp	Leu	Glu	Glu	
Gly	Val	Glu	Tyr	Thr	Met	Pro	Gly	Ala	Ile	Lys	Val	Glu	Asn	Leu	Asp	
Leu	Lys	Val	Arg	Gly	Val	Arg	Leu	Ile	Ala	Thr	Glu	Ala	Arg	Glu	Asn	
Thr	Trp	Leu	Gly	Val	Arg	Asp	Ile	Asn	Val	Asn	Lys	Lys	Glu	Asp	Ser	
Asn	Ser	Gly	Val	Glu	Phe	Asn	Pro	Ser	Leu	Ile	Arg	Ser	Glu	Ser	Trp	
Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Asn	Glu	Ala	Asn	Leu	Leu	Asp	Gly	Asp	Asp	Asn	
Thr	Gly	Val	Trp	Tyr	Lys	Thr	Leu	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Leu	Ala	Gly	
Glu	Phe	Ile	Gly	Leu	Asp	Leu	Gly	Lys	Glu	Ile	Lys	Leu	Asp	Gly	Ile	
Arg	Phe	Val	Ile	Gly	Lys	Asn	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Asp	Lys	Trp	Asn	
Lys	Phe	Lys	Leu	Glu	Tyr	Ser	Leu	Asp	Asn	Glu	Ser	Trp	Thr	Thr	Ile	
Lys	Glu	Tyr	Asp	Lys	Thr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gly	Lys	Asp	Val	Ile	Glu	
Glu	Ser	Phe	Glu	Thr	Pro	Ile	Ser	Ala	Lys	Tyr	Ile	Arg	Leu	Thr	Asn	
Met	Glu	Asn	Ile	Asn	Lys	Trp	Leu	Thr	Phe	Ser	Glu	Phe	Ala	Ile	Ile	
Ser	Asp	Glu	Leu	Glu	Asn	Ala	Gly	Asn	Lys	Glu	Asn	Val	Tyr	Thr	Asn	
Thr	Glu	Leu	Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Asp	Val	Thr	Lys	Leu		
Ile	Pro	Thr	Asp	Asp	Ile	Ser	Leu	Asn	His	Gly	Glu	Tyr	Ile	Gly	Val	
Lys	Leu	Asn	Arg	Ile	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Ile	Asn	Leu	Glu	Ile	Ser	

995	1000	1005
Asn Asp Thr Gly Leu Lys Leu Gln Ser Ser Met Asn Gly Val Glu Trp		
1010	1015	1020
Thr Glu Ile Thr Asp Lys Asn Thr Leu Glu Asp Gly Arg Tyr Val Arg		
1025	1030	1035
Leu Ile Asn Thr Ser Asn Glu Ala Val Asn Phe Asn Leu Thr Lys Phe		1040
	1045	1050
		1055
Glu Val Asn Ser Asn Glu Val Tyr Glu Pro Ser Leu Val Asp Ala Tyr		
	1060	1065
		1070
Val Gly Asp Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Asp Gly Asp Leu Lys Thr		
	1075	1080
		1085
Arg Val Lys Phe Leu Gly Ala Pro Ser Thr Gly Asp Thr Ile Val Tyr		
	1090	1095
		1100
Asp Leu Gly Gln Glu Ile Leu Val Asp Asn Leu Lys Tyr Val Val Leu		
1105	1110	1115
		1120
Asp Thr Glu Val Asp His Val Arg Asp Gly Lys Ile Gln Leu Ser Leu		
	1125	1130
		1135
Asp Gly Glu Thr Trp Thr Asp Ala Ile Thr Ile Gly Asp Gly Val Glu		
	1140	1145
		1150
Asn Gly Val Asp Asp Met Phe Ser Thr Pro Leu Lys Asn Gly Tyr Lys		
	1155	1160
		1165
His Gly Asn Gln Ser Gly Gly Ile Val Pro Ile Asp Ser Ala Tyr Val		
1170	1175	1180
		1185
Glu Gly Asp Asn Leu Asn Gln Lys Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Phe		
1185	1190	1195
		1200
Thr Ala Pro Tyr Arg His Arg Trp Thr Val Ile Asn Glu Leu Met Ile		
	1205	1210
		1215
Asn Asn Gly Glu Tyr Ile Ser Thr Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ile Ser		
	1220	1225
		1230
Asn Pro Ile Glu Glu Arg Gly Phe Ala Pro Ser Asn Leu Arg Asp Gly		
	1235	1240
		1245
Asn Leu Thr Thr Ser Tyr Lys Pro Asn Thr Asn Asn Gly Glu Ile Ser		
	1250	1255
		1260
Glu Gly Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Ser Glu Lys Thr Asp Val Arg Lys		
1265	1270	1275
		1280
Val Thr Ile Val Gln Ser Gly Ser Ser Ile Ser Asn Ala Lys Val Met		
	1285	1290
		1295
Ala Arg Val Gly Asp Gly Ser Glu Asn Val Thr Asp Gln Trp Val Gln		
	1300	1305
		1310
Leu Gly Thr Leu Ser Asn Ser Leu Asn Glu Phe Ile Asn Arg Asp Tyr		
	1315	1320
		1325
Asn Asn Ile Tyr Glu Ile Lys Ile Glu Trp Thr Asp Val Ala Pro Asn		
1330	1335	1340
		1345
Ile Tyr Glu Ile Ile Thr Leu Asn Gln Glu Phe Glu Phe Pro Val Asn		
1345	1350	1355
		1360
Asp Ser Leu Lys Ala Lys Tyr Asp Glu Leu Ile Asn Leu Ser Gly Asp		
	1365	1370
		1375
Glu Tyr Thr Leu Ser Ser Phe Glu Thr Leu Lys Glu Ala Leu Asn Glu		
	1380	1385
		1390
Ala Lys Ser Ile Leu Asp Asp Ser Asn Ser Ser Gln Lys Lys Ile Asp		
	1395	1400
		1405
Lys Ala Leu Glu Lys Leu Asn Lys Ala Glu Glu Arg Leu Asp Leu Arg		
	1410	1415
		1420
Ala Thr Asp Phe Glu Asp Phe Asn Lys Val Leu Thr Leu Gly Asn Ser		
1425	1430	1435
		1440
Leu Val Glu Glu Glu Tyr Thr Ala Glu Ser Trp Ala Leu Phe Ser Glu		
	1445	1450
		1455
Val Leu Glu Ala Ala Asn Glu Ala Asn Lys Asn Lys Ala Asp Tyr Thr		
	1460	1465
		1470
Gln Asp Gln Ile Asn Gln Ile Val Ile Asp Leu Asp Ala Ser Ile Lys		
	1475	1480
		1485
Ala Leu Val Lys Glu Thr Pro Glu Val Asp Lys Thr Asn Leu Gly Glu		
1490	1495	1500

ES 2 634 669 T3

```

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>

10 <223> Hialuronidasa-1 [Precursor]

<400> 36

```

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

```

```

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

```

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

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

<400> 37

```

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

```

```

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

```

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

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

<400> 38

```

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

```

ES 2 634 669 T3

```

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

```

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

<220>
 <223> Hialuronidasa-4

<400> 39

```

Met Lys Val Leu Ser Glu Gly Gln Leu Lys Leu Cys Val Val Gln Pro
    1      5      10      15
Val His Leu Thr Ser Trp Leu Leu Ile Phe Phe Ile Leu Lys Ser Ile
    20      25      30
Ser Cys Leu Lys Pro Ala Arg Leu Pro Ile Tyr Gln Arg Lys Pro Phe
    35      40      45
Ile Ala Ala Trp Asn Ala Pro Thr Asp Gln Cys Leu Ile Lys Tyr Asn
    50      55      60
Leu Arg Leu Asn Leu Lys Met Phe Pro Val Ile Gly Ser Pro Leu Ala
    65      70      75      80
Lys Ala Arg Gly Gln Asn Val Thr Ile Phe Tyr Val Asn Arg Leu Gly
    85      90      95
Tyr Tyr Pro Trp Tyr Thr Ser Gln Gly Val Pro Ile Asn Gly Gly Leu
    100     105     110
Pro Gln Asn Ile Ser Leu Gln Val His Leu Glu Lys Ala Asp Gln Asp
    115     120     125
Ile Asn Tyr Tyr Ile Pro Ala Glu Asp Phe Ser Gly Leu Ala Val Ile
    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 Ala Ser Tyr Arg Ser Ile Gln
      465      470      475      480
Leu

```

<210> 40

<211> 467

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de sHuPH20 1-467

<400> 40

```

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

```

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

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

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

<400> 41

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

			20					25					30		
Cys	Leu	Thr	Leu	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn	Val	Pro
		35					40					45			
Phe	Leu	Trp	Ala	Trp	Asn	Ala	Pro	Ser	Glu	Phe	Cys	Leu	Gly	Lys	Phe
	50					55					60				
Asp	Glu	Pro	Leu	Asp	Met	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Ile	Gly	Ser	Pro	Arg
65					70					75					80
Ile	Asn	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	Val	Thr	Ile	Phe	Tyr	Val	Asp	Arg	Leu
				85					90					95	
Gly	Tyr	Tyr	Pro	Tyr	Ile	Asp	Ser	Ile	Thr	Gly	Val	Thr	Val	Asn	Gln
			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
					375										

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

<220>
<223> Precursor de sHuPH20 1-478

<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 de sHuPH20 1-479

<400> 43

```

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

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

```

5

<210> 44

<211> 480

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> Precursor de sHuPH20 1-480

<400> 44

5

```

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

```

10

<210> 45

<211> 481

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

5 <223> Precursor de sHuPH20 1-481

<400> 45

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

10

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

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de sHuPH20 1-483

<400> 46

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

```

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

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> sHuPH20 madura 36-467

<400> 47

```

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

```

```

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

```

<210> 48

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> sHuPH20 madura 36-483

<400> 48

```

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1          5          10          15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
      20          25          30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala

```


ES 2 634 669 T3

[illegible]

<210> 49

<211> 1446

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

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

<400> 49

```

atgggagtg c taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaattc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaaag tgaattttgt 180
cttgaaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcataagg aagccccga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatctt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatcct 660
tttccggatt gttacaacca tcaactataa aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaataaa aaagaaatga tgatctcagc tgggttgagg atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctacagcca aaatgtgtag ccaagtgtct 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctggtgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctac

```

<210> 50

<211> 509

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> variante P48A de PH20

<400> 50

Met	Gly	Val	Leu	Lys	Phe	Lys	His	Ile	Phe	Phe	Arg	Ser	Phe	Val	Lys
1				5				10						15	
Ser	Ser	Gly	Val	Ser	Gln	Ile	Val	Phe	Thr	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Cys
		20						25					30		
Cys	Leu	Thr	Leu	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn	Val	Ala
		35					40						45		
Phe	Leu	Trp	Ala	Trp	Asn	Ala	Pro	Ser	Glu	Phe	Cys	Leu	Gly	Lys	Phe
		50				55					60				
Asp	Glu	Pro	Leu	Asp	Met	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Ile	Gly	Ser	Pro	Arg
		65			70					75				80	
Ile	Asn	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	Val	Thr	Ile	Phe	Tyr	Val	Asp	Arg	Leu
				85				90						95	
Gly	Tyr	Tyr	Pro	Tyr	Ile	Asp	Ser	Ile	Thr	Gly	Val	Thr	Val	Asn	Gly
			100					105					110		
Gly	Ile	Pro	Gln	Lys	Ile	Ser	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Asp	Lys	Ala	Lys
		115					120					125			
Lys	Asp	Ile	Thr	Phe	Tyr	Met	Pro	Val	Asp	Asn	Leu	Gly	Met	Ala	Val
		130				135					140				
Ile	Asp	Trp	Glu	Glu	Trp	Arg	Pro	Thr	Trp	Ala	Arg	Asn	Trp	Lys	Pro
		145			150					155				160	
Lys	Asp	Val	Tyr	Lys	Asn	Arg	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Asn
				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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> variante L499W del Precursor de PH20

<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
      50      55      60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65      70      75      80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
      85      90      95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
      100      105      110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys

```

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

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

<220>
<223> vector HZ24

<400> 52

tcaatattg	ccattagcca	tattattcat	tggttatata	gcataaatca	atattggcta
ttggccattg	catacgttgt	atctatatca	taatatgtac	atttatattg	gctcatgtcc
aatatgaccg	ccatgttggc	attgattatt	gactagttat	taatagtaat	caattacggg

gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgcccacag acccccgcgc attgacgtca ataatgacgt atgttcccac 300
agtaacgccca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg cccctattg acgtcaatga 420
cggtaaatgg ccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttccacttg 480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcgggttt ggagtagcac 540
caatgggagc ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatgggagc ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaatacccc 660
cgccccggtt acgcaaatgg gcggtagggc tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc 720
tcgttttagt aaccgtcaga tcaactagaag ctttattgctg tagttttatc acagttaaat 780
tgctaacgca gtcagtgcct ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc 840
gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggc tacaagacag gtttaaggag gtttaaggag 900
actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcacctc ttggtcttac 960
tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020
aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcatg ggagtgtata aattcaagca 1080
catctttttc agaagctttg ttaaatcaag tggagtatcc cagatagttt tcacctctc 1140
tctgattcca tgttgcctga ctctgaattt cagagcacct cctgttattc caaatgtgcc 1200
tttctctctg gcctggaatg ccccaagtga attttgcctt ggaaaatttg atgagccact 1260
agatatgagc ctcttctctt tcataggaag ccccggaata aacgccaccg ggcaagggtg 1320
tacaatatat tatgttgata gacttggcta ctatccttac atagattcaa tcacaggagt 1380
aactgtgaat ggaggaatcc ccagagaagt ttccttaca gaccatctgg acaaagctaa 1440
gaaagacatt acattttata tgccagtaga caatttggga atggctgtta ttgactggga 1500
agaatggaga cccacttggg caagaaactg gaaacctaaa gatgtttaca agaataaggtc 1560
tattgaattg gttcagcaac aaaatgtaca acttagtctc acagaggcca ctgagaaagc 1620
aaaacaagaa tttgaaaagg cagggaagga tttcctggta gagactataa aattgggaaa 1680
attacttcgg ccaaatcact tgtggggtta ttatctttt ccggattgtt acaaccatca 1740
ctataagaaa ccggttaca atggaaagt tctcaatgta gaaataaaaa gaaatgatga 1800
tctcagctgg ttgtggaatg aaagcactgc tctttaccca tccatttatt tgaactactc 1860
gcagtctcct gtagctgcta cactctatgt gcgcaatcga gttcgggaag ccatcagagt 1920
ttccaaaata cctgatgcaa aaagtccact tccggttttt gcataatccc gcatagtttt 1980
tactgatcaa gttttgaaat tcccttctca agatgaactt gtgtatacat ttggcgaaac 2040
tggtgctctg ggtgcttctg gaattgtaat atggggaacc ctgagataa ctgagagta 2100
gaaatcctgc ttgctcctag acaattacat ggagactata ctgaatcctt accataatca 2160
cgtcacacta gcagccaaaa tgtgtagcca agtgctttgc caggagcaag gagtgtgtat 2220
aaggaaaaac tggaattcaa gtgactatct tcacctcaac ccagataatt ttgctattca 2280
acttgagaaa ggtggaatg tcacagtacg tggaaaaccg acacttgaag acactgagca 2340
atcttctgaa attttttatt gcagctgtta tagcaccttg agttgtagg agaaagctga 2400
tgtaaaagac actgatgctg ttgatgtgtg tattgctgat ggtgtctgta tagatgcttt 2460
tctaaaacct cccatggaga cagaagaacc tcaaattttc tactgaggt ccatagctaa 2520
cgccctctc cctccccccc ccctaactgt actggccgaa ggcgcttga ataggccgg 2580
tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc 2640
cggaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa 2700
ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga 2760
caaacacagt ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaaac cccacactgg cgacaggtgc 2820
ctctcgggcc aaaaaccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc 2880
cacgttgtga gttggatagt tgtggaagaa gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac 2940
aaggggctga aggatgccca gaaggtaccc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg 3000
tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac 3060
ggggacgtgg ttttctttg aaaaacacga tgataagcct gccacaaccc acagcgcccg 3120
ctgccatcat ggttcgacca ttgaaactgca tgcgtcgccgt gtcccaaat atggggattg 3180
gcaagaacgg agacctaccc tggcctccgc tcaggaaacga gttcaagtac ttccaaagaa 3240
tgaccacaac ctcttcagtg gaaggtaaac agaactgggt gattatgggt aggaaaacct 3300
ggttctccat tcttgagaag aatcgacctt taaaggacag aattaatata gttctcagta 3360
gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc attttcttgc caaaagtgt gatgatgct 3420
taagacttat tgaacaacgg gaattggcaa gtaaaagtag catggtttg atagtggag 3480
gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca cctcagactc tttgtgacaa 3540
ggatcatgca ggaatttgaa agtgacacgt ttttccaga aattgatttg gggaaatata 3600
aacttctccc agaataccca ggcgtcctct ctgaggtcca ggaggaaaa ggcatcaagt 3660
ataagtttga agtctacgag aagaaagact aaacgcgtgg tacctctaga gtcgaccgg 3720
gcggccgctt cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag 3780
aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgaac 3840
cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt 3900
tcagggggag atgtgggag ttttttaaa caagtaaaac ctctacaaat gtggtaaaa 3960

```

cgataaggat cccgggctggc gtaatagcga agaggcccgcc accgatcgcc cttcccaaca 4020
gttgccgcagc ctgaatggcg aatggacgcg ccctgtagcg gcgcattaag gcggcggggt 4080
gtgggtgggta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc 4140
gctttcttcc cttcctttct cggcacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg 4200
gggctccctt taggggtccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 4260
taggggtgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cgggtttttc ccttttgacg 4320
ttggagtgcca cgttctttta tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct 4380
atctcgggtct attccttttg tttataaggg attttgccga tttcggccta ttgggttaaaa 4440
aatgagctga ttttaacaaa atttaacgcg aatttttaaca aaatattaac gcttacaatt 4500
tcctgatgcg gtattttctc cttacgcacg tgtgcggtat ttcacaccgc atatgggtgca 4560
ctctcagtagc aatctgctct gatgccgcag agttaagcca gccccgacac ccgccaacac 4620
ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcacc cgcttacaga caagctgtga 4680
ccgtctccgg gagctgcacg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgagac 4740
gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata atggttttctt 4800
agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgccggaac ccctatttgt ttatttttct 4860
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 4920
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cctttttttg 4980
cggcattttt ccttctctgt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 5040
aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tctgaactga tctcaacagc ggtaagatcc 5100
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat 5160
gtggcgcggt attatcccgt attgacgcg ggcaagagca actcggctcg cgcatacact 5220
attctcagaa tgacttggtt gactactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 5280
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataaacact gcggccaact 5340
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgca aacatggggg 5400
atcatgtaac tcgccttgat cgttggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaaccagc 5460
agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaacta ttaactggcg 5520
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 5580
caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 5640
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggg aagccctccc 5700
gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 5760
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat 5820
atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaattta aaggatctag gtgaagatcc 5880
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 5940
accccgtaga aaagatcaaa ggcatttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaactgtct 6000
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggtttg tttgccggat caagagctac 6060
caactccttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 6120
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 6180
ctctgctaact cctgttacca gtgctgctg ccagtggcga taagtctgt cttaccggg 6240
tggactcaag acgatagtta ccgataaagg cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttct 6300
gcacacagcc cagcttgagc cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 6360
tatgagaaaag cgcacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca 6420
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 6480
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 6540
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttctg 6600
ggccttttgc tcacatggct cgacagatct 6630

```

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

<220>
 <223> dihidrofolato reductasa

<400> 53

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

```

Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu Lys
65          70          75          80
Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp Ala
      85          90          95
Leu Arg Leu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met Val
      100        105        110
Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Gln Glu Ala Met Asn Gln Pro
      115        120        125
Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Glu Phe Glu Ser
      130        135        140
Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Gly Lys Tyr Lys Leu Leu Pro
145          150        155        160
Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile Lys
      165        170        175
Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Asp
      180        185

```

<210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Etiqueta His

<400> 54

```

His His His His His His
      1          5

```

<210> 55
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Etiqueta Flag

<400> 55

```

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
      1          5

```

<210> 56
 <211> 1449
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Secuencia de ARNm de Gen2

<400> 56

```

atgggagtg c taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaata aagtggagta
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcttc tgggcctgga atgccccaa ggaattttgt
cttggaatat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccga
ataaacgcc cgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct

```

ES 2 634 669 T3

```

aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccaactgagaa agcaaaaacaa 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 tcagcagtcct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctacgagcca aaatgtgtag tcaagtgcctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgcctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctactga 1449

```

<210> 57

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <223> Péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-447

<400> 57

```

      Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
      1           5           10           15
      Tyr

```

15 <210> 58

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <220>

<223> Péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-446

<400> 58

```

      Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
      1           5           10           15

```

25 <210> 59

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-445

35 <400> 59

```

      Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
      1           5           10           15

```

40 <210> 60

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45 <220>

<223> Péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-444

ES 2 634 669 T3

<400> 60

Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln
1 5 10

5

<210> 61
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<220>
<223> Péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-443

<400> 61

Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
1 5 10

15

<210> 62
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<220>
<223> Péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-442

25

<400> 62

Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu
1 5 10

30

<210> 63
<211> 520
<212> PRT
<213> Ovis aries

35

<220>
<223> PH20

<400> 63

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

40

```

Pro His Ile Asp Glu Lys Thr Gly Asn Thr Val Tyr Gly Gly Ile Pro
65          70          75          80
Gln Leu Gly Asn Leu Lys Asn His Leu Glu Lys Ala Lys Lys Asp Ile
      85          90
Ala Tyr Tyr Ile Pro Asn Asp Ser Val Gly Leu Ala Val Ile Asp Trp
      100        105        110
Glu Asn Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
      115        120        125
Tyr Arg Asp Glu Ser Val Glu Leu Val Leu Gln Lys Asn Pro Gln Leu
      130        135        140
Ser Phe Pro Glu Ala Ser Lys Ile Ala Lys Val Asp Phe Glu Thr Ala
145          150        155        160
Gly Lys Ser Phe Met Gln Glu Thr Leu Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
      165        170        175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
      180        185        190
Asn Tyr Asn Gln Pro Thr Tyr Asn Gly Asn Cys Ser Asp Leu Glu Lys
      195        200        205
Arg Arg Asn Asp Asp Leu Asp Trp Leu Trp Lys Glu Ser Thr Ala Leu
      210        215        220
Phe Pro Ser Val Tyr Leu Asn Ile Lys Leu Lys Ser Thr Pro Lys Ala
225          230        235        240
Ala Phe Tyr Val Arg Asn Arg Val Gln Glu Ala Ile Arg Leu Ser Lys
      245        250        255
Ile Ala Ser Val Glu Ser Pro Leu Pro Val Phe Val Tyr His Arg Pro
      260        265        270
Val Phe Thr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Leu Ser Gln Gly Asp Leu Val
      275        280        285
Asn Ser Val Gly Glu Ile Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Ile Met
      290        295        300
Trp Gly Ser Leu Asn Leu Ser Leu Thr Met Gln Ser Cys Met Asn Leu
305          310        315        320
Gly Asn Tyr Asn Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
      325        330        335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys His Asp Glu Gly Val Cys
      340        345        350
Thr Arg Lys Gln Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Ile
      355        360        365
Met Asn Phe Ala Ile Gln Thr Gly Lys Gly Gly Lys Tyr Thr Val Pro
      370        375        380
Gly Lys Val Thr Leu Glu Asp Leu Gln Thr Phe Ser Asp Lys Phe Tyr
385          390        395        400
Cys Ser Cys Tyr Ala Asn Ile Asn Cys Lys Lys Arg Val Asp Ile Lys
      405        410        415
Asn Val His Ser Val Asn Val Cys Met Ala Glu Asp Ile Cys Ile Glu
      420        425        430
Gly Pro Val Lys Leu Gln Pro Ser Asp His Ser Ser Ser Gln Asn Glu
      435        440        445
Ala Ser Thr Thr Thr Val Ser Ser Ile Ser Pro Ser Thr Thr Ala Thr
      450        455        460
Thr Val Val Ser Pro Cys Thr Pro Glu Lys Gln Ser Pro Glu Cys Leu
465          470        475        480
Lys Val Arg Cys Leu Glu Ala Ile Ala Asn Val Thr Gln Thr Gly Cys
      485        490        495
Gln Gly Val Lys Trp Lys Asn Thr Ser Ser Gln Ser Gln Ser Ser Ile
      500        505        510
Gln Asn Ile Lys Asn Gln Thr Thr
      515        520

```

<210> 64

<211> 474

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<223> PH20

<400> 64

ES 2 634 669 T3

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

5 <210> 65
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Ovis aries

10 <220>
 <223> PH20

<400> 65

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

385					390					395				400	
Ser	Cys	Tyr	Ala	Asn	Ile	Asn	Cys	Lys	Lys	Arg	Val	Asp	Ile	Lys	Asn
				405					410					415	
Val	His	Ser	Val	Asn	Val	Cys	Met	Ala	Glu	Asp	Ile	Cys	Ile	Glu	Gly
			420					425					430		
Pro	Val	Lys	Leu	Gln	Pro	Ser	Asp	His	Ser	Ser	Ser	Gln	Asn	Glu	Ala
		435				440						445			
Ser	Thr	Thr	Thr	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Thr	Thr	Ala	Thr	Thr
	450				455					460					
Val	Ser	Pro	Cys	Thr	Pro	Glu	Lys	Gln	Ser	Pro	Glu	Cys	Leu	Lys	Val
465					470					475					480
Arg	Cys	Leu	Glu	Ala	Ile	Ala	Asn	Val	Thr	Gln	Thr	Gly	Cys	Gln	Gly
				485				490						495	
Val	Lys	Trp	Lys	Asn	Thr	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Ile	Gln	Asn	Ile	Lys
			500					505					510		
Asn	Gln	Thr	Thr	Tyr											
			515												

<210> 66
 <211> 1620
 <212> ADN
 <213> Ovis aries

<220>
 <223> que codifica PH20 de oveja

<400> 66

```

ttttccgtgt  tgggttggtc  tggacttcag  agcaccgccct  ctcatttcaa  acacttcttt  60
cctctgggcc  tggaatgccc  cagctgaacg  ttgtatttaa  atctttaaac  tacctccaga  120
tctgagactc  ttctctgtaa  aaggaagccc  ccaaaaaagt  gctacgggac  aatttattac  180
attattttat  gctgatagac  ttggctacta  tcctcatata  gatgaaaaaa  caggcaaac  240
tgtatatgga  ggaattcccc  agttgggaaa  cttaaaaaat  catttggaaa  aagccaaaa  300
agacattgcc  tattacatac  caaatgacag  cgtgggcttg  gcggtcattg  actgggaaaa  360
ctggaggcct  acctgggcaa  gaaactggaa  acctaaagat  gtttacaggg  atgagtctgt  420
tgagttggtt  ctgcaaaaa  atccacaact  cagtttccca  gaggcttcca  agattgcaa  480
agtggatttt  gagacagcag  gaaagagttt  catgcaagag  actttaaaac  tgggaaaatt  540
acttcggcca  aatcacttat  ggggttatta  tctttttcct  gattgttaca  atcataatta  600
taaccagcct  acttacaatg  gaaattgctc  tgatttagaa  aaaaggagaa  atgatgatct  660
cgactggttg  tggaaggaaa  gcaactgcc  tttcccttct  gtttatttga  atatcaagtt  720
aaaatctact  ccaaaagctg  ctttctatgt  tcgtaatcgt  gtccaggaag  ccattcgggt  780
gtctaaaata  gcgagtgttg  aaagtccact  tcccgttttt  gtatatcacc  gtccagtttt  840
tactgatggg  tcttcaacat  acctttctca  ggggtgacct  gtgaattcgg  ttggtgagat  900
cgttgctcta  ggtgcctctg  ggattataat  gtggggcagt  ctcaatctaa  gcctaactat  960
gcaatcttgc  atgaacctag  gcaattactt  gaacactaca  ctgaatcctt  acataatcaa  1020
cgtcacccta  gcagccaaa  tgtgcagcca  agtgctttgc  cagcatgaag  gagtgtgtac  1080
aaggaaacaa  tggaattcaa  gcgactatct  tcacctgaac  ccaatgaatt  ttgctattca  1140
aactgggaaa  ggtggaaaat  acacagtacc  tgggaaagtc  aacttgaag  acctgcaaac  1200
gttttctgat  aaattttatt  gcagttgtta  tgccaacatc  aactgtaaga  agagagttga  1260
tataaaaaat  gttcatagt  ttaatgtatg  tatggcagaa  gacatttgta  tagaggggcc  1320
tgtgaagtta  caaccagtg  atcattcctc  tagccagaat  gaggcactca  ctaccaccgt  1380
cagcagtatc  tcacctcta  ctacagccac  cacagtatct  ccatgtactc  ctgagaaaca  1440
gtcccctgag  tgcctcaaag  tcaggtgttt  ggaagccatc  gccaacgtca  cccaaacggg  1500
gtgtcaaggt  gttaaatgga  agaacacttc  cagtcagtca  agtattcaaa  atattaaaaa  1560
tcaacaacc  tattaaaata  taaattcagt  gcttataaaa  aaaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  1620
    
```

<210> 67
 <211> 793
 <212> PRT
 <213> Arthrobacter sp.

<220>
 <223> hialuronano liasa (cepa FB24)

<400> 67

ES 2 634 669 T3

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

Leu Pro Gly Ile Thr Val Asp Thr Ser Ser Leu Pro Asp Lys Val Glu
485 490 495
Gly Glu Trp Gly Ala Ala Thr Pro Ala Asn Glu Trp Thr Gly Ser Thr
500 505 510
Ala Tyr Gly Asp Val Ala Ala Val Gly Gln His Leu Ile Gly Pro Gly
515 520 525
Gly Thr Gly Leu Thr Ala Arg Lys Ser Trp Phe Val Ser Lys Asp Val
530 535 540
Ile Val Cys Leu Gly Ala Asp Ile Arg Thr Gly Ser Gly Ser Arg Ile
545 550 555 560
Glu Thr Val Val Asp His Arg Asn Leu His Ala Gly Phe Asn Ala Met
565 570 575
Gly Thr Ala Ala Gly Thr Val Ala Ala Thr Pro Gly His Pro Glu Val
580 585 590
Leu Thr Val Asp Arg Trp Val His Leu Glu Gly Phe Gly Gly Tyr Val
595 600 605
Val Leu Asp Ala Ala Pro Leu Gln Val Leu Arg Glu Gln Arg Glu Gly
610 615 620
Ser Trp Ser Glu Val Asn Val Lys Gly Ser Ala Ala Arg Gln Thr Arg
625 630 635 640
Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Phe Asp His Gly His Glu Pro Glu Ala Ala
645 650 655
Ser Tyr Ala Tyr Leu Val Ala Pro Gly Ala Ser Ala Ser Met Thr Ser
660 665 670
Ser Leu Ser Gly Gln Ser Phe His Thr Val Leu Arg Asn Asp Glu Val
675 680 685
Ala Gln Ala Val Lys Phe Lys Lys Glu Lys Thr Thr Ala Ala Thr Phe
690 695 700
Trp Arg Pro Gly Thr Val Gly Asp Leu Ala Leu Ser Gly Pro Ala Cys
705 710 715 720
Val Val Val Lys Glu Val Gly Asp Arg Leu Ser Ile Ala Val Ser Asp
725 730 735
Pro Thr Gln Asn Ala Ser Thr Leu Thr Leu Arg Leu Lys Thr Lys Arg
740 745 750
Phe Phe Arg Ile Ile Glu Gly Gln Gly Ala Ser Leu Ser His Gly Ala
755 760 765
Asp Gly Phe Thr Val Leu Glu Val Asp Ile Ala Asn His Ala Gly Arg
770 775 780
Thr Lys Gln Ile Glu Leu Ser Ala Glu
785 790

<210> 68
<211> 557
<212> PRT
<213> Bdellovibrio bacteriovorus

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 68

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

Ser	Gly	Phe	Arg	Ser	Phe	Glu	Asp	Val	Leu	Lys	Asn	Leu	Gly	Leu	His
			100					105					110		
Lys	Tyr	Pro	Leu	Glu	Asn	Glu	Arg	Gly	Val	Tyr	Ala	Val	Pro	Tyr	Pro
		115					120					125			
Asn	Glu	Ile	Arg	Pro	Asp	Thr	Leu	Met	Gly	Phe	Gly	Leu	Ile	Glu	Arg
		130				135					140				
Asn	Gly	Ala	Glu	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Cys	Ala	Ala	Cys	His	Ser	Ser
145					150					155					160
Asn	Leu	Phe	Gly	Lys	Thr	Val	Leu	Gly	Met	Thr	Asn	Arg	Phe	Pro	Arg
				165					170						175
Ala	Asn	Glu	Phe	Phe	Ile	Lys	Ala	Lys	Lys	Val	Met	Pro	Leu	Met	Asp
			180					185					190		
Pro	His	Ile	Phe	Gln	Ala	Tyr	Thr	Arg	Ala	Thr	Asp	Ala	Glu	Thr	Ala
		195					200					205			
Leu	Leu	Val	Glu	Ser	Lys	Glu	Arg	Leu	Lys	Ser	Val	Ala	Leu	Lys	Gln
		210				215					220				
Pro	Ile	Ala	Leu	Gly	Leu	Asp	Thr	Ser	Leu	Ala	Gln	Val	Ser	Leu	Ser
225					230					235					240
Leu	Asn	Arg	Arg	Ala	Lys	Asp	Gly	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ser	Asp	Lys	Ala
				245					250					255	
Ala	Arg	Ser	Pro	Arg	Ala	Asp	Ala	Tyr	Leu	Asp	Asn	Lys	Pro	Ala	Asp
			260					265					270		
Ser	Lys	Pro	Ala	Val	Trp	Trp	Asn	Val	Lys	Tyr	Lys	Asn	Arg	Trp	Leu
		275					280					285			
Ser	Asp	Gly	Ser	Val	Leu	Ser	Gly	Asn	Pro	Ile	Phe	Thr	Asn	Leu	Ile
		290				295					300				
Trp	Asn	Glu	Ile	Gly	Arg	Gly	Ala	Asp	Leu	His	Glu	Leu	Glu	Gln	Trp
305					310					315					320
Leu	Ala	Asp	Asn	Asp	His	Ile	Ile	Lys	Glu	Leu	Thr	Thr	Ala	Val	Phe
				325					330					335	
Ala	Ser	Glu	Ala	Pro	His	Ile	Thr	Asp	Phe	Tyr	Pro	Ala	Glu	Lys	Ile
			340					345					350		
Asp	Leu	Gly	Arg	Ala	Lys	Ala	Gly	Glu	Gln	Ile	Phe	Lys	Asn	Thr	Cys
		355					360					365			
Ala	Lys	Cys	His	Gly	His	Tyr	Glu	Lys	Ala	Trp	Asn	Leu	Pro	Gln	Ala
		370				375					380				
Leu	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	Glu	Arg	Leu	Lys	Thr	Val	Glu	Val	Arg	Tyr
385					390					395					400
Lys	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Val	Gly	Thr	Asp	Pro	Phe	Arg	Arg
				405					410					415	
Gln	Gly	Met	Lys	Ser	Leu	Glu	Gln	Leu	Asn	Asp	Leu	Glu	Ile	Ser	Lys
			420					425					430		
Lys	Asn	Gly	Ile	Val	Ile	Lys	Ala	Gln	Glu	Gly	Tyr	Val	Pro	Pro	
		435					440					445			
Leu	Val	Gly	Ile	Trp	Ala	Arg	Trp	Pro	Tyr	Met	His	Asn	Asn	Ser	Ile
		450				455					460				
Pro	Asn	Leu	Cys	Val	Leu	Leu	Thr	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Pro	Ser	Ile
465					470					475					480
Tyr	Tyr	Ser	Gly	Glu	Ala	Leu	Asn	Lys	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asp	Phe	Ser
				485					490					495	
Cys	Gly	Gly	Tyr	Pro	Ile	Gly	Asp	Lys	Thr	Pro	Lys	Ala	Trp	Lys	Thr
			500					505					510		
Arg	Glu	His	Leu	Tyr	Asp	Thr	Arg	Asn	Pro	Gly	Met	Gly	Asn	Met	Gly
		515					520					525			
His	Asp	Glu	Gly	Ile	Phe	Ile	Lys	Asp	Gly	Lys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ala
		530				535					540				
Glu	Asp	Lys	Tyr	Asn	Leu	Ile	Gln	Phe	Leu	Gln	Thr	Leu			
545					550					555					

<210> 69

<211> 813

<212> PRT

<213> Propionibacterium acnes

<220>

<223> Hialuronano liasa

<400> 69

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

```

      450      455      460
Leu Pro Gly Asp Met Gly Gln Tyr Glu Asp Gly Tyr Trp Ala Thr Val
465      470      475      480
Asp Tyr Ser Ala Pro Thr Gly Thr Thr Val Asp Ser Thr Pro Leu Lys
      485      490      495
Arg Ala Val Gly Ala Ser Trp Ala Ala Lys Thr Pro Thr Asn Glu Trp
      500      505      510
Ser Gly Gly Leu Ala Ser Gly Ser Trp Ser Ala Ala Ala Ser His Ile
      515      520      525
Thr Ser Gln Asp Ser Ala Leu Lys Ala Arg Arg Leu Trp Val Gly Leu
      530      535      540
Lys Asp Ala Met Val Glu Leu Thr Thr Asp Val Thr Thr Asp Ala Ser
545      550      555      560
Arg Ala Ile Thr Val Val Glu His Arg Lys Val Ala Ser Ser Ser Thr
      565      570      575
Lys Leu Leu Val Asp Gly Asn Arg Val Ser Ser Ala Thr Ser Phe Gln
      580      585      590
Asn Pro Arg Trp Ala His Leu Asp Gly Val Gly Gly Tyr Val Phe Ala
      595      600      605
Thr Asp Thr Asp Leu Ser Ala Asp Val Ala Thr Arg Lys Gly Thr Trp
      610      615      620
Ile Asp Val Asn Pro Ser Arg Lys Val Lys Gly Ala Asp Glu Val Ile
625      630      635      640
Glu Arg Ala Tyr Ala Ser Leu His Val Thr His His Asp Arg Pro Val
      645      650      655
Ala Trp Ala Leu Leu Pro Thr Ala Ser Arg Ser His Thr Met Ala Leu
      660      665      670
Ala Thr Arg Pro Gly Val Glu Pro Phe Thr Val Leu Arg Asn Asp Ala
      675      680      685
Thr Val Gln Ala Val Arg Ser Ala Gly Ala Leu Leu Thr Lys Asp Pro
      690      695      700
Thr Val Val Thr Thr Leu Ala Phe Trp Lys Pro Ala Thr Cys Gly Gly
705      710      715      720
Val Ala Val Asn Arg Pro Ala Leu Val Gln Thr Arg Glu Ser Ala Asn
      725      730      735
Gln Met Glu Val Val Ile Val Glu Pro Thr Gln Lys Arg Gly Ser Leu
      740      745      750
Thr Val Thr Ile Glu Gly Ser Trp Lys Val Lys Thr Ala Asp Ser His
      755      760      765
Val Asp Val Ser Cys Glu Asn Ala Ala Gly Thr Leu His Val Asp Thr
      770      775      780
Ala Gly Leu Gly Gly Gln Ser Val Arg Val Thr Leu Ala Arg Gln Val
785      790      795      800
Thr Gln Thr Pro Ser Gly Gly Gly Arg His Asp Arg Ala
      805      810

```

<210> 70
 <211> 1072
 <212> PRT
 <213> Streptococcus agalactiae

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 70

```

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

```

50	55	60
Thr Thr Thr Thr Gln Gln Asp Leu Ser Asn Pro Thr Ala Ser Thr Ala		
65	70	75
Thr Ala Thr Ala Thr His Ser Thr Met Lys Gln Val Val Asp Asn Gln		80
	85	90
Thr Gln Asn Lys Glu Leu Val Lys Asn Gly Asp Phe Asn Gln Thr Asn		95
	100	105
Pro Val Ser Gly Ser Trp Ser His Thr Ser Ala Arg Glu Trp Ser Ala		110
	115	120
Trp Ile Asp Lys Glu Asn Thr Ala Asp Lys Ser Pro Ile Ile Gln Arg		125
	130	135
Thr Glu Gln Gly Gln Val Ser Leu Ser Ser Asp Lys Gly Phe Arg Gly		140
	145	150
Ala Val Thr Gln Lys Val Asn Ile Asp Pro Thr Lys Lys Tyr Glu Val		155
	165	170
Lys Phe Asp Ile Glu Thr Ser Asn Lys Ala Gly Gln Ala Phe Leu Arg		175
	180	185
Ile Met Glu Lys Lys Asp Asn Asn Thr Arg Leu Trp Leu Ser Glu Met		190
	195	200
Thr Ser Gly Thr Thr Asn Lys His Thr Leu Thr Lys Ile Tyr Asn Pro		205
	210	215
Lys Leu Asn Val Ser Glu Val Thr Leu Glu Leu Tyr Tyr Glu Lys Gly		220
	225	230
Thr Gly Ser Ala Thr Phe Asp Asn Ile Ser Met Lys Ala Lys Gly Pro		235
	245	250
Lys Asp Ser Glu His Pro Gln Pro Val Thr Thr Gln Ile Glu Glu Ser		255
	260	265
Val Asn Thr Ala Leu Asn Lys Asn Tyr Val Phe Asn Lys Ala Asp Tyr		270
	275	280
Gln Tyr Thr Leu Thr Asn Pro Ser Leu Gly Lys Ile Val Gly Gly Ile		285
	290	295
Leu Tyr Pro Asn Ala Thr Gly Ser Thr Thr Val Lys Ile Ser Asp Lys		300
	305	310
Ser Gly Lys Ile Ile Lys Glu Val Pro Leu Ser Val Thr Ala Ser Thr		315
	325	330
Glu Asp Lys Phe Thr Lys Leu Leu Asp Lys Trp Asn Asp Val Thr Ile		335
	340	345
Gly Asn His Val Tyr Asp Thr Asn Asp Ser Asn Met Gln Lys Ile Asn		350
	355	360
Gln Lys Leu Asp Glu Thr Asn Ala Lys Asn Ile Lys Thr Ile Lys Leu		365
	370	375
Asp Ser Asn His Thr Phe Leu Trp Lys Asp Leu Asp Asn Leu Asn Asn		380
	385	390
Ser Ala Gln Leu Thr Ala Thr Tyr Arg Arg Leu Glu Asp Leu Ala Lys		395
	405	410
Gln Ile Thr Asn Pro His Ser Thr Ile Tyr Lys Asn Glu Lys Ala Ile		415
	420	425
Arg Thr Val Lys Glu Ser Leu Ala Trp Leu His Gln Asn Phe Tyr Asn		430
	435	440
Val Asn Lys Asp Ile Glu Gly Ser Ala Asn Trp Trp Asp Phe Glu Ile		445
	450	455
Gly Val Pro Arg Ser Ile Thr Ala Thr Leu Ala Leu Met Asn Asn Tyr		460
	465	470
Phe Thr Asp Ala Glu Ile Lys Thr Tyr Thr Asp Pro Ile Glu His Phe		475
	485	490
Val Pro Asp Ala Gly Tyr Phe Arg Lys Thr Leu Asp Asn Pro Phe Lys		495
	500	505
Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val Asp Met Gly Arg Val Lys Ile Ile Glu		510
	515	520
Gly Leu Leu Arg Lys Asp Asn Thr Ile Ile Glu Lys Thr Ser His Ser		525
	530	535
Leu Lys Asn Leu Phe Thr Thr Ala Thr Lys Ala Glu Gly Phe Tyr Ala		540
	545	550
		555
		560

Asp	Gly	Ser	Tyr	Ile	Asp	His	Thr	Asn	Val	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr
				565					570					575	
Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Leu	Thr	Gln	Leu	Leu	Pro	Ile	Ile	Gln
			580						585				590		
Glu	Thr	Asp	Tyr	Lys	Ile	Ser	Asn	Gln	Glu	Leu	Asp	Met	Val	Tyr	Lys
		595					600					605			
Trp	Ile	Asn	Gln	Ser	Phe	Leu	Pro	Leu	Ile	Val	Lys	Gly	Glu	Leu	Met
	610					615					620				
Asp	Met	Ser	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Ser	Ser	His
625					630					635					640
Ala	Ala	Ala	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gly	Phe	Leu	Arg	Leu	Ala	Asn	Met
				645					650					655	
Ser	Asn	Glu	Glu	Arg	Asn	Leu	Asp	Leu	Lys	Ser	Thr	Ile	Lys	Thr	Ile
		660						665					670		
Ile	Thr	Ser	Asn	Lys	Phe	Tyr	Asn	Val	Phe	Asn	Asn	Leu	Lys	Ser	Tyr
	675						680					685			
Ser	Asp	Ile	Ala	Asn	Met	Asn	Lys	Met	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Val	Ala
690						695					700				
Thr	Lys	Pro	Leu	Lys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Arg
705					710					715					720
Leu	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Lys	Asp	Phe	Gly	Phe	Ala	Leu	Ser	Leu
				725					730					735	
His	Ser	Lys	Arg	Thr	Leu	Asn	Tyr	Glu	Gly	Met	Asn	Asp	Glu	Asn	Thr
			740					745					750		
Arg	Gly	Trp	Tyr	Thr	Gly	Asp	Gly	Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Ser	Asp
	755					760						765			
Gln	Ser	His	Tyr	Ser	Asn	His	Phe	Trp	Pro	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Lys
	770					775					780				
Met	Ala	Gly	Thr	Thr	Glu	Lys	Asp	Ala	Lys	Arg	Glu	Asp	Thr	Thr	Lys
785					790					795					800
Glu	Phe	Met	Ser	Lys	His	Ser	Lys	Asp	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Gln
			805					810						815	
Val	Thr	Gly	Thr	Ser	Asp	Phe	Val	Gly	Ser	Val	Lys	Leu	Asn	Asp	His
			820					825					830		
Phe	Ala	Leu	Ala	Ala	Met	Asp	Phe	Thr	Asn	Trp	Asp	Arg	Thr	Leu	Thr
		835					840					845			
Ala	Gln	Lys	Gly	Trp	Val	Ile	Leu	Asn	Asp	Lys	Ile	Val	Phe	Leu	Gly
	850				855						860				
Ser	Asn	Ile	Lys	Asn	Thr	Asn	Gly	Ile	Gly	Asn	Val	Ser	Thr	Thr	Ile
865					870					875					880
Asp	Gln	Arg	Lys	Asp	Asp	Ser	Lys	Thr	Pro	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Val	Asn
			885						890					895	
Gly	Lys	Thr	Ile	Asp	Leu	Lys	Gln	Ala	Ser	Ser	Gln	Gln	Phe	Thr	Asp
			900					905					910		
Thr	Lys	Ser	Val	Phe	Leu	Glu	Ser	Lys	Glu	Pro	Gly	Arg	Asn	Ile	Gly
	915						920					925			
Tyr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asn	Ser	Thr	Ile	Asp	Ile	Glu	Arg	Lys	Glu	Gln
	930					935					940				
Thr	Gly	Thr	Trp	Asn	Ser	Ile	Asn	Arg	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ser	Ile
945				950						955					960
Val	Ser	Asn	Pro	Phe	Ile	Thr	Ile	Ser	Gln	Lys	His	Asp	Asn	Lys	Gly
				965					970					975	
Asp	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Met	Met	Val	Pro	Asn	Ile	Asp	Arg	Thr	Ser	Phe
		980						985					990		
Asp	Lys	Leu	Ala	Asn	Ser	Lys	Glu	Val	Glu	Leu	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser
		995					1000					1005			
Lys	Gln	Gln	Val	Ile	Tyr	Asp	Lys	Asn	Ser	Gln	Thr	Trp	Ala	Val	Ile
	1010					1015					1020				
Lys	His	Asp	Asn	Gln	Glu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asn	Gln	Phe	Lys	Met	Asn
1025				1030						1035					1040
Lys	Ala	Gly	Leu	Tyr	Leu	Val	Gln	Lys	Val	Gly	Asn	Asp	Tyr	Gln	Asn
			1045						1050					1055	
Val	Tyr	Tyr	Gln	Pro	Gln	Thr	Met	Thr	Lys	Thr	Asp	Gln	Leu	Ala	Ile

1060

1065

1070

5

<210> 71
 <211> 1072
 <212> PRT
 <213> Streptococcus agalactiae 18RS21

<220>

<223> Hialuronano liasa

<400> 71

5

```

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

```

			405					410					415				
Gln	Ile	Thr	Asn	Pro	His	Ser	Thr	Ile	Tyr	Lys	Asn	Glu	Lys	Ala	Ile		
			420				425						430				
Arg	Thr	Val	Lys	Glu	Ser	Leu	Ala	Trp	Leu	His	Gln	Asn	Phe	Tyr	Asn		
			435				440						445				
Val	Asn	Lys	Asp	Ile	Glu	Gly	Ser	Ala	Asn	Trp	Trp	Asp	Phe	Glu	Ile		
			450				455						460				
Gly	Val	Pro	Arg	Ser	Ile	Thr	Ala	Thr	Leu	Ala	Leu	Met	Asn	Asn	Tyr		
465				470						475			480				
Phe	Thr	Asp	Ala	Glu	Ile	Lys	Thr	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ile	Glu	His	Phe		
			485						490			495					
Val	Pro	Asp	Ala	Gly	Tyr	Phe	Arg	Lys	Thr	Leu	Asp	Asn	Pro	Phe	Lys		
			500						505			510					
Ala	Leu	Gly	Gly	Asn	Leu	Val	Asp	Met	Gly	Arg	Val	Lys	Ile	Ile	Glu		
			515						520			525					
Gly	Leu	Leu	Arg	Lys	Asp	Asn	Thr	Ile	Ile	Glu	Lys	Thr	Ser	His	Ser		
			530			535			540			545					
Leu	Lys	Asn	Leu	Phe	Thr	Thr	Ala	Thr	Lys	Ala	Glu	Gly	Phe	Tyr	Ala		
545				550						555			560				
Asp	Gly	Ser	Tyr	Ile	Asp	His	Thr	Asn	Val	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr		
			565						570			575					
Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Leu	Thr	Gln	Leu	Leu	Pro	Ile	Ile	Gln		
			580			585			590			595					
Glu	Thr	Asp	Tyr	Lys	Ile	Ser	Asn	Gln	Glu	Leu	Asp	Met	Val	Tyr	Lys		
			595			600			605			610					
Trp	Ile	Asn	Gln	Ser	Phe	Leu	Pro	Leu	Ile	Val	Lys	Gly	Glu	Leu	Met		
			615			620			625			630					
Asp	Met	Ser	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Ser	Ser	His		
625				630						635			640				
Ala	Ala	Ala	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gly	Phe	Leu	Arg	Leu	Ala	Asn	Met		
			645						650			655					
Ser	Asn	Glu	Glu	Arg	Asn	Leu	Asp	Leu	Ile	Ser	Thr	Ile	Lys	Thr	Ile		
			660			665			670			675					
Ile	Thr	Ser	Asn	Lys	Phe	Tyr	Asn	Val	Phe	Asn	Asn	Leu	Lys	Ser	Tyr		
			675			680			685			690					
Ser	Asp	Ile	Ala	Asn	Met	Asn	Lys	Met	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Val	Ala		
			690			695			700			705					
Thr	Lys	Pro	Leu	Lys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Arg		
705				710						715			720				
Leu	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Lys	Asp	Phe	Gly	Phe	Ala	Leu	Ser	Leu		
			725						730			735					
His	Ser	Lys	Arg	Thr	Leu	Asn	Tyr	Glu	Gly	Met	Asn	Asp	Glu	Asn	Thr		
			740			745			750			755					
Arg	Gly	Trp	Tyr	Thr	Gly	Asp	Gly	Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Ser	Asp		
			755			760			765			770					
Gln	Ser	His	Tyr	Ser	Asn	His	Phe	Trp	Pro	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Lys		
			770			775			780			785					
Met	Ala	Gly	Thr	Thr	Glu	Lys	Asp	Ala	Lys	Arg	Glu	Asp	Thr	Thr	Lys		
785				790						795			800				
Glu	Phe	Met	Ser	Lys	His	Ser	Lys	Asp	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Gln		
			805						810			815					
Val	Thr	Gly	Thr	Ser	Asp	Phe	Val	Gly									

Thr	Lys	Ser	Val	Phe	Leu	Glu	Ser	Lys	Glu	Pro	Gly	Arg	Asn	Ile	Gly
		915					920					925			
Tyr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asn	Ser	Thr	Ile	Asp	Ile	Glu	Arg	Lys	Glu	Gln
	930					935					940				
Thr	Gly	Thr	Trp	Asn	Ser	Ile	Asn	Arg	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ser	Ile
945					950					955					960
Val	Ser	Asn	Pro	Phe	Ile	Thr	Ile	Ser	Gln	Lys	His	Asp	Asn	Lys	Gly
				965					970					975	
Asp	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Met	Met	Val	Pro	Asn	Ile	Asp	Arg	Thr	Ser	Phe
		980						985					990		
Asp	Lys	Leu	Ala	Asn	Ser	Lys	Glu	Val	Glu	Leu	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser
		995					1000					1005			
Lys	Gln	Gln	Val	Ile	Tyr	Asp	Lys	Asn	Ser	Gln	Thr	Trp	Ala	Val	Ile
	1010					1015					1020				
Lys	His	Asp	Asn	Gln	Glu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asn	Gln	Phe	Lys	Met	Asn
1025					1030					1035					1040
Lys	Ala	Gly	Leu	Tyr	Leu	Val	Gln	Lys	Val	Gly	Asn	Asp	Tyr	Gln	Asn
				1045					1050					1055	
Val	Tyr	Tyr	Gln	Pro	Gln	Thr	Met	Thr	Lys	Thr	Asp	Gln	Leu	Ala	Ile
			1060					1065					1070		

<210> 72

<211> 1081

5

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae serotipo Ia

<220>

<223> Hialuronano liasa

10

<400> 72

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

```

Met Lys Ala Lys Gly Pro Lys Asp Ser Glu His Pro Gln Pro Val Thr
      260      265      270
Thr Gln Ile Glu Glu Ser Val Asn Thr Ala Leu Asn Lys Asn Tyr Val
      275      280      285
Phe Asn Lys Ala Asp Tyr Gln Tyr Thr Leu Thr Asn Pro Ser Leu Gly
      290      295      300
Lys Ile Val Gly Gly Ile Leu Tyr Pro Ser Ala Thr Gly Ser Thr Thr
      305      310      315      320
Val Lys Ile Ser Asp Lys Ser Gly Lys Ile Ile Lys Glu Val Pro Leu
      325      330      335
Ser Val Thr Ala Ser Thr Glu Asp Asn Phe Thr Lys Leu Leu Asp Lys
      340      345      350
Trp Asn Asp Val Thr Ile Gly Asn His Val Tyr Asp Thr Asn Asp Ser
      355      360      365
Asn Met Gln Lys Leu Asn Gln Lys Leu Asp Glu Thr Asn Ala Lys Asn
      370      375      380
Ile Lys Asp Ile Lys Leu Asp Ser Asn Arg Thr Phe Leu Trp Glu Asp
      385      390      395      400
Leu Lys Gly Leu Asn Asn Ser Ala Gln Leu Thr Ala Thr Tyr Arg Arg
      405      410      415
Leu Glu Asp Leu Ala Lys Gln Ile Thr Asn Pro His Ser Thr Ile Tyr
      420      425      430
Lys Asn Glu Lys Ala Ile Arg Thr Val Lys Glu Ser Leu Ala Trp Leu
      435      440      445
His Gln Asn Phe Tyr Asn Val Asn Lys Asp Ile Glu Gly Ser Ala Asn
      450      455      460
Trp Trp Asp Phe Glu Ile Gly Val Pro Arg Ser Ile Thr Ala Thr Leu
      465      470      475      480
Ala Leu Met Asn Asn Tyr Phe Thr Asp Ala Glu Ile Lys Thr Tyr Thr
      485      490      495
Asp Pro Ile Glu His Phe Val Pro Asp Ala Gly Tyr Phe Arg Lys Thr
      500      505      510
Leu Val Asn Pro Phe Lys Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val Asp Met Gly
      515      520      525
Arg Val Lys Ile Ile Glu Gly Leu Leu Arg Lys Asp Asn Thr Ile Ile
      530      535      540
Lys Lys Thr Ser His Ser Leu Lys Asn Leu Phe Thr Thr Ala Thr Lys
      545      550      555      560
Ala Glu Gly Phe Tyr Ala Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Thr Asn Val
      565      570      575
Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val Leu Ile Asp Gly Leu Thr Gln
      580      585      590
Leu Leu Pro Ile Ile Gln Glu Thr Asp Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Glu
      595      600      605
Leu Asp Met Val Tyr Lys Trp Ile Asn Gln Ser Phe Leu Pro Leu Ile
      610      615      620
Val Lys Gly Glu Leu Met Asp Met Ser Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg
      625      630      635      640
Glu Ala Ala Ser Ser His Ala Ala Ala Val Glu Val Leu Arg Gly Phe
      645      650      655
Leu Arg Leu Ala Asn Met Ser Asn Glu Arg Asn Leu Asp Leu Lys
      660      665      670
Ser Thr Ile Lys Thr Ile Ile Thr Ser Asn Lys Phe Tyr Asn Val Phe
      675      680      685
Asn Asn Leu Lys Ser Tyr Ser Asp Ile Ala Asn Met Asn Lys Leu Leu
      690      695      700
Asn Asp Ser Thr Val Ala Thr Lys Pro Leu Lys Ser Asn Leu Ser Thr
      705      710      715      720
Phe Asn Ser Met Asp Arg Leu Ala Tyr Tyr Asn Ala Glu Lys Asp Phe
      725      730      735
Gly Phe Ala Leu Ser Leu His Ser Lys Arg Thr Leu Asn Tyr Glu Gly
      740      745      750
Met Asn Asp Glu Asn Thr Arg Gly Trp Tyr Thr Gly Asp Gly Met Phe

```


ES 2 634 669 T3

```

755          760          765
Tyr Leu Tyr Asn Ser Asp Gln Ser His Tyr Ser Asn His Phe Trp Pro
770          775          780
Thr Val Asn Pro Tyr Lys Met Ala Gly Thr Thr Glu Lys Asp Thr Gly
785          790          795          800
Arg Glu Asp Thr Ile Lys Lys Leu Met Asn Arg Tyr Asp Lys Thr Asn
805          810          815
Lys Asn Ser Lys Val Met Thr Gly Gln Val Thr Gly Thr Ser Asp Phe
820          825          830
Val Gly Ser Val Lys Leu Asn Asp His Phe Ala Leu Ala Met Asp
835          840          845
Phe Thr Asn Trp Asp Arg Thr Leu Thr Ala Gln Lys Gly Trp Val Ile
850          855          860
Leu Asn Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly Ser Asn Ile Lys Asn Thr Asn
865          870          875          880
Gly Val Gly Asn Val Ser Thr Thr Ile Asp Gln Arg Lys Asp Asp Ser
885          890          895
Lys Thr Pro Tyr Thr Thr Tyr Val Asn Gly Lys Thr Val Asp Leu Lys
900          905          910
Gln Ala Ser Ser Gln Gln Phe Thr Asp Thr Lys Ser Val Phe Leu Glu
915          920          925
Ser Lys Glu Pro Gly Arg Asn Ile Gly Tyr Ile Phe Phe Lys Asn Ser
930          935          940
Thr Ile Asp Ile Glu Arg Lys Glu Gln Thr Gly Thr Trp Asn Ser Ile
945          950          955          960
Asn Arg Thr Ser Lys Asn Thr Ser Ile Val Ser Asn Pro Phe Ile Thr
965          970          975
Ile Ser Gln Lys His Asp Asn Lys Gly Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Met
980          985          990
Val Pro Asn Ile Asp Arg Thr Ser Phe Asp Lys Leu Ala Asn Ser Lys
995          1000          1005
Glu Val Glu Leu Leu Glu Asn Ser Ser Lys Gln Gln Val Ile Tyr Asp
1010          1015          1020
Lys Asn Ser Gln Thr Trp Ala Val Ile Lys His Asp Asn Gln Glu Ser
1025          1030          1035          1040
Leu Ile Asn Asn Gln Phe Lys Met Asn Lys Ala Gly Leu Tyr Leu Val
1045          1050          1055
Gln Lys Val Gly Asn Asp Tyr Gln Asn Val Tyr Tyr Gln Pro Gln Thr
1060          1065          1070
Met Thr Lys Thr Asp Gln Leu Ala Ile
1075          1080

```

<210> 73
 <211> 984
 <212> PRT
 <213> Streptococcus agalactiae serotipo III

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 73

```

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

```

ES 2 634 669 T3

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

ES 2 634 669 T3

Val	Phe	Asn	Asn	Leu	Lys	Ser	Tyr	Ser	Asp	Ile	Ala	Asn	Met	Asn	Lys
		595					600					605			
Met	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Val	Ala	Thr	Lys	Pro	Leu	Lys	Ser	Asn	Leu
	610					615				620					
Ser	Thr	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Arg	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Lys
625					630					635					640
Asp	Phe	Gly	Phe	Ala	Leu	Ser	Leu	His	Ser	Lys	Arg	Thr	Leu	Asn	Tyr
				645						650				655	
Glu	Gly	Met	Asn	Asp	Glu	Asn	Thr	Arg	Asp	Trp	Tyr	Thr	Gly	Asp	Gly
			660						665				670		
Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Ser	Asp	Gln	Ser	His	Tyr	Ser	Asn	His	Phe
		675					680					685			
Trp	Pro	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Lys	Met	Ala	Gly	Thr	Thr	Glu	Lys	Asp
	690					695					700				
Ala	Lys	Arg	Glu	Asp	Thr	Thr	Lys	Glu	Phe	Met	Ser	Lys	His	Ser	Lys
705					710					715					720
Asp	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Gln	Val	Thr	Gly	Thr	Ser	Asp	Phe	Val
				725						730				735	
Gly	Ser	Val	Lys	Leu	Asn	Asp	His	Phe	Ala	Leu	Ala	Ala	Met	Asp	Phe
			740					745					750		
Thr	Asn	Trp	Asp	Arg	Thr	Leu	Thr	Ala	Gln	Lys	Gly	Trp	Val	Ile	Leu
		755				760						765			
Asn	Asp	Lys	Ile	Val	Phe	Leu	Gly	Ser	Asn	Ile	Lys	Asn	Thr	Asn	Gly
	770					775					780				
Ile	Gly	Asn	Val	Ser	Thr	Thr	Ile	Asp	Gln	Arg	Lys	Asp	Asp	Ser	Lys
785					790					795					800
Thr	Pro	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Val	Asn	Gly	Lys	Thr	Ile	Asp	Leu	Lys	Gln
					805					810				815	
Ala	Ser	Ser	Gln	Gln	Phe	Thr	Asp	Thr	Lys	Ser	Val	Phe	Leu	Glu	Ser
			820					825					830		
Lys	Glu	Pro	Gly	Arg	Asn	Ile	Gly	Tyr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asn	Ser	Thr
		835					840					845			
Ile	Asp	Ile	Glu	Arg	Lys	Glu	Gln	Thr	Gly	Thr	Trp	Asn	Ser	Ile	Asn
	850					855					860				
Arg	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ser	Ile	Val	Ser	Asn	Pro	Phe	Ile	Thr	Ile
865					870					875					880
Ser	Gln	Lys	His	Asp	Asn	Lys	Gly	Asp	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Met	Met	Val
				885					890					895	
Pro	Asn	Ile	Asp	Arg	Thr	Ser	Phe	Asp	Lys	Leu	Ala	Asn	Ser	Lys	Glu
			900					905					910		
Val	Glu	Leu	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Lys	Gln	Gln	Val	Ile	Tyr	Asp	Lys
		915					920					925			
Asn	Ser	Gln	Thr	Trp	Ala	Val	Ile	Lys	His	Asp	Asn	Gln	Glu	Ser	Leu
	930					935					940				
Ile	Asn	Asn	Gln	Phe	Lys	Met	Asn	Lys	Ala	Gly	Leu	Tyr	Leu	Val	Gln
945					950					955					960
Lys	Val	Gly	Asn	Asp	Tyr	Gln	Asn	Val	Tyr	Tyr	Gln	Pro	Gln	Thr	Met
				965					970					975	
Thr	Lys	Thr	Asp	Gln	Leu	Ala	Ile								
				980											

<210> 74
 <211> 807
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus (cepa COL)

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 74

Met	Thr	Tyr	Arg	Ile	Lys	Lys	Trp	Gln	Lys	Leu	Ser	Thr	Ile	Thr	Leu
1				5				10					15		

ES 2 634 669 T3

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

ES 2 634 669 T3

[illegible]

<210> 75
<211> 420
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus (cepa MRSA252)

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 75

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

ES 2 634 669 T3

[illegible]

<210> 76
<211> 806
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus (cepa MRSA252)

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 76

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

ES 2 634 669 T3

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

Ile	Thr	Thr	Ser	Asp	Val	Asn	Ala	Gln	Glu	Thr	His	Ser	Val	Phe	Leu
610						615					620				
Glu	Ser	Asn	Asp	Thr	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	His	Phe	Leu	Asp	Lys
625					630					635					640
Pro	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Ser	His	Thr	Gly	Lys	Trp	Ser	Glu
				645						650					655
Ile	Asn	Lys	Ser	Gln	Lys	Lys	Asp	Asp	Lys	Lys	Asp	Glu	Tyr	Tyr	Glu
				660				665					670		
Val	Thr	Gln	Thr	His	Asn	Thr	Ser	Asp	Ser	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Val	Leu
		675					680					685			
Tyr	Pro	Gly	Leu	Ser	Lys	Ser	Asp	Phe	Lys	Ser	Lys	Asn	Asn	Asn	Val
	690					695					700				
Ser	Ile	Val	Lys	Gln	Asp	Glu	Asp	Phe	His	Val	Ile	Lys	Asp	Asn	Asp
705					710					715					720
Gly	Val	Phe	Ala	Gly	Val	Asn	Tyr	Ser	Asp	Asn	Thr	Lys	Ser	Phe	Asp
				725					730					735	
Ile	Asn	Gly	Ile	Thr	Val	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Gly	Met	Phe	Val	Ile
		740						745					750		
Lys	Lys	Lys	Asp	Asp	Lys	Ala	Tyr	Lys	Cys	Ser	Phe	Tyr	Asn	Pro	Glu
		755				760						765			
Thr	Thr	Asn	Thr	Ala	Ser	Asn	Ile	Glu	Ser	Lys	Ile	Phe	Ile	Lys	Gly
		770				775					780				
Tyr	Thr	Ile	Thr	Asn	Lys	Ser	Val	Ile	Asn	Ser	Asn	Asp	Ala	Gly	Val
785					790					795					800
Asn	Phe	Glu	Leu	Thr	Lys										
					805										

<210> 77
 <211> 815
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus (cepa MSSA476)

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 77

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

Glu Lys Lys Lys Tyr Thr Ala Pro Ile Lys Thr Phe Ala Pro Glu Ser
 210 215 220
 Asp Lys Ile Leu Ser Ser Val Gly Gln Pro Glu Gln Ala Lys Gly Gly
 225 230 235 240
 Asn Leu Val Asp Ile Ala Lys Val Lys Leu Leu Glu Ser Ile Ile Glu
 245 250 255
 Glu Asp Lys Asp Ile Thr Lys Asn Ser Ile Asp Ala Phe Asn Lys Val
 260 265 270
 Phe Thr Tyr Val Gln Ser Asn Ala Thr Gly Lys Glu Arg Asn Gly Phe
 275 280 285
 Tyr Lys Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Gln Asp Val Pro Tyr Thr Gly
 290 295 300
 Ala Tyr Gly Val Val Leu Leu Glu Gly Ile Ser Gln Met Met Pro Met
 305 310 315 320
 Ile Lys Glu Thr Pro Phe Asn Asp Lys Thr Gln Asn Asp Thr Thr Leu
 325 330 335
 Lys Ser Trp Ile Asp Asp Gly Phe Met Pro Leu Ile Tyr Lys Gly Glu
 340 345 350
 Met Met Asp Leu Ser Arg Gly Arg Ala Ile Ser Arg Glu Asn Glu Thr
 355 360 365
 Ser His Thr Ala Ser Ala Thr Val Met Lys Ser Leu Leu Arg Leu Ser
 370 375 380
 Asp Ala Met Asp Asp Ser Thr Lys Ala Lys Tyr Lys Gln Ile Val Lys
 385 390 395 400
 Thr Ser Val Lys Ser Asp Ser Ser Tyr Gly Gln Asn Asp Thr Leu Ser
 405 410 415
 Ser Tyr Ser Asp Ile Ser Lys Met Lys Ser Leu Met Glu Asp Ser Thr
 420 425 430
 Ile Ser Thr Asn Gly Leu Thr Gln Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Asp Met
 435 440 445
 Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Asp Leu Asp Phe Ala Phe Gly Leu
 450 455 460
 Ser Met Thr Ser Lys Asn Val Ala Arg Tyr Glu Ser Ile Asn Gly Glu
 465 470 475 480
 Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn
 485 490 495
 Ser Asp Val Lys His Tyr Arg Asp Asn Phe Trp Ala Thr Ala Asp Met
 500 505 510
 Lys Arg Leu Ala Gly Thr Thr Thr Leu Glu Asn Glu Glu Pro Lys Gly
 515 520 525
 Thr Asp Val Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly Gly Thr Lys Phe
 530 535 540
 Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys
 545 550 555 560
 Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val
 565 570 575
 Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro Val
 580 585 590
 Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Leu Tyr Thr Asp
 595 600 605
 Asp Lys Gln Thr Thr Ala Ser Asp Asn Gln Gly Thr Asn Ser Val Phe
 610 615 620
 Leu Glu Ser Thr Asn Lys Pro Lys Asn Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu
 625 630 635 640
 Asn Glu Ser Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp
 645 650 655
 Ser Asp Ile Asn Lys Ser Gln Lys Gln Asp Ser Lys Thr Asn Gln Tyr
 660 665 670
 Tyr Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Thr Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr
 675 680 685
 Val Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Asp Asp Phe Asn Thr Lys Lys Asp
 690 695 700
 Lys Val Thr Val Val Lys Gln Asp Asp Asp Phe His Val Val Lys Asp

ES 2 634 669 T3

705					710					715				720	
Asn	Glu	Ser	Val	Trp	Ala	Gly	Val	Asn	Tyr	Ser	Asp	Ser	Thr	Gln	Thr
					725					730				735	
Phe	Ile	Ile	Asn	Asn	Thr	Lys	Val	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Gly	Met	Phe
			740							745				750	
Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Asp	Lys	Thr	Tyr	Glu	Cys	Ser	Phe	Tyr	Asn
		755				760						765			
Pro	Glu	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Ser	Asp	Ile	Glu	Ser	Lys	Ile	Ser	Met
	770					775					780				
Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Asn	Lys	Asn	Thr	Ser	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser
	785					790					795				800
Gly	Val	Arg	Phe	Glu	Leu	Gln	Gln	Thr	Leu	Asn	Lys	Asp	Asp	Asn	
				805					810					815	

<210> 78
 <211> 807
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus (cepa NCTC 8325)

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 78

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

```

305                               310                               315                               320
Ile Lys Glu Thr Pro Phe Asn Asp Lys Thr Gln Asn Asp Thr Thr Leu
                               325                               330                               335
Lys Ser Trp Ile Asp Asp Gly Phe Met Pro Leu Ile Tyr Lys Gly Glu
                               340                               345                               350
Met Met Asp Leu Ser Arg Gly Arg Ala Ile Ser Arg Glu Asn Glu Thr
                               355                               360                               365
Ser His Ser Ala Ser Ala Thr Val Met Lys Ser Leu Leu Arg Leu Ser
                               370                               375                               380
Asp Ala Met Asp Asp Ser Thr Lys Ala Lys Tyr Lys Lys Ile Val Lys
385                               390                               395                               400
Ser Ser Val Glu Ser Asp Ser Ser Tyr Lys Gln Asn Asp Tyr Leu Asn
                               405                               410                               415
Ser Tyr Ser Asp Ile Asp Lys Met Lys Ser Leu Met Thr Asp Asn Ser
                               420                               425                               430
Ile Ser Lys Asn Gly Leu Thr Gln Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Asp Met
                               435                               440                               445
Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Asp Leu Asp Phe Ala Phe Gly Leu
450                               455                               460
Ser Met Thr Ser Lys Asn Val Ala Arg Tyr Glu Ser Ile Asn Gly Glu
465                               470                               475                               480
Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn
                               485                               490                               495
Ser Asp Val Lys His Tyr His Asp Asn Phe Trp Val Thr Ala Asp Met
                               500                               505                               510
Lys Arg Leu Ser Gly Thr Thr Thr Leu Asp Asn Glu Ile Leu Lys Asp
                               515                               520                               525
Thr Asp Asp Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly Gly Thr Lys Val
530                               535                               540
Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys
545                               550                               555                               560
Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val
                               565                               570                               575
Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro Val
                               580                               585                               590
Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Leu Tyr Thr Asp
                               595                               600                               605
Asp Lys Gln Thr Thr Asn Ser Asp Asn Gln Glu Asn Asn Ser Val Phe
610                               615                               620
Leu Glu Ser Thr Asp Thr Lys Lys Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu Asn
625                               630                               635                               640
Lys Pro Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp Lys
                               645                               650                               655
Glu Ile Asn Lys Ser Gln Lys Asp Thr Gln Lys Thr Asp Glu Tyr Tyr
660                               665                               670
Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Ser Asp Asn Lys Tyr Gly Tyr Val
675                               680                               685
Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Asp Val Phe Lys Thr Lys Lys Asp Glu
690                               695                               700
Val Thr Val Val Lys Gln Glu Asp Asp Phe His Val Val Lys Asp Asn
705                               710                               715                               720
Glu Ser Val Trp Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asn Ser Thr Gln Thr Phe
                               725                               730                               735
Asp Ile Asn Asn Thr Lys Val Glu Val Lys Ala Lys Gly Met Phe Ile
740                               745                               750
Leu Lys Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr Asn Pro
755                               760                               765
Glu Ser Thr Asn Ser Ala Ser Asp Ile Glu Ser Lys Ile Ser Met Thr
770                               775                               780
Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Lys Asn Thr Ser Thr Ser Asn Glu Ser Gly
785                               790                               795                               800
Val His Phe Glu Leu Thr Lys
                               805

```

<210> 79
 <211> 809
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus (cepa bovina RF122)

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 79

```

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

```

ES 2 634 669 T3

Ser Ser Tyr Ser Asp Ile Asp Lys Met Lys Ser Leu Met Thr Asp Ser
420 425 430
Thr Ile Ser Thr Asn Gly Leu Thr Gln Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Ala
435 440 445
Met Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Asp Leu Asp Phe Ala Phe Gly
450 455 460
Leu Ser Met Thr Ser Lys Asn Val Ala Arg Tyr Glu Asn Ile Asn Gly
465 470 475 480
Glu Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr
485 490 495
Asn Ser Asp Val Arg His Tyr Arg Asp Asn Phe Trp Ala Thr Ala Asp
500 505 510
Met Lys Arg Leu Ala Asp Thr Thr Thr Leu Glu Asn Glu Glu Pro Lys
515 520 525
Gly Thr Asp Val Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly Gly Thr Lys
530 535 540
Phe Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp
545 550 555 560
Lys Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile
565 570 575
Val Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Thr Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro
580 585 590
Val Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala His Gly Tyr Thr Leu Tyr Thr
595 600 605
Asp Asp Lys Gln Thr Thr Asn Ser Asn Asn Gln Glu Thr Asn Ser Val
610 615 620
Phe Leu Glu Ser Thr Asn Ser Thr Gln Asn Asn Ile Gly Tyr His Phe
625 630 635 640
Leu Asn Lys Ser Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys
645 650 655
Trp Ser Asp Ile Asn Lys Ser Gln Lys Asp Thr Gln Lys Thr Asp Glu
660 665 670
Tyr Tyr Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Thr Asp Asp Lys Tyr Ala
675 680 685
Tyr Val Leu Tyr Pro Gly Ile Thr Lys Asp Asn Phe Lys Ser Lys Ala
690 695 700
Ser Gln Val Thr Val Val Lys Gln Asp Asp Asp Phe His Val Val Lys
705 710 715 720
Asp Asn Glu Ser Val Trp Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asp Ser Thr Gln
725 730 735
Thr Phe Asp Ile Asn Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Ala Lys Gly Met
740 745 750
Phe Ile Leu Lys Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr
755 760 765
Asn Pro Glu Ser Thr Asn Ser Ala Ser Asp Ile Glu Ser Lys Ile Ser
770 775 780
Met Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Lys Asn Thr Ser Asn Thr Asn Glu
785 790 795 800
Ser Gly Val Arg Phe Glu Leu Thr Lys
805

<210> 80
<211> 807
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus (cepa bovina RF122)

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 80

Met Thr Tyr Lys Met Lys Lys Trp Gln Lys Leu Ser Thr Ile Thr Leu
1 5 10 15

ES 2 634 669 T3

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

ES 2 634 669 T3

```

          515          520          525
Asn Thr Lys Asn Asp Lys Ser Phe Val Gly Gly Thr Lys Leu Asn Asn
 530          535          540
Lys Tyr Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys Thr Leu
545          550          555
Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val Phe Ile
          565          570          575
Gly Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro Val Thr Ser
          580          585          590
Val Glu Asn Arg Lys Ala Asn Gly Tyr Lys Leu Phe Lys Gly Asp Ile
          595          600          605
Glu Ile Thr Thr Ser Asp Val Asn Ala Gln Glu Thr His Ser Val Phe
610          615          620
Leu Glu Ser Asn Asp Thr Lys Lys Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu Asp
625          630          635
Lys Pro Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp Ser
          645          650          655
Glu Ile Asn Lys Ser Gln Lys Thr Asp Asp Lys Lys Asp Glu Tyr Tyr
          660          665          670
Glu Val Thr Gln Thr His Asn Thr Ser Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Val
          675          680          685
Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Ser Asp Phe Lys Ser Lys Asn Asn Asn
690          695          700
Val Ser Ile Val Lys Gln Asp Glu Asp Phe His Val Ile Lys Asp Asn
705          710          715
Asp Gly Val Phe Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asp Ser Thr Lys Ser Phe
          725          730          735
Asp Ile Asn Gly Thr Ile Val Glu Leu Lys Glu Lys Gly Met Phe Val
          740          745          750
Ile Lys Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr Asn Pro
          755          760          765
Thr Ser Thr Asn Ser Thr Ser Asn Lys Glu Ser Lys Ile Ser Val Thr
          770          775          780
Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Gln Ser Val Ser Asn Phe Lys Glu Ser Asp
785          790          795          800
Ile His Phe Glu Leu Thr Lys
          805

```

<210> 81
 <211> 807
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus (cepa USA300)

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 81

```

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

```

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

ES 2 634 669 T3

```

Leu Glu Ser Thr Asp Thr Lys Lys Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu Asn
625          630          635          640
Lys Pro Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp Lys
          645          650          655
Glu Ile Asn Lys Ser Gln Lys Asp Thr Gln Lys Thr Asp Glu Tyr Tyr
          660          665          670
Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Ser Asp Asn Lys Tyr Gly Tyr Val
          675          680          685
Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Asp Val Phe Lys Thr Lys Lys Asp Glu
690          695          700
Val Thr Val Val Lys Gln Glu Asp Asp Phe His Val Val Lys Asp Asn
705          710          715          720
Glu Ser Val Trp Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asn Ser Thr Gln Thr Phe
          725          730          735
Asp Ile Asn Asn Thr Lys Val Glu Val Lys Ala Lys Gly Met Phe Ile
          740          745          750
Leu Lys Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr Asn Pro
          755          760          765
Glu Ser Thr Asn Ser Ala Ser Asp Ile Glu Ser Lys Ile Ser Met Thr
770          775          780
Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Lys Asn Thr Ser Thr Ser Asn Glu Ser Gly
785          790          795          800
Val His Phe Glu Leu Thr Lys
          805

```

<210> 82
 <211> 1066
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 82

```

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

```

Ile	Asp	Leu	Pro	Ile	Gly	Lys	Lys	His	Val	Phe	Ser	Leu	Ala	Asp	Tyr
225					230					235					240
Thr	Tyr	Lys	Val	Glu	Asn	Pro	Asp	Val	Ala	Ser	Val	Lys	Asn	Gly	Ile
				245						250					255
Leu	Glu	Pro	Leu	Lys	Glu	Gly	Thr	Thr	Asn	Val	Ile	Val	Ser	Lys	Asp
				260						265					270
Gly	Lys	Glu	Val	Lys	Lys	Ile	Pro	Leu	Lys	Ile	Leu	Ala	Ser	Val	Lys
				275						280					285
Asp	Ala	Tyr	Thr	Asp	Arg	Leu	Asp	Asp	Trp	Asn	Gly	Ile	Ile	Ala	Gly
				290											300
Asn	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Lys	Asn	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Leu	Asn	Gln
															320
Glu	Leu	Glu	Gly	Lys	Val	Ala	Asp	Ser	Leu	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Gln
				325											335
Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Leu	Trp	Glu	Lys	Phe	Ser	Asn	Tyr	Lys	Thr	Ser
				340											350
Ala	Asn	Leu	Thr	Ala	Thr	Tyr	Arg	Lys	Leu	Glu	Glu	Met	Ala	Lys	Gln
				355											365
Val	Thr	Asn	Pro	Ser	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Gln	Asp	Glu	Thr	Val	Val	Arg
															380
Thr	Val	Arg	Asp	Ser	Met	Glu	Trp	Met	His	Lys	His	Val	Tyr	Asn	Ser
															400
Glu	Lys	Ser	Ile	Val	Gly	Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly	Thr	Pro
				405											415
Arg	Ala	Ile	Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Leu	Met	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ser	Asp
				420											430
Glu	Glu	Ile	Lys	Lys	Tyr	Thr	Asp	Val	Ile	Glu	Lys	Phe	Val	Pro	Asp
				435											445
Pro	Glu	His	Phe	Arg	Lys	Thr	Thr	Asp	Asn	Pro	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly
															460
Gly	Asn	Leu	Val	Asp	Met	Gly	Arg	Val	Lys	Val	Ile	Ala	Gly	Leu	Leu
															480
Arg	Lys	Asp	Asp	Gln	Glu	Ile	Ser	Ser	Thr	Ile	Arg	Ser	Ile	Glu	Gln
				485											495
Val	Phe	Lys	Leu	Val	Asp	Gln	Gly	Glu	Gly	Phe	Tyr	Gln	Asp	Gly	Ser
				500											510
Tyr	Ile	Asp	His	Thr	Asn	Val	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	Val
				515											525
Leu	Ile	Asp	Gly	Leu	Ser	Gln	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Gln	Lys	Thr	Lys
															540
Asn	Pro	Ile	Asp	Lys	Asp	Lys	Met	Gln	Thr	Met	Tyr	His	Trp	Ile	Asp
															560
Lys	Ser	Phe	Ala	Pro	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Glu	Leu	Met	Asp	Met	Ser
				565											575
Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	Ala	Asn	Ser	Glu	Gly	His	Val	Ala	Ala
				580											590
Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gly	Ile	His	Arg	Ile	Ala	Asp	Met	Ser	Glu	Gly
				595											605
Glu	Thr	Lys	Gln	Cys	Leu	Gln	Ser	Leu	Val	Lys	Thr	Ile	Val	Gln	Ser
															620
Asp	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Val	Phe	Lys	Asn	Leu	Lys	Thr	Tyr	Lys	Asp	Ile
															640
Ser	Leu	Met	Gln	Ser	Leu	Leu	Ser	Asp	Ala	Gly	Val	Ala	Ser	Val	Pro
				645											655
Arg	Pro	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ala	Phe	Asn	Lys	Met	Asp	Lys	Thr	Ala	Met
				660											670
Tyr	Asn	Ala	Glu	Lys	Gly	Phe	Gly	Phe	Gly	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Ser
				675											685
Arg	Thr	Leu	Asn	Tyr	Glu	His	Met	Asn	Lys	Glu	Asn	Lys	Arg	Gly	Trp
															700
Tyr	Thr	Ser	Asp	Gly	Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Gly	Asp	Leu	Ser	His
															720
Tyr	Ser	Asp	Gly	Tyr	Trp	Pro	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Lys	Met	Pro	Gly

				725					730					735		
Thr	Thr	Glu	Thr	Asp	Ala	Lys	Arg	Ala	Asp	Ser	Asp	Thr	Gly	Lys	Val	
			740					745					750			
Leu	Pro	Ser	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	Ser	Lys	Leu	Asp	Asp	Ala	Asn	Ala	
			755					760				765				
Thr	Ala	Thr	Met	Asp	Phe	Thr	Asn	Trp	Asn	Gln	Thr	Leu	Thr	Ala	His	
			770				775				780					
Lys	Ser	Trp	Phe	Met	Leu	Lys	Asp	Lys	Ile	Ala	Phe	Leu	Gly	Ser	Asn	
785					790					795					800	
Ile	Gln	Asn	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Ala	Thr	Thr	Ile	Asp	Gln	Arg	
				805					810					815		
Lys	Leu	Glu	Ser	Gly	Asn	Pro	Tyr	Lys	Val	Tyr	Val	Asn	Asp	Lys	Glu	
			820					825					830			
Ala	Ser	Leu	Thr	Glu	Gln	Glu	Lys	Asp	Tyr	Pro	Glu	Thr	Gln	Ser	Val	
			835				840					845				
Phe	Leu	Glu	Ser	Phe	Asp	Ser	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	Phe	Phe	Phe	
			850			855					860					
Lys	Lys	Ser	Ser	Ile	Ser	Met	Ser	Lys	Ala	Leu	Gln	Lys	Gly	Ala	Trp	
865					870					875					880	
Lys	Asp	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Ser	Asp	Lys	Glu	Val	Glu	Asn	Glu	Phe	
				885					890					895		
Leu	Thr	Ile	Ser	Gln	Ala	His	Lys	Gln	Asn	Arg	Asp	Ser	Tyr	Gly	Tyr	
			900					905					910			
Met	Leu	Ile	Pro	Asn	Val	Asp	Arg	Ala	Thr	Phe	Asn	Gln	Met	Ile	Lys	
			915				920					925				
Glu	Leu	Glu	Ser	Ser	Leu	Ile	Glu	Asn	Asn	Glu	Thr	Leu	Gln	Ser	Val	
			930			935					940					
Tyr	Asp	Ala	Lys	Gln	Gly	Val	Trp	Gly	Ile	Val	Lys	Tyr	Asp	Asp	Ser	
945					950					955					960	
Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Asn	Gln	Phe	Gln	Val	Leu	Lys	Arg	Gly	Val	Tyr	
				965					970					975		
Thr	Ile	Arg	Lys	Glu	Gly	Asp	Glu	Tyr	Lys	Ile	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Pro	
			980					985					990			
Glu	Thr	Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Asp	Gln	Glu	Val	Phe	Lys	Lys	Leu	Glu	
			995				1000					1005				
Gln	Ala	Ala	Gln	Pro	Gln	Val	Gln	Asn	Ser	Lys	Glu	Lys	Glu	Lys	Ser	
			1010			1015					1020					
Glu	Glu	Glu	Lys	Asn	His	Ser	Asp	Gln	Lys	Asn	Leu	Pro	Gln	Thr	Gly	
1025					1030					1035					1040	
Glu	Gly	Gln	Ser	Ile	Leu	Ala	Ser	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	
				1045					1050						1055	
Phe	Tyr	Leu	Phe	Arg	Arg	Gly	Lys	Asn	Asn							
			1060				</									

```
<210> 83
<211> 1078
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae (cepa ATCC BAA-255/R6)
```

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 83

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

65					70					75				80
Pro	Trp	Thr	Gly	Ser	Lys	Ala	Gln	Gly	Trp	Ser	Ala	Trp	Val	Asp
				85					90					95
Lys	Asn	Ser	Ser	Ala	Asp	Ala	Ser	Thr	Arg	Val	Ile	Glu	Ala	Lys
			100					105					110	Asp
Gly	Ala	Ile	Thr	Ile	Ser	Ser	Pro	Glu	Lys	Leu	Arg	Ala	Ala	Val
		115					120					125		His
Arg	Met	Val	Pro	Ile	Glu	Ala	Lys	Lys	Lys	Tyr	Lys	Leu	Arg	Phe
	130					135						140		Lys
Ile	Lys	Thr	Asp	Asn	Lys	Val	Gly	Ile	Ala	Lys	Val	Arg	Ile	Ile
	145				150					155				Glu
Glu	Ser	Gly	Lys	Asp	Lys	Arg	Leu	Trp	Asn	Ser	Ala	Thr	Thr	Ser
			165					170						Gly
Thr	Lys	Asp	Trp	Gln	Thr	Ile	Glu	Ala	Asp	Tyr	Ser	Pro	Thr	Leu
		180						185					190	Asp
Val	Asp	Lys	Ile	Lys	Leu	Glu	Leu	Phe	Tyr	Glu	Thr	Gly	Thr	Gly
		195					200					205		Thr
Val	Ser	Phe	Lys	Asp	Ile	Glu	Leu	Val	Glu	Val	Ala	Asp	Gln	Pro
	210					215					220			Ser
Glu	Asp	Ser	Gln	Thr	Asp	Lys	Gln	Leu	Glu	Glu	Lys	Ile	Asp	Leu
	225				230				235					Pro
Ile	Gly	Lys	Lys	His	Val	Phe	Ser	Leu	Ala	Asp	Tyr	Thr	Tyr	Lys
			245						250					Val
Glu	Asn	Pro	Asp	Val	Ala	Ser	Val	Lys	Asn	Gly	Ile	Leu	Glu	Pro
		260						265				270		Leu
Lys	Glu	Gly	Thr	Thr	Asn	Val	Ile	Val	Ser	Lys	Asp	Gly	Lys	Glu
	275						280					285		Val
Lys	Lys	Ile	Pro	Leu	Lys	Ile	Leu	Ala	Ser	Val	Lys	Asp	Thr	Tyr
	290					295					300			Thr
Asp	Arg	Leu	Asp	Asp	Trp	Asn	Gly	Ile	Ile	Ala	Gly	Asn	Gln	Tyr
	305				310					315				Tyr
Asp	Ser	Lys	Asn	Gln	Met	Ala	Lys	Leu	Asn	Gln	Glu	Leu	Glu	Gly
			325					330						Gly
Lys	Val	Ala	Asp	Ser	Leu	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Gln	Ala	Asp	Arg
		340						345				350		Ile
Tyr	Leu	Trp	Glu	Lys	Phe	Ser	Asn	Tyr	Lys	Thr	Ser	Ala	Asn	Leu
	355					360						365		Thr
Ala	Thr	Tyr	Arg	Lys	Leu	Glu	Glu	Met	Ala	Lys	Gln	Val	Thr	Asn
	370					375					380			Pro
Ser	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Gln	Asp	Glu	Thr	Val	Val	Arg	Thr	Val	Arg
	385				390				395					Asp
Ser	Met	Glu	Trp	Met	His	Lys	His	Val	Tyr	Asn	Ser	Glu	Lys	Ser
		405							410					Ile
Val	Gly	Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly	Thr	Pro	Arg	Ala	Ile
		420						425					430	Asn
Asn	Thr	Leu	Ser	Leu	Met	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ser	Asp	Glu	Glu	Ile
	435						440				445			Lys
Lys	Tyr	Thr	Asp	Val	Ile	Glu	Lys	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Glu	His
	450					455					460			Phe
Arg	Lys	Thr	Thr	Asp	Asn	Pro	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly	Gly	Asn	Leu
	465				470				475					Val
Asp	Met	Gly	Arg	Val	Lys	Val	Ile	Ala	Gly	Leu	Leu	Arg	Lys	Asp
			485						490					Asp
Gln	Glu	Ile	Ser	Ser	Thr	Ile	Arg	Ser	Ile	Glu	Gln	Val	Phe	Lys
		500						505					510	Leu
Val	Asp	Gln	Gly	Glu	Gly	Phe	Tyr	Gln	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ile	Asp
		515					520					525		His
Thr	Asn	Val	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Asp
	530					535					540			Gly
Leu	Ser	Gln	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Gln	Lys	Thr	Lys	Asn	Pro	Ile
	545				550				555					Asp
Lys	Asp	Lys	Met	Gln	Thr	Met	Tyr	His	Trp	Ile	Asp	Lys	Ser	Phe
				565					570					Ala
														575

```

Pro Leu Leu Val Asn Gly Glu Leu Met Asp Met Ser Arg Gly Arg Ser
      580                               585                               590
Ile Ser Arg Ala Asn Ser Glu Gly His Val Ala Ala Val Glu Val Leu
      595                               600                               605
Arg Gly Ile His Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu Gly Glu Thr Lys Gln
      610                               615                               620
Arg Leu Gln Ser Leu Val Lys Thr Ile Val Gln Ser Asp Ser Tyr Tyr
      625                               630                               635                               640
Asp Val Phe Lys Asn Leu Lys Thr Tyr Lys Asp Ile Ser Leu Met Gln
      645                               650                               655
Ser Leu Leu Ser Asp Ala Gly Val Ala Ser Val Pro Arg Thr Ser Tyr
      660                               665                               670
Leu Ser Ala Phe Asn Lys Met Asp Lys Thr Ala Met Tyr Asn Ala Glu
      675                               680                               685
Lys Gly Phe Gly Phe Gly Leu Ser Leu Phe Ser Ser Arg Thr Leu Asn
      690                               695                               700
Tyr Glu His Met Asn Lys Glu Asn Lys Arg Gly Trp Tyr Thr Ser Asp
      705                               710                               715                               720
Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Gly Asp Leu Ser His Tyr Ser Asp Gly
      725                               730                               735
Tyr Trp Pro Thr Val Asn Pro Tyr Lys Met Pro Gly Thr Thr Glu Thr
      740                               745                               750
Asp Ala Lys Arg Ala Asp Ser Asp Thr Gly Lys Val Leu Pro Ser Ala
      755                               760                               765
Phe Val Gly Thr Ser Lys Leu Asp Asp Ala Asn Ala Thr Ala Thr Met
      770                               775                               780
Asp Phe Thr Asn Trp Asn Gln Thr Leu Thr Ala His Lys Ser Trp Phe
      785                               790                               795                               800
Met Leu Lys Asp Lys Ile Ala Phe Leu Gly Ser Asn Ile Gln Asn Thr
      805                               810                               815
Ser Thr Asp Thr Ala Ala Thr Thr Ile Asp Gln Arg Lys Leu Glu Ser
      820                               825                               830
Ser Asn Pro Tyr Lys Val Tyr Val Asn Asp Lys Glu Ala Ser Leu Thr
      835                               840                               845
Glu Gln Glu Lys Asp Tyr Pro Glu Thr Gln Ser Val Phe Leu Glu Ser
      850                               855                               860
Ser Asp Ser Lys Lys Asn Ile Gly Tyr Phe Phe Phe Lys Lys Ser Ser
      865                               870                               875                               880
Ile Ser Met Ser Lys Ala Leu Gln Lys Gly Ala Trp Lys Asp Ile Asn
      885                               890                               895
Glu Gly Gln Ser Asp Lys Glu Val Glu Asn Glu Phe Leu Thr Ile Ser
      900                               905                               910
Gln Ala His Lys Gln Asn Gly Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Leu Ile Pro
      915                               920                               925
Asn Val Asp Arg Ala Thr Phe Asn Gln Met Ile Lys Glu Leu Glu Ser
      930                               935                               940
Ser Leu Ile Glu Asn Asn Glu Thr Leu Gln Ser Val Tyr Asp Ala Lys
      945                               950                               955                               960
Gln Gly Val Trp Gly Ile Val Lys Tyr Asp Asp Ser Val Ser Thr Ile
      965                               970                               975
Ser Asn Gln Phe Gln Val Leu Lys Arg Gly Val Tyr Thr Ile Arg Lys
      980                               985                               990
Glu Gly Asp Glu Tyr Lys Ile Ala Tyr Tyr Asn Pro Glu Thr Gln Glu
      995                               1000                               1005
Ser Ala Pro Asp Gln Glu Val Phe Lys Lys Leu Glu Gln Ala Ala Gln
      1010                               1015                               1020
Pro Gln Val Gln Asn Ser Lys Glu Lys Glu Lys Ser Glu Glu Glu Lys
      1025                               1030                               1035                               1040
Asn His Ser Asp Gln Lys Asn Leu Pro Gln Thr Gly Glu Gly Gln Ser
      1045                               1050                               1055
Ile Leu Ala Ser Leu Gly Phe Leu Leu Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Phe
      1060                               1065                               1070
Arg Arg Gly Lys Asn Asn

```

1075

5

<210> 84
 <211> 1067
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae serotipo 2 (cepa D39/N)

<220>

<223> Hialuronano liasa

<400> 84

5

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

Pro	Arg	Ala	405				Leu	Ser	410				Tyr	415		
			Ile	Asn	Asn	Thr			Leu	Met	Lys	Glu		Phe	Ser	
Asp	Glu	Glu	420	Lys	Lys	Tyr	Thr	Asp	Val	Ile	Glu	Lys	Phe	Val	Pro	
			Ile													435
Asp	Pro	Glu	His	Phe	Arg	Lys	Thr	Thr	Asp	Asn	Pro	Phe	Lys	Ala	Leu	
																450
Gly	Gly	Asn	Leu	Val	Asp	Met	Gly	Arg	Val	Lys	Val	Ile	Ala	Gly	Leu	
																470
Leu	Arg	Lys	Asp	Asp	Gln	Glu	Ile	Ser	Ser	Thr	Ile	Arg	Ser	Ile	Glu	
																485
Gln	Val	Phe	Lys	Leu	Val	Asp	Gln	Gly	Glu	Gly	Phe	Tyr	Gln	Asp	Gly	
																505
Ser	Tyr	Ile	Asp	His	Thr	Asn	Val	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	
																515
Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Leu	Ser	Gln	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Gln	Lys	Thr	
																530
Lys	Asn	Pro	Ile	Asp	Lys	Asp	Lys	Met	Gln	Thr	Met	Tyr	His	Trp	Ile	
																550
Asp	Lys	Ser	Phe	Ala	Pro	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Glu	Leu	Met	Asp	Met	
																565
Ser	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	Ala	Asn	Ser	Glu	Gly	His	Val	Ala	
																585
Ala	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gly	Ile	His	Arg	Ile	Ala	Asp	Met	Ser	Glu	
																595
Gly	Glu	Thr	Lys	Gln	Arg	Leu	Gln	Ser	Leu	Val	Lys	Thr	Ile	Val	Gln	
																610
Ser	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Val	Phe	Lys	Asn	Leu	Lys	Thr	Tyr	Lys	Asp	
																630
Ile	Ser	Leu	Met	Gln	Ser	Leu	Leu	Ser	Asp	Ala	Gly	Val	Ala	Ser	Val	
																645
Pro	Arg	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ala	Phe	Asn	Lys	Met	Asp	Lys	Thr	Ala	
																660
Met	Tyr	Asn	Ala	Glu	Lys	Gly	Phe	Gly	Phe	Gly	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	
																680
Ser	Arg	Thr	Leu	Asn	Tyr	Glu	His	Met	Asn	Lys	Glu	Asn	Lys	Arg	Gly	
																695
Trp	Tyr	Thr	Ser	Asp	Gly	Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Gly	Asp	Leu	Ser	
																715
His	Tyr	Ser	Asp	Gly	Tyr	Trp	Pro	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Lys	Met	Pro	
																735
Gly	Thr	Thr	Glu	Thr	Asp	Ala	Lys	Arg	Ala	Asp	Ser	Asp	Thr	Gly	Lys	
																755
Val	Leu	Pro	Ser	Ala</												

ES 2 634 669 T3

```

Tyr Met Leu Ile Pro Asn Val Asp Arg Ala Thr Phe Asn Gln Met Ile
      915                      920          925
Lys Glu Leu Glu Ser Ser Leu Ile Glu Asn Asn Glu Thr Leu Gln Ser
      930                      935          940
Val Tyr Asp Ala Lys Gln Gly Val Trp Gly Ile Val Lys Tyr Asp Asp
      945                      950          955          960
Ser Val Ser Thr Ile Ser Asn Gln Phe Gln Val Leu Lys Arg Gly Val
      965                      970          975
Tyr Thr Ile Arg Lys Glu Gly Asp Glu Tyr Lys Ile Ala Tyr Tyr Asn
      980                      985          990
Pro Glu Thr Gln Glu Ser Ala Pro Asp Gln Glu Val Phe Lys Lys Leu
      995                      1000          1005
Glu Gln Ala Ala Gln Pro Gln Val Gln Asn Ser Lys Glu Lys Glu Lys
      1010                      1015          1020
Ser Glu Glu Glu Lys Asn His Ser Asp Gln Lys Asn Leu Pro Gln Thr
      1025                      1030          1035          1040
Gly Glu Gly Gln Ser Ile Leu Ala Ser Leu Gly Phe Leu Leu Leu Gly
      1045                      1050          1055
Ala Phe Tyr Leu Phe Arg Arg Gly Lys Asn Asn
      1060                      1065

```

<210> 85

<211> 805

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotipo M1

<220>

<223> Hialuronano liasa

<400> 85

```

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

```


Asn	Leu	Ile	Asp	Met	Gly	Arg	Val	Lys	Leu	Ile	Ser	Gly	Ile	Leu	Arg
			260					265					270		
Lys	Asp	Asp	Leu	Glu	Ile	Ser	Asp	Thr	Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Lys	Val
		275					280					285			
Phe	Thr	Leu	Val	Asp	Glu	Gly	Asn	Gly	Phe	Tyr	Gln	Asp	Gly	Ser	Leu
	290				295						300				
Ile	Asp	His	Val	Val	Thr	Asn	Ala	Gln	Ser	Pro	Leu	Tyr	Lys	Lys	Gly
	305				310					315					320
Ile	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Leu	Ser
				325					330					335	
Gln	Leu	Ile	Pro	Ile	Ile	Gln	Lys	Thr	Lys	Ser	Pro	Ile	Lys	Ala	Asp
			340					345					350		
Lys	Met	Ala	Thr	Ile	Tyr	His	Trp	Ile	Asn	His	Ser	Phe	Phe	Pro	Ile
		355					360					365			
Ile	Val	Arg	Gly	Glu	Met	Met	Asp	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser
	370				375						380				
Arg	Phe	Asn	Ala	Gln	Ser	His	Val	Ala	Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala
	385				390					395					400
Ile	Leu	Arg	Ile	Ala	Asp	Met	Ser	Glu	Glu	Pro	His	Arg	Leu	Ala	Leu
			405						410				415		
Lys	Thr	Arg	Ile	Lys	Thr	Leu	Val	Thr	Gln	Gly	Asn	Ala	Phe	Tyr	Asn
		420						425					430		
Val	Tyr	Asp	Asn	Leu	Lys	Thr	Tyr	His	Asp	Ile	Lys	Leu	Met	Lys	Glu
		435				440						445			
Leu	Leu	Ser	Asp	Thr	Ser	Val	Pro	Val	Gln	Lys	Leu	Asp	Ser	Tyr	Val
	450				455						460				
Ala	Ser	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Lys	Leu	Ala	Leu	Tyr	Asn	Asn	Lys	His
	465				470					475					480
Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu	Ser	Met	Phe	Ser	Asn	Arg	Thr	Gln	Asn	Tyr
			485						490				495		
Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	His	Gly	Trp	Phe	Thr	Ser	Asp	Gly
			500					505				510			
Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asn	Asp	Leu	Gly	His	Tyr	Ser	Glu	Asn	Tyr
	515					520						525			
Trp	Ala	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Arg	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Glu	Thr	Glu
	530				535							540			
Gln	Lys	Pro	Leu	Glu	Gly	Thr	Pro	Glu	Asn	Ile	Lys	Thr	Asn	Tyr	Gln
	545				550					555					560
Gln	Val	Gly	Met	Thr	Gly	Leu	Ser	Asp	Asp	Ala	Phe	Val	Ala	Ser	Lys
			565						570					575	
Lys	Leu	Asn	Asn	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Met	Thr	Phe	Thr	Asn	Trp
		580					585					590			
Asn	Lys	Ser	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Gly	Trp	Phe	Ile	Leu	Gly	Asn	Lys
		595				600						605			
Ile	Ile	Phe	Val	Gly	Ser	Asn	Ile	Lys	Asn	Gln	Ser	Ser	His	Lys	Ala
	610				615					620					
Tyr	Thr	Thr	Ile	Glu	Gln	Arg	Lys	Glu	Asn	Gln	Lys	Tyr	Pro	Tyr	Cys
	625				630				635						640
Ser	Tyr	Val	Asn	Asn	Gln	Pro	Val	Asp	Leu	Asn	Asn	Gln	Leu	Val	Asp
			645					650					655		
Phe	Thr	Asn	Thr	Lys	Ser	Ile	Phe	Leu	Glu	Ser	Asp	Asp	Pro	Ala	Gln
		660						665					670		
Asn	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Lys	Pro	Thr	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys
		675					680					685			
Ala	Leu	Gln	Thr	Gly	Lys	Trp	Gln	Asn	Ile	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Ser
	690				695						700				
Pro	Glu	Ala	Ile	Lys	Glu	Val	Ser	Asn	Thr	Phe	Ile	Thr	Ile	Met	Gln
	705				710					715					720
Asn	His	Thr	Gln	Asp	Gly	Asp	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Met	Met	Leu	Pro	Asn
			725					730					735		
Met	Thr	Arg	Gln	Glu	Phe	Glu	Thr	Tyr	Ile	Ser	Lys	Leu	Asp	Ile	Asp
			740					745					750		
Leu	Leu	Glu	Asn	Asn	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Val	Tyr	Asp	His	Asp	Ser
			755					760					765		
Gln	Gln	Met	His	Val	Ile	His	Tyr	Gly	Lys	Lys	Ala	Thr	Met	Phe	Ser
		770				775					780				
Asn	His	Asn	Leu	Ser	His	Gln	Gly	Phe	Tyr	Ser	Phe	Pro	His	Pro	Val
	785				790					795					800
Arg	Gln	Asn	Gln	Gln											
					805										

<211> 780
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyogenes serotipo M2 (cepa MGAS10)

5

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 86

```

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

10

ES 2 634 669 T3

Lys	Ser	Pro	Ile	Glu	Ala	Asp	Lys	Met	Ala	Thr	Ile	Tyr	His	Trp	Ile
	370					375					380				
Asn	His	Ser	Phe	Phe	Pro	Ile	Ile	Val	Arg	Gly	Glu	Met	Met	Asp	Met
385					390					395					400
Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	Phe	Asn	Ala	Gln	Ser	His	Val	Ala
				405					410					415	
Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Ile	Leu	Arg	Ile	Ala	Asp	Met	Ser	Glu
			420					425					430		
Glu	Pro	His	Arg	Leu	Glu	Leu	Lys	Thr	Arg	Ile	Lys	Thr	Leu	Val	Thr
		435					440					445			
Gln	Gly	Asn	Ala	Phe	Tyr	Asn	Val	Tyr	Asp	Asn	Leu	Lys	Thr	Tyr	His
	450					455					460				
Asp	Ile	Lys	Leu	Met	Lys	Glu	Leu	Leu	Ser	Asp	Thr	Ser	Val	Pro	Val
465					470					475				480	
Gln	Lys	Leu	Asp	Ser	Tyr	Val	Ala	Ser	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Lys	Leu
				485					490					495	
Ala	Leu	Tyr	Asn	Asn	Lys	His	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu	Ser	Met	Phe
			500					505					510		
Ser	Asn	Arg	Thr	Gln	Asn	Tyr	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	His
	515						520					525			
Gly	Trp	Phe	Thr	Ser	Asp	Gly	Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asn	Asp	Leu
	530					535					540				
Gly	His	Tyr	Ser	Glu	Asn	Tyr	Trp	Ala	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Arg	Leu
545					550					555				560	
Pro	Gly	Thr	Thr	Glu	Thr	Glu	Gln	Lys	Pro	Leu	Glu	Gly	Thr	Pro	Glu
				565					570					575	
Asn	Ile	Lys	Thr	Asn	Tyr	Gln	Gln	Val	Gly	Met	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp
			580					585					590		
Asp	Ala	Phe	Val	Ala	Ser	Lys	Lys	Leu	Asn	Asn	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala
	595						600					605			
Ala	Met	Thr	Phe	Thr	Asn	Trp	Asn	Lys	Ser	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Gly
	610					615					620				
Trp	Phe	Ile	Leu	Gly	Asn	Lys	Ile	Ile	Phe	Val	Gly	Ser	Asn	Ile	Lys
625					630					635				640	
Asn	Gln	Ser	Ser	His	Lys	Ala	Tyr	Thr	Thr	Ile	Glu	Gln	Arg	Lys	Glu
				645					650					655	
Asn	Gln	Lys	His	Pro	Tyr	Cys	Ser	Tyr	Val	Asn	Asn	Gln	Pro	Val	Asp
			660					665					670		
Leu	Asn	Asn	Gln	Leu	Val	Asp	Phe	Thr	Asn	Thr	Lys	Ser	Ile	Phe	Leu
	675						680					685			
Glu	Ser	Asp	Asp	Pro	Ala	Gln	Asn	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Lys	Pro
	690					695					700				
Arg	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	Leu	Gln	Thr	Gly	Lys	Trp	Gln	Asn
705															

<210> 87
<211> 868
<212> PRT
<213> Streptococcus pyogenes serotipo M4 (cepa MGAS10)

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 87

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

Glu Ala Met Asn Asn Glu Asn Leu His Gly Trp Phe Thr Ser Asp Gly
500 505 510
Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Asn Asp Leu Gly His Tyr Ser Glu Asn Tyr
515 520 525
Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu Pro Gly Thr Thr Glu Thr Glu
530 535 540
Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu Asn Ile Lys Thr Asn Tyr Gln
545 550 555 560
Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp Asp Ala Phe Val Ala Ser Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala Ala Met Thr Phe Thr Asn Trp
580 585 590
Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly Trp Phe Ile Leu Gly Asn Lys
595 600 605
Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys Asn Gln Ser Ser His Lys Ala
610 615 620
Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu Asn Gln Lys His Pro Tyr Cys
625 630 635 640
Ser Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp Leu Asn Asn Gln Leu Val Asp
645 650 655
Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu Glu Ser Asp Asp Pro Ala Gln
660 665 670
Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro Thr Thr Leu Ser Ile Ser Lys
675 680 685
Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn Ile Lys Ala Asp Asp Lys Ser
690 695 700
Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn Thr Phe Ile Thr Ile Met Gln
705 710 715 720
Asn His Thr Gln Asp Gly Asp Arg Tyr Ala Tyr Met Met Leu Pro Asn
725 730 735
Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr Ile Ser Lys Leu Asp Ile Asp
740 745 750
Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala Ala Val Tyr Asp His Asp Ser
755 760 765
Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Glu Lys Lys Ala Thr Thr Phe Ser
770 775 780
Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe Tyr Ser Phe Pro His Pro Val
785 790 795 800
Lys Gln Asn Gln Gln Gln Lys Leu Ala His Gln Gly Ile Ala Ala Lys
805 810 815
Asn Asn Ala Leu Asn Ser His Lys Ile Pro His Lys Arg Gln Arg Arg
820 825 830
Leu Pro Arg Thr Gly Tyr Gln Ser Ser Ser Leu Glu Phe Leu Gly Gly
835 840 845
Ala Leu Val Ala Ser Phe Asn His Ile Thr Lys Pro Phe Arg Lys Lys
850 855 860
Asp Leu Arg Ile
865

<210> 88
<211> 828
5 <212> PRT
<213> Streptococcus pyogenes serotipo M6

<220>
10 <223> Hialuronano liasa

<400> 88

Met Val Tyr Phe Tyr Leu Val Asp Gln Phe Thr Phe Ile Ile Ser Phe
1 5 10 15
Leu Tyr Trp Arg Asn Leu Ser Val Asn Thr Tyr Phe Cys Thr His His
20 25 30

Lys	Gln	Leu	Leu	Leu	Tyr	Ser	Asn	Leu	Phe	Leu	Ser	Phe	Ala	Met	Met
		35					40					45			
Gly	Gln	Gly	Thr	Ala	Ile	Tyr	Ala	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	Asn	Ser	Glu
	50					55					60				
Pro	Asn	Asn	Thr	Tyr	Phe	Gln	Thr	Gln	Thr	Leu	Thr	Thr	Thr	Asp	Ser
65					70					75					80
Glu	Lys	Lys	Val	Val	Gln	Pro	Gln	Gln	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Glu	Leu
				85					90					95	
Leu	Asp	Gln	Trp	Asn	Ser	Ile	Ile	Ala	Gly	Asn	Asp	Ala	Tyr	Asp	Lys
		100						105					110		
Thr	Asn	Pro	Asp	Met	Val	Thr	Phe	His	Asn	Lys	Ala	Glu	Lys	Asp	Ala
		115					120					125			
Gln	Asn	Ile	Ile	Lys	Ser	Tyr	Gln	Gly	Pro	Asp	His	Glu	Asn	Arg	Thr
	130					135					140				
Tyr	Leu	Trp	Glu	His	Ala	Lys	Asp	Tyr	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn	Ile	Thr
145					150					155					160
Lys	Thr	Tyr	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ala	Lys	Gln	Ile	Thr	Asn	Pro
				165					170					175	
Glu	Ser	Cys	Tyr	Tyr	Gln	Asp	Ser	Lys	Ala	Ile	Ala	Ile	Val	Lys	Asp
			180					185					190		
Gly	Met	Ala	Phe	Met	Tyr	Glu	His	Ala	Tyr	Asn	Leu	Asp	Arg	Glu	Asn
		195					200					205			
His	Gln	Thr	Thr	Gly	Lys	Glu	Asn	Lys	Glu	Asn	Trp	Trp	Val	Tyr	Glu
	210					215					220				
Ile	Gly	Thr	Pro	Arg	Ala	Ile	Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Leu	Met	Tyr	Pro
225					230					235					240
Tyr	Phe	Thr	Gln	Glu	Glu	Ile	Leu	Lys	Tyr	Thr	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
				245					250					255	
Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Arg	Phe	Arg	Val	Arg	Ala	Ala	Asn	Phe	Ser
			260					265				270			
Pro	Phe	Glu	Ala	Asn	Ser	Gly	Asn	Leu	Ile	Asp	Met	Gly	Arg	Val	Lys
		275					280					285			
Leu	Ile	Ser	Gly	Ile	Leu	Arg	Lys	Asp	Asp	Leu	Glu	Ile	Ser	Asp	Thr
	290					295					300				
Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Lys	Val	Phe	Thr	Leu	Val	Asp	Glu	Gly	Asn	Gly
305					310					315					320
Phe	Tyr	Gln	Asp	Gly	Ser	Leu	Ile	Asp	His	Val	Val	Thr	Asn	Ala	Gln
				325					330					335	
Ser	Pro	Leu	Tyr	Lys	Lys	Gly	Ile	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn
			340					345					350		
Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Leu	Ser	Gln	Leu	Ile	Pro	Ile	Ile	Gln	Lys	Thr
		355					360					365			
Lys	Ser	Pro	Ile	Glu	Ala	Asp	Lys	Met	Ala	Thr	Ile	Tyr	His	Trp	Ile
	370					375						380			
Asn	His	Ser	Phe	Phe	Pro	Ile	Ile	Val	Arg	Gly	Glu	Met	Met	Asp	Met
385					390					395					400
Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	Phe	Asn	Ala	Gln	Ser	His	Val	Ala
				405					410					415	
Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Ile	Leu	Arg	Ile	Ala	Asp	Met	Ser	Glu
			420					425					430		
Glu	Pro	His	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Thr	Arg	Ile	Lys	Thr	Leu	Val	Thr
		435					440					445			
Gln	Gly	Asn	Ala	Phe	Tyr	Asn	Val	Tyr	Asp	Asn	Leu	Lys	Thr	Tyr	His
	450					455					460				
Asp	Ile	Lys	Leu	Met	Lys	Glu	Leu	Leu	Ser	Asp	Thr	Phe	Val	Pro	Val
465					470					475					480
Gln	Lys	Leu	Asp	Ser	Tyr	Val	Ala	Ser	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Lys	Leu
				485					490					495	
Ala	Leu	Tyr	Asn	Asn	Lys	His	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu	Ser	Met	Phe
			500					505					510		
Ser	Asn	Arg	Thr	Gln	Asn	Tyr	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	His
		515					520					525			
Gly	Trp	Phe	Thr	Ser	Asp	Gly	Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asn	Asp	Leu

530	535	540
Gly His Tyr Ser Glu Asn Tyr Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu		
545	550	555
Pro Gly Thr Thr Glu Thr Glu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu		560
	565	570
Asn Ile Lys Thr Asp Tyr Gln Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp		575
	580	585
Asp Ala Phe Val Ala Ser Lys Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala		590
	595	600
Ala Met Thr Phe Thr Asn Trp Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly		605
	610	615
Trp Phe Ile Leu Gly Asn Lys Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys		620
625	630	635
Asn Gln Ser Ser His Lys Ala Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu		640
	645	650
Asn Gln Lys His Pro Tyr Cys Ser Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp		655
	660	665
Leu Asn Asn Gln Leu Val Asp Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu		670
	675	680
Glu Ser Asp Asp Pro Ala Gln Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro		685
	690	695
Thr Thr Leu Ser Ile Ser Lys Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn		700
705	710	715
Ile Lys Ala Asp Asp Lys Ser Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn		720
	725	730
Thr Phe Ile Thr Ile Met Gln Asn His Thr Gln Asp Gly Asp Arg Tyr		735
	740	745
Ala Tyr Met Met Leu Pro Asn Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr		750
	755	760
Ile Ser Lys Leu Asp Ile Asp Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala		765
	770	775
Ala Val Tyr Asp His Asp Ser Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Glu		780
785	790	795
Lys Lys Ala Thr Met Phe Ser Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe		800
	805	810
Tyr Ser Phe Pro His Pro Val Lys Gln Asn Gln Gln		815
	820	825

<210> 89
 <211> 556
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyogenes serotipo M12 (cepa MGAS2)

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 89

Met Val Tyr Phe Tyr Leu Val Asn Gln Ser Thr Phe Ile Ile Ser Phe	
1	5
Leu Tyr Trp Arg Asn Leu Ser Val Asn Thr Tyr Phe Cys Thr His His	
	20
Lys Gln Leu Leu Leu Tyr Ser Asn Leu Phe Leu Ser Phe Ala Met Met	
	35
Gly Gln Gly Thr Ala Ile Tyr Ala Asp Thr Leu Thr Thr Thr Asp Ser	
	50
Pro Asn Asn Thr Tyr Phe Gln Thr Gln Thr Leu Thr Thr Thr Asp Ser	
65	70
Glu Lys Lys Val Val Gln Pro Gln Gln Lys Asp Tyr Tyr Thr Glu Leu	
	85
Leu Asp Gln Trp Asn Ser Ile Ile Ala Gly Asn Asp Ala Tyr Asp Lys	
	100
Thr Asn Pro Asp Met Val Thr Phe His Asn Lys Ala Glu Lys Asp Ala	
	105
	110

ES 2 634 669 T3

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

<210> 90
<211> 635
<212> PRT
<213> Streptococcus pyogenes serotipo M12 (cepa MGAS2)

<220>
<223> Hialuronano liasa

$\langle 400 \rangle$ 90

ES 2 634 669 T3

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

Asn	Asn	Gln	Leu	Val	Asp	Phe	Thr	Asn	Thr	Lys	Ser	Ile	Phe	Leu	Glu
				485					490					495	
Ser	Asp	Asp	Pro	Ala	Gln	Asn	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Lys	Pro	Thr
			500					505					510		
Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	Leu	Gln	Thr	Gly	Lys	Trp	Gln	Asn	Ile
		515					520					525			
Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Ser	Pro	Glu	Ala	Ile	Lys	Glu	Val	Ser	Asn	Thr
	530					535					540				
Phe	Ile	Thr	Ile	Met	Gln	Asn	His	Thr	Gln	Asp	Gly	Asp	Arg	Tyr	Ala
545					550					555					560
Tyr	Met	Met	Leu	Pro	Asn	Met	Thr	Arg	Gln	Glu	Phe	Glu	Thr	Tyr	Ile
				565				570						575	
Ser	Lys	Leu	Asp	Ile	Asp	Leu	Leu	Glu	Asn	Asn	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala
		580						585					590		
Val	Tyr	Asp	His	Asp	Ser	Gln	Gln	Met	His	Val	Ile	His	Tyr	Glu	Lys
		595					600					605			
Lys	Ala	Thr	Met	Phe	Ser	Asn	His	Asn	Leu	Ser	His	Gln	Gly	Phe	Tyr
	610					615					620				
Ser	Phe	Pro	His	Pro	Val	Lys	Gln	Asn	Gln	Gln					
625					630					635					

<210> 91

<211> 828

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotipo M12 (cepa MGAS9)

<220>

10 <223> Hialuronano liasa

<400> 91

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

Phe Val Pro Asp Pro Thr Arg Phe Arg Val Arg Ala Ala Asn Phe Ser
 260 265 270
 Pro Phe Glu Ala Ser Ser Gly Asn Leu Ile Asp Met Gly Arg Val Lys
 275 280 285
 Leu Ile Ser Gly Ile Leu Arg Lys Asp Asp Leu Glu Ile Ser Asp Thr
 290 295 300
 Ile Lys Ala Ile Glu Lys Val Phe Thr Leu Val Asp Glu Gly Asn Gly
 305 310 315 320
 Phe Tyr Gln Asp Gly Ser Leu Ile Asp His Val Val Thr Asn Ala Gln
 325 330 335
 Ser Pro Leu Tyr Lys Lys Gly Ile Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn
 340 345 350
 Val Leu Ile Asp Gly Leu Ser Gln Leu Ile Pro Ile Ile Gln Lys Thr
 355 360 365
 Lys Ser Pro Ile Glu Ala Asp Lys Met Ala Thr Ile Tyr His Trp Ile
 370 375 380
 Asn His Ser Phe Phe Pro Ile Ile Val Arg Gly Glu Met Met Asp Met
 385 390 395 400
 Thr Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Phe Asn Ala Gln Ser His Val Ala
 405 410 415
 Gly Ile Glu Ala Leu Arg Ala Ile Leu Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu
 420 425 430
 Glu Pro His Arg Leu Ala Leu Lys Thr Arg Ile Lys Thr Leu Val Thr
 435 440 445
 Gln Gly Asn Ala Phe Tyr Asn Val Tyr Asp Asn Leu Lys Thr Tyr His
 450 455 460
 Asp Ile Lys Leu Met Lys Glu Leu Leu Ser Asp Thr Ser Val Pro Val
 465 470 475 480
 Gln Lys Leu Asp Ser Tyr Val Ala Ser Phe Asn Ser Met Asp Lys Leu
 485 490 495
 Ala Leu Tyr Asn Asn Lys His Asp Phe Ala Phe Gly Leu Ser Met Phe
 500 505 510
 Ser Asn Arg Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Met Asn Asn Glu Asn Leu His
 515 520 525
 Gly Trp Phe Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Asn Asp Leu
 530 535 540
 Gly His Tyr Ser Glu Asn Tyr Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu
 545 550 555 560
 Pro Gly Thr Thr Glu Thr Glu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu
 565 570 575
 Asn Ile Lys Thr Asn Tyr Gln Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp
 580 585 590
 Asp Ala Phe Val Ala Ser Lys Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala
 595 600 605
 Ala Met Thr Phe Thr Asn Trp Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly
 610 615 620
 Trp Phe Ile Leu Gly Asn Lys Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys
 625 630 635 640
 Asn Gln Ser Ser His Lys Ala Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu
 645 650 655
 Asn Gln Lys His Pro Tyr Cys Ser Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp
 660 665 670
 Leu Asn Asn Gln Leu Val Asp Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu
 675 680 685
 Glu Ser Asp Asp Pro Ala Gln Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro
 690 695 700
 Thr Thr Leu Ser Ile Ser Lys Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn
 705 710 715 720
 Ile Lys Ala Asp Asp Lys Ser Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn
 725 730 735
 Thr Phe Ile Thr Ile Met Gln Asn His Thr Gln Asp Gly Asp Arg Tyr
 740 745 750
 Ala Tyr Met Met Leu Pro Asn Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr
 755 760 765
 Ile Ser Lys Leu Asp Ile Asp Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala
 770 775 780
 Ala Val Tyr Asp His Asp Ser Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Glu
 785 790 795 800
 Lys Lys Ala Thr Met Phe Ser Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe
 805 810 815
 Tyr Ser Phe Pro His Pro Val Lys Gln Asn Gln Gln
 820 825

ES 2 634 669 T3

<210> 92
 <211> 828
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyogenes serotipo M28

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 92

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

ES 2 634 669 T3

				340					345					350		
Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Leu	Ser	Gln	Leu	Ile	Pro	Ile	Ile	Gln	Lys	Thr	
		355					360					365				
Lys	Ser	Ser	Ile	Glu	Ala	Asp	Lys	Met	Ala	Thr	Ile	Tyr	His	Trp	Ile	
	370					375					380					
Asn	His	Ser	Phe	Phe	Pro	Ile	Ile	Val	Arg	Gly	Glu	Met	Met	Asp	Met	
385					390					395				400		
Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	Phe	Asn	Ala	Gln	Ser	His	Val	Ala	
				405				410						415		
Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Ile	Leu	Arg	Ile	Ala	Asp	Met	Ser	Glu	
			420					425					430			
Glu	Pro	His	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Thr	Arg	Ile	Lys	Thr	Leu	Val	Thr	
	435						440					445				
Gln	Gly	Asn	Ala	Phe	Tyr	Asn	Val	Tyr	Asp	Asn	Leu	Lys	Thr	Tyr	His	
	450					455					460					
Asp	Ile	Lys	Leu	Met	Lys	Glu	Leu	Leu	Ser	Asp	Thr	Ser	Val	Pro	Val	
465					470					475				480		
Gln	Lys	Leu	Asp	Ser	Tyr	Val	Ala	Ser	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Lys	Leu	
				485					490					495		
Ala	Leu	Tyr	Asn	Asn	Lys	His	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu	Ser	Met	Phe	
			500					505					510			
Ser	Asn	Arg	Thr	Gln	Asn	Tyr	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	His	
	515						520					525				
Gly	Trp	Phe	Thr	Ser	Asp	Gly	Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asn	Asp	Leu	
	530					535					540					
Gly	His	Tyr	Ser	Glu	Asn	Tyr	Trp	Ala	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Arg	Leu	
545					550					555				560		
Pro	Gly	Thr	Thr	Glu	Thr	Glu	Gln	Lys	Pro	Leu	Glu	Gly	Thr	Pro	Glu	
				565					570					575		
Asn	Ile	Lys	Thr	Asn	Tyr	Gln	Gln	Val	Gly	Met	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp	
			580					585					590			
Asp	Ala	Phe	Val	Ala	Ser	Lys	Lys	Leu	Asn	Asn	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala	
	595						600					605				
Ala	Met	Thr	Phe	Thr	Asn	Trp	Asn	Lys	Ser	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Gly	
	610					615						620				
Trp	Phe	Ile	Leu	Gly	Asn	Lys	Ile	Ile	Phe	Val	Gly	Ser	Asn	Ile	Lys	
625					630				635					640		
Asn	Gln	Ser	Ser	His	Lys	Ala	Tyr	Thr	Thr	Ile	Glu	Gln	Arg	Lys	Glu	
				645						650				655		
Asn	Gln	Lys	His	Pro	Tyr	His	Ala	Tyr	Val	Asn	Asn	Gln	Pro	Val	Asp	
			660					665					670			
Leu	Asn	Asn	Gln	Leu	Val	Asp	Phe	Thr	Asn	Thr	Lys	Ser	Ile	Phe	Leu	
	675															

<210> 93
<211> 522
<212> PRT
<213> Streptococcus suis

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 93

Met	Gly	Phe	Phe	Ile	Ser	Gln	Ser	Lys	Gln	His	Tyr	Gly	Ile	Arg	Lys
1				5					10					15	
Tyr	Lys	Val	Gly	Val	Cys	Ser	Ala	Leu	Ile	Ala	Leu	Ser	Ile	Leu	Gly
			20					25					30		
Thr	Arg	Val	Ala	Ala	Asn	Gln	Leu	Pro	Ser	Thr	Glu	Thr	Ala	Ser	Pro
		35					40					45			
Gln	Ser	Ser	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Thr	Pro	Glu	Thr	Thr	Glu	Ala	Val
	50					55					60				
Asn	Leu	Thr	Thr	Glu	Ala	Val	Met	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Ser	Glu	Val
65					70					75					80
Ser	Pro	Val	Thr	Ser	Thr	Glu	Thr	Gln	Pro	Ser	Ser	Thr	Ala	Ala	Glu
				85					90					95	
Thr	Leu	Ala	Ser	Pro	Gln	Ala	Val	Gln	Ala	Thr	Lys	Glu	Glu	Glu	Lys
			100					105					110		
Asn	Leu	Val	Ala	Asn	Gly	Glu	Phe	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Ala	Ser	Gly
		115					120					125			
Asn	Trp	Ala	Asp	Pro	Ala	Ala	Thr	Asn	Trp	Glu	Thr	Trp	Ile	Pro	Ala
	130					135					140				
Asn	Val	Lys	Lys	Glu	Asn	Gly	Gln	Val	Arg	Ile	Asp	Glu	Gly	Arg	Leu
145					150					155					160
His	Ile	Ser	Ser	Thr	Ala	Ser	Tyr	Arg	Val	Ala	Val	His	Gln	Thr	Val
				165					170					175	
Asp	Val	Asp	Pro	Asn	Lys	Arg	Tyr	Leu	Phe	Ser	Tyr	Asn	Val	Glu	Thr
		180						185					190		
Lys	Asp	Leu	Lys	Gly	Ser	Gly	Val	Arg	Val	Arg	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr
	195						200					205			
Ala	Glu	Gly	Lys	Asp	Leu	Ser	Pro	Gln	Glu	Phe	Ala	Tyr	Thr	Pro	Tyr
	210					215					220				
Lys	Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Glu	His	Ile	Glu	Gln	Ile	Leu	Thr	Val	Ser
225					230					235					240
Pro	Glu	Thr	Arg	Lys	Leu	Lys	Val	Glu	Leu	Phe	Phe	Glu	Asn	Ser	Val
				245					250					255	
Gly	Gln	Ala	Trp	Leu	Asp	Asn	Ile	Ser	Leu	Val	Glu	Tyr	Val	Glu	Lys
		260						265					270		
Thr	Pro	Glu	Thr	Pro	Glu	Pro	Ser	Leu	Glu	Leu	Val	Gln	Pro	Glu	Thr
		275					280					285			
Gly	Gln	Ile	Ser	Leu	Ala	Ser	Asn	Lys	Val	Tyr	Leu	Pro	Val	Arg	Pro
	290					295					300				
Asp	Leu	Thr	Tyr	Arg	Ile	Ala	Asp	Ala	Ala	Val	Ala	Ile	Val	Glu	Lys
305					310					315					320
Asn	Met	Ile	Arg	Pro	Leu	Ala	Ala	Gly	Lys	Thr	Gln	Val	Asp	Val	Tyr
				325					330					335	
Asp	Lys	Asp	Thr	Lys	Leu	Ser	Ser	Phe	Glu	Leu	Thr	Val	Thr	Glu	His
		340						345					350		
Gln	Ala	Thr	Val	Phe	Asp	Thr	Leu	Arg	Asn	Asn	Trp	Glu	Asp	Ile	Ser
		355					360					365			
Leu	Ala	Asn	Lys	Arg	Tyr	Gln	Ser	Asn	Asp	Thr	Gln	Met	Lys	Ala	Phe
		370				375					380				
Leu	Gly	Arg	Leu	Asp	Ala	Gly	Val	Ala	Ser	Ser	Leu	Lys	Lys	Trp	Val
385					390					395					400
Glu	Pro	Thr	Asn	Gln	Gly	Lys	Thr	Ile	Phe	Asn	Asp	Ile	Asp	Phe	Ser
				405					410					415	
Lys	Ser	Ser	His	Leu	Thr	Thr	Val	Tyr	Arg	Arg	Leu	Glu	Gln	Met	Ala
			420					425					430		
Gln	Val	Val	Glu	Asn	Pro	Asp	Ser	Ala	Tyr	Tyr	His	Asp	Arg	Ser	Leu
		435					440					445			
Ile	Asp	Leu	Val	Arg	Lys	Gly	Met	Asn	Trp	Leu	Tyr	Thr	Asn	Val	Tyr
	450					455					460				
Asn	Glu	Asn	Lys	Ser	Ile	Asp	Gly	Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly
465					470					475					480
Thr	Pro	Arg	Ala	Val	Val	Asn	Thr	Leu	Ile	Tyr	Met	His	Pro	Tyr	Phe
				485					490					495	
Ser	Gln	Glu	Glu	Ile	Leu	Thr	Tyr	Thr	Lys	Pro	Ile	Ser	Lys	Phe	Val
			500					505					510		
Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Ile	Ser	Val	Lys	His						
			515				520								

<210> 94
 <211> 1164
 <212> PRT
 <213> Streptococcus suis

5

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 94

10

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

Gly	Lys	Thr	Gln	Val	Asp	Val	Tyr	Asp	Lys	Asp	Thr	Lys	Leu	Ser	Ser
			325						330					335	
Phe	Glu	Leu	Ile	Val	Thr	Glu	His	Gln	Ala	Thr	Val	Phe	Asp	Thr	Leu
			340					345					350		
Arg	Asn	Asn	Trp	Glu	Asp	Ile	Ser	Leu	Ala	Asn	Lys	Arg	Tyr	Gln	Ser
		355				360						365			
Asn	Asp	Ala	Gln	Met	Lys	Ala	Phe	Leu	Gly	Arg	Leu	Asp	Ala	Gly	Val
	370				375						380				
Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Lys	Trp	Val	Glu	Pro	Thr	Glu	Gln	Ser	Lys	Thr
385					390					395					400
Ile	Phe	Asn	Asp	Ile	Asp	Phe	Ser	Lys	Ser	Ser	His	Leu	Thr	Thr	Val
			405						410						415
Tyr	Arg	Arg	Leu	Glu	Gln	Met	Ala	Gln	Val	Val	Glu	Asn	Pro	Asp	Ser
			420					425					430		
Ala	Tyr	Tyr	His	Asp	Arg	Ser	Leu	Ile	Asp	Leu	Val	Arg	Lys	Gly	Met
	435						440					445			
Asn	Trp	Leu	Tyr	Ala	Asn	Val	Tyr	Asn	Glu	Asn	Lys	Ser	Ile	Asp	Gly
	450					455					460				
Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly	Thr	Ser	Arg	Ala	Val	Val	Asn	Thr
465					470					475					480
Leu	Ile	Tyr	Met	His	Pro	Tyr	Phe	Ser	Gln	Glu	Glu	Ile	Leu	Thr	Tyr
			485						490						495
Thr	Lys	Pro	Ile	Ser	Lys	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Ile	Arg	Lys
			500					505					510		
Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Val	Pro	Ala	Val	Gly	Gly	Asn	Gln	Thr	Asp	Leu
	515						520					525			
Ser	Lys	Val	Ala	Ile	Leu	Glu	Gly	Ala	Leu	Arg	Glu	Asp	Ala	Asp	Arg
	530					535					540				
Val	Arg	Ala	Gly	Ala	Gln	Gly	Leu	Thr	Thr	Ile	Met	Lys	Phe	Val	Asp
545					550					555					560
Lys	Gly	Glu	Gly	Phe	Tyr	Arg	Asp	Gly	Ser	Phe	Ile	Asp	His	Thr	Asn
			565					570						575	
Val	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Glu	Gly	Phe	Ser
			580					585					590		
Gln	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Gln	Pro	Thr	Glu	Phe	Ala	Leu	Lys	Glu	Glu
	595						600					605			
Gln	Thr	Asn	Ile	Leu	Tyr	Glu	Trp	Ile	Glu	Lys	Ala	Phe	Met	Pro	Ile
	610					615					620				
Leu	Val	Arg	Gly	Glu	Leu	Met	Asp	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser
625					630					635					640
Arg	Ala	Thr	Gly	Glu	Ser	His	Val	Gln	Ala	Met	Glu	Ile	Leu	Arg	Ser
			645						650					655	
Leu	Val	Arg	Ile	Ala	Glu	Ser	Ala	Gln	Pro	Glu	Gln	Lys	Thr	Lys	Leu
			660					665				670			
Leu	Ser	Phe	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Thr	Ser	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asp	Ser
	675						680				685				
Tyr	Arg	Ser	Leu	Lys	Ser	Tyr	Lys	Asp	Ile	Asp	Leu	Val	Asn	Lys	Leu
	690					695					700				
Leu	Ala	Asp	Asn	Gln	Ile	Pro	Ala	Glu	Val	Asp	Lys	Asp	Tyr	Ile	Ala
705					710					715					720
Ala	Phe	Asn	Asn	Met	Asp	Lys	Phe	Val	Tyr	Arg	Ser	Ala	Gln	Glu	Gly
			725						730				735		
Phe	Thr	Phe	Ala	Leu	Ser	Met	Tyr	Ser	Ser	Arg	Thr	Gln	Asn	Tyr	Glu
			740					745					750		
Asp	Met	Asn	Asn	Glu	Asn	Arg	Lys	Gly	Trp	Tyr	Thr	Ala	Asp	Gly	Met
	755						760					765			
Val	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	His	Tyr	Ser	Asn	His	Tyr	Trp
	770					775					780				
Ala	Thr	Val	Asp	Pro	Tyr	Arg	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Asp
785					790					795					800
Lys	Arg	Glu	Asp	Gly	Ser	Gly	Glu	Val	Thr	Leu	Ala	Ser	Asp	Phe	Val
			805						810					815	
Gly	Ala	Ser	Gln	Leu	Gly	Asn	Arg	Leu	Ala	Thr	Ile	Ala	Met	Asp	Phe

820							825							830							
Asn	Asn	Trp	Asn	Asn	Ser	Leu	Thr	Ala	Arg	Lys	Ala	Trp	Ile	Val	Leu						
835							840							845							
Gly	Asn	Lys	Ile	Val	Phe	Leu	Gly	Thr	Asp	Ile	Gln	His	Gln	Ser	Ala						
850							855							860							
Gln	Gly	Ala	Glu	Thr	Thr	Ile	Glu	Asn	Arg	Lys	Leu	Leu	Thr	Gly	Glu						
865								870							875						
Lys	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Asn	Gly	Gln	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Glu						
885							890							895							
Val	Val	Thr	Asp	Lys	Thr	Gln	Ser	Phe	Tyr	Met	Thr	Asn	Gly	Lys	Asp						
900							905							910							
Asn	Gln	Ser	Ile	Gly	Tyr	Val	Phe	Leu	Asn	Gln	Leu	Pro	Thr	His	Ala						
915							920							925							
Lys	Leu	Asp	Gln	Arg	Thr	Gly	Lys	Trp	Ser	Asp	Ile	Asn	Tyr	Asn	Gln						
930							935							940							
Ser	Lys	Glu	Glu	Val	Ser	Asn	Ser	Phe	Val	Ser	Leu	Trp	His	Glu	His						
945								950							955						
Ala	Gln	Thr	Ser	Ser	Asn	Tyr	Ala	Tyr	Val	Leu	Val	Pro	Asn	Gln	Ser						
965							970							975							
Met	Glu	Lys	Val	Asn	Gln	Ala	Ala	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Leu	His	Gln						
980							985							990							
Asp	Arg	Asp	Leu	Gln	Val	Val	Tyr	Asp	Gln	Glu	Gln	Asn	Val	Trp	Gly						
995							1000							1005							
Val	Val	Lys	Tyr	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr	Lys	Leu	Thr	Asp	Asp	Ile	Thr						
1010							1015							1020							
Leu	Thr	Asp	Ala	Gly	Leu	Tyr	Thr	Ile	Gln	Lys	Val	Glu	Gly	Gly	Tyr						
1025							1030							1035							
Arg	Ile	Ala	Phe	Tyr	Asn	Pro	Ser	Thr	Arg	Thr	Val	Lys	Asn	Gly	Ile						
1045							1050							1055							
Glu	Leu	Thr	Lys	Ala	Gly	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Glu	Met	Glu	Pro	Thr						
1060							1065							1070							
Ala	Ala	Tyr	Pro	Ser	Thr	Val	Trp	Lys	Val	Thr	Met	Pro	Glu	Gly	Ser						
1075							1080							1085							
Asp	Lys	Gln	Thr	Gly	Ser	Val	Glu	Lys	Thr	Glu	Lys	Glu	Glu	Lys	Gln						
1090							1095							1100							
Leu	Lys	Glu	Asn	Gln	Pro	Ser	Ser	Glu	Val	Lys	Gln	Val	Val	His	His						
1105							1110							1115							
Ala	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln	Thr	Gly						
1125							1130							1135							
Glu	Glu	Ala	Ser	Leu	Gly	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Thr	Leu	Gly						
1140							1145							1150							
Ala	Val	Val	Asp	Phe	Lys	Cys	Arg	Arg	Ser	His	Ser										
1155							1160														

<210> 95
<211> 1164
<212> PRT
<213> Streptococcus suis

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 95

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

ES 2 634 669 T3

65					70					75				80	
Thr	Gln	Pro	Ser	Ser	Thr	Thr	Ala	Glu	Thr	Leu	Ala	Ser	Pro	Gln	Ala
				85					90					95	
Val	Gln	Ala	Thr	Lys	Glu	Glu	Lys	Asn	Leu	Val	Ala	Asn	Gly	Glu	Phe
			100					105					110		
Ile	Ser	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser	Gly	Asn	Trp	Lys	Glu	Leu	Ala	Ala	Thr
		115					120					125			
Asn	Trp	Glu	Thr	Trp	Ile	Pro	Ala	Asn	Val	Lys	Lys	Glu	Asn	Gly	Gln
	130					135					140				
Val	Arg	Ile	Asp	Glu	Gly	Arg	Leu	His	Ile	Ser	Ser	Thr	Ala	Ser	Tyr
	145				150					155					160
Arg	Val	Ala	Val	His	Gln	Thr	Val	Asp	Val	Asp	Pro	Asn	Lys	Arg	Tyr
			165						170					175	
Leu	Phe	Ser	Tyr	Asp	Val	Glu	Thr	Lys	Asp	Leu	Lys	Gly	Ser	Gly	Val
			180					185					190		
Arg	Val	Arg	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ala	Glu	Gly	Lys	Asp	Leu	Ser	Pro
		195				200						205			
Gln	Glu	Phe	Ala	Tyr	Thr	Pro	Tyr	Lys	Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Glu	His
	210					215					220				
Ile	Glu	Gln	Ile	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Glu	Thr	Arg	Lys	Leu	Lys	Val
	225				230					235					240
Glu	Leu	Phe	Phe	Glu	Asn	Ser	Val	Gly	Gln	Ala	Trp	Leu	Asp	Asn	Ile
			245					250					255		
Ser	Leu	Val	Glu	Tyr	Val	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Thr	Pro	Glu	Gln	Ser
		260					265					270			
Pro	Glu	Leu	Val	Gln	Pro	Glu	Thr	Gly	Gln	Ile	Ser	Leu	Ala	Ser	Asn
	275					280						285			
Lys	Val	Tyr	Leu	Pro	Val	Arg	Pro	Asp	Leu	Thr	Tyr	Arg	Ile	Ala	Asp
	290					295					300				
Ala	Ala	Val	Ala	Thr	Val	Glu	Lys	Asn	Met	Ile	Arg	Pro	Leu	Ala	Ala
	305				310					315					320
Gly	Lys	Thr	Gln	Val	Asp	Val	Tyr	Asp	Lys	Asp	Thr	Lys	Leu	Ser	Ser
			325						330					335	
Phe	Glu	Leu	Ile	Val	Thr	Glu	His	Gln	Ala	Thr	Val	Phe	Asp	Thr	Leu
			340					345					350		
Arg	Asn	Asn	Trp	Glu	Asp	Ile	Ser	Leu	Ala	Asn	Lys	Arg	Tyr	Gln	Ser
		355				360						365			
Asn	Asp	Ala	Gln	Met	Lys	Ala	Phe	Leu	Gly	Arg	Leu	Asp	Ala	Gly	Val
	370					375					380				
Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Lys	Trp	Val	Glu	Pro	Thr	Glu	Gln	Ser	Lys	Thr
	385				390					395					400
Ile	Phe	Asn	Asp	Ile	Asp	Phe	Ser	Lys	Ser	Ser	His	Leu	Thr	Thr	Val
			405						410					415	
Tyr	Arg	Arg	Leu	Glu	Gln	Met	Ala	Gln	Val	Val	Glu	Asn	Pro	Asp	Ser
			420					425					430		
Ala	Tyr	Tyr	His	Asp	Arg	Ser	Leu	Ile	Asp	Leu	Val	Arg	Lys	Gly	Met
		435				440						445			
Asn	Trp	Leu	Tyr	Thr	Asn	Val	Tyr	Asn	Glu	Asn	Lys	Ser	Ile	Asp	Gly
	450					455					460				
Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly	Thr	Pro	Arg	Ala	Val	Val	Asn	Thr
	465				470					475				480	
Leu	Ile	Tyr	Met	His	Pro	Tyr	Phe	Ser	Gln	Glu	Glu	Ile	Leu	Thr	Tyr
			485						490					495	
Thr	Lys	Pro	Ile	Ser	Lys	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Ile	Arg	Lys
		500						505					510		
Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Val	Pro	Ala	Val	Gly	Gly	Asn	Gln	Thr	Asp	Leu
		515					520					525			
Ser	Lys	Val	Ala	Ile	Leu	Glu	Gly	Ala	Leu	Arg	Glu	Asp	Ala	Asp	Arg
	530					535					540				
Val	Arg	Ala	Gly	Ala	Gln	Gly	Leu	Thr	Thr	Ile	Met	Lys	Phe	Val	Asp
	545				550					555					560
Lys	Gly	Glu	Gly	Phe	Tyr	Arg	Asp	Gly	Ser	Phe	Ile	Asp	His	Thr	Asn
				565					570					575	

```

Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val Leu Ile Glu Gly Phe Ser
580 585 590
Gln Leu Leu Pro Val Ile Gln Pro Thr Glu Phe Ala Leu Lys Glu Glu
595 600 605
Gln Thr Asn Ile Leu Tyr Glu Trp Ile Glu Lys Ala Phe Met Pro Ile
610 615 620
Leu Val Arg Gly Glu Leu Met Asp Met Thr Arg Gly Arg Ser Ile Ser
625 630 635 640
Arg Ala Thr Gly Glu Ser His Val Gln Ala Met Glu Ile Leu Arg Ser
645 650 655
Leu Val Arg Ile Ala Glu Ser Ala Gln Pro Glu Gln Lys Thr Lys Leu
660 665 670
Leu Ser Phe Val Lys Ala Gln Leu Thr Ser Asp Thr Phe Tyr Asp Ser
675 680 685
Tyr Arg Ser Leu Lys Ser Tyr Lys Asp Ile Asp Leu Val Asn Lys Leu
690 695 700
Leu Ala Asp Asn Gln Ile Pro Ala Glu Val Asp Lys Asp Tyr Ile Ala
705 710 715 720
Ala Phe Asn Asn Met Asp Lys Phe Val Tyr Arg Ser Ala Gln Glu Gly
725 730 735
Phe Thr Phe Ala Leu Ser Met Tyr Ser Ser Arg Thr Gln Asn Tyr Glu
740 745 750
Asp Met Asn Asn Glu Asn Arg Lys Gly Trp Tyr Thr Ala Asp Gly Met
755 760 765
Val Tyr Leu Tyr Asn Asp Asp Leu Ser His Tyr Ser Asn His Tyr Trp
770 775 780
Ala Thr Val Asp Pro Tyr Arg Leu Pro Gly Thr Thr Thr Lys Asp
785 790 795 800
Lys Arg Glu Asp Gly Ser Gly Glu Val Thr Leu Ala Ser Asp Phe Val
805 810 815
Gly Ala Ser Gln Leu Gly Asn Arg Leu Ala Thr Ile Ala Met Asp Phe
820 825 830
Asn Asn Trp Asn Asn Ser Leu Thr Ala Arg Lys Ala Trp Ile Val Leu
835 840 845
Gly Asn Lys Ile Val Phe Leu Gly Thr Asp Ile Gln His Gln Ser Ala
850 855 860
Gln Gly Ala Glu Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Leu Leu Thr Gly Glu
865 870 875 880
Lys Tyr Ser Tyr Tyr Ile Asn Gly Gln Pro Val Asp Leu Ser Lys Glu
885 890 895
Val Val Thr Asp Lys Thr Gln Ser Phe Tyr Met Thr Asn Gly Lys Asp
900 905 910
Asn Gln Ser Ile Gly Tyr Val Phe Leu Asn Gln Leu Pro Thr His Ala
915 920 925
Lys Leu Asp Gln Arg Thr Gly Lys Trp Ser Asp Ile Asn Tyr Asn Gln
930 935 940
Ser Lys Glu Glu Val Ser Asn Ser Phe Val Ser Leu Trp His Glu His
945 950 955 960
Ala Gln Thr Ser Ser Asn Tyr Ala Tyr Val Leu Val Pro Asn Gln Ser
965 970 975
Met Glu Lys Val Asn Gln Ala Ala Ala Ser Val Lys Leu Leu His Gln
980 985 990
Asp Arg Asp Leu Gln Val Val Tyr Asp Gln Glu Gln Asn Val Trp Gly
995 1000 1005
Val Val Lys Tyr Thr Asp Thr Ala Tyr Lys Leu Thr Asp Asp Ile Thr
1010 1015 1020
Leu Thr Asp Ala Gly Leu Tyr Thr Ile Gln Lys Val Glu Gly Gly Tyr
1025 1030 1035 1040
Arg Ile Ala Phe Tyr Asn Pro Ser Thr Arg Thr Val Lys Asn Gly Ile
1045 1050 1055
Glu Leu Thr Lys Ala Gly Ser Ser Leu Thr Val Glu Met Glu Pro Thr
1060 1065 1070
Ala Ala Tyr Pro Ser Thr Val Trp Lys Val Thr Met Pro Glu Gly Ser

```

1075	1080	1085
Asp Lys Gln Thr Gly Ser Val Glu Lys Thr Glu Lys Glu Glu Lys Gln		
1090	1095	1100
Leu Lys Glu Asn Gln Pro Ser Ser Glu Val Lys Gln Val Val His His		
1105	1110	1115
Ala Ala Glu Lys Thr Lys Pro Ser Lys Pro Arg Leu Pro Gln Thr Gly		
1125	1130	1135
Glu Glu Ala Ser Leu Gly Leu Gly Phe Leu Gly Leu Leu Thr Leu Gly		
1140	1145	1150
Ala Val Val Asp Phe Lys Cys Arg Arg Ser His Ser		
1155	1160	

<210> 96
 <211> 802
 <212> PRT
 <213> *Vibrio fischeri* (cepa ATCC 700601 / ES114)

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 96

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

				325					330					335	
Met	Val	Asn	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	Ser	Ala	Glu	Gln	Asn	His	Asp
			340					345					350		
Val	Gly	Leu	Asn	Ile	Val	Asn	Ser	Met	Leu	Phe	Tyr	Thr	Asn	Gly	Pro
		355					360					365			
Asp	Ser	Asp	Lys	Asn	Lys	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Ile	Lys	Thr	Gln	Ile
		370				375					380				
Thr	Asp	Asp	Thr	Tyr	Gln	Asn	Phe	Phe	Asp	Lys	Ile	Tyr	Tyr	Val	Ser
385					390					395				400	
Thr	Tyr	Gln	Ala	Ala	Gln	His	Ile	Val	Asn	Asp	Pro	Thr	Val	Ser	Leu
			405						410					415	
Lys	Asp	Pro	Leu	Ile	Gly	Asn	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ser	Met	Asp	Arg	Ile
			420					425					430		
Val	His	Arg	Arg	Thr	Asp	Trp	Ala	Phe	Ala	Leu	Ala	Met	His	Ser	Tyr
		435					440					445			
Arg	Ile	Gly	Asn	Tyr	Glu	Cys	Met	Asn	Gly	Glu	Asn	Leu	Lys	Gly	Trp
		450				455					460				
Phe	Thr	Gly	Asp	Gly	Met	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asp	Gln	Leu	Asp	His
465					470					475				480	
Tyr	Thr	Gly	Tyr	Trp	Pro	Thr	Val	Asn	Ala	Ser	Arg	Met	Pro	Gly	Thr
			485						490					495	
Thr	Val	Asp	Ser	Gln	Ile	Met	Ala	Asp	Cys	Ser	Gly	Glu	Arg	Val	Gly
			500					505					510		
Gly	Asn	Val	Asn	Thr	Asn	Met	Gln	Trp	Val	Gly	Ser	Thr	Ser	Leu	Asn
		515					520					525			
Asn	Tyr	Gly	Ile	Ala	Gly	Met	Gln	Phe	Tyr	Asn	Trp	Ser	Asp	Thr	Leu
		530				535					540				
Ser	Ala	Tyr	Lys	Ser	Trp	Phe	Met	Phe	Asp	Asn	Glu	Val	Val	Met	Leu
545					550					555				560	
Gly	Ser	Asn	Ile	Lys	Asp	Gln	Ser	Asn	Ala	Asn	Asn	Ile	Thr	Thr	Ile
			565						570					575	
Glu	Asn	Arg	Lys	Arg	Leu	Ala	Glu	Thr	Lys	Leu	Phe	Ile	Asp	Gly	Thr
			580					585					590		
Glu	Gln	Ala	Ala	Leu	Pro	Tyr	Gln	Gly	Ala	Pro	Ala	Thr	Phe	Ser	Ile
		595					600					605			
Arg	Asn	Lys	Thr	Leu	Ala	Asn	Ser	Asp	Leu	Ser	Tyr	Val	Met	Leu	Thr
		610				615					620				
Pro	Lys	Thr	Ile	Ser	Ile	Ser	Gln	Asn	Asp	Val	Asp	Gly	Asn	Trp	Ser
625					630					635				640	
Asp	Ile	Gly	Asn	Ser	Lys	Gly	Asp	Val	Ser	Asp	Ser	Tyr	Leu	Gln	Ala
			645						650					655	
Thr	Leu	Thr	Gln	Val	Asp	Gln	Ala	Asp	Tyr	Gln	Tyr	Ala	Leu	Leu	Pro
			660					665					670		
Asn	Gln	Asn	Asn	Asp	Thr	Val	Gln	Asn	Tyr	Ala	Gln	His	Pro	Asp	Val

<210> 97
<211> 517
<212> PRT
<213> Synechococcus sp. (cepa RCC307)

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 97

```

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

Gln Leu Asn Gln Leu Pro Arg Gln Gln Trp Ala Glu Tyr Phe Asp Gly
435      440      445
Pro Thr Gly Thr Trp Val Gly Gln Gln Ala Arg Ile Asn Gln Thr Trp
450      455      460
Thr Ile Val Gly Phe Leu Leu His His Leu Met Arg Lys Ala Pro
465      470      475      480
Gln Asp Val Lys Leu Leu Asp Leu Asp Asp Val Gly Pro Leu Arg Leu
485      490      495
Ser Phe Gln Asp Gln His Glu Lys Ser Ser Thr Asp Glu Arg Lys Ser
500      505      510
Phe Leu Lys Asn Tyr
515

```

<210> 98
 <211> 1021
 <212> PRT
 <213> Proteus vulgaris

5

<220>
 <223> condroitin-sulfato-ABC endoliasa

<400> 98

10

```

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

```

Asn Leu Asn Ser Gln Asp Lys Gln Leu Phe Asp Asn Tyr Val Ile Leu
      325      330      335
Gly Asn Tyr Thr Thr Leu Met Phe Asn Ile Ser Arg Ala Tyr Val Leu
      340      345      350
Glu Lys Asp Pro Thr Gln Lys Ala Gln Leu Lys Gln Met Tyr Leu Leu
      355      360      365
Met Thr Lys His Leu Leu Asp Gln Gly Phe Val Lys Gly Ser Ala Leu
      370      375      380
Val Thr Thr His His Trp Gly Tyr Ser Ser Arg Trp Trp Tyr Ile Ser
      385      390      395      400
Thr Leu Leu Met Ser Asp Ala Leu Lys Glu Ala Asn Leu Gln Thr Gln
      405      410      415
Val Tyr Asp Ser Leu Leu Trp Tyr Ser Arg Glu Phe Lys Ser Ser Phe
      420      425      430
Asp Met Lys Val Ser Ala Asp Ser Ser Asp Leu Asp Tyr Phe Asn Thr
      435      440      445
Leu Ser Arg Gln His Leu Ala Leu Leu Leu Leu Glu Pro Asp Asp Gln
      450      455      460
Lys Arg Ile Asn Leu Val Asn Thr Phe Ser His Tyr Ile Thr Gly Ala
      465      470      475      480
Leu Thr Gln Val Pro Pro Gly Gly Lys Asp Gly Leu Arg Pro Asp Gly
      485      490      495
Thr Ala Trp Arg His Glu Gly Asn Tyr Pro Gly Tyr Ser Phe Pro Ala
      500      505      510
Phe Lys Asn Ala Ser Gln Leu Ile Tyr Leu Leu Arg Asp Thr Pro Phe
      515      520      525
Ser Val Gly Glu Ser Gly Trp Asn Asn Leu Lys Lys Ala Met Val Ser
      530      535      540
Ala Trp Ile Tyr Ser Asn Pro Glu Val Gly Leu Pro Leu Ala Gly Arg
      545      550      555      560
His Pro Phe Asn Ser Pro Ser Leu Lys Ser Val Ala Gln Gly Tyr Tyr
      565      570      575
Trp Leu Ala Met Ser Ala Lys Ser Ser Pro Asp Lys Thr Leu Ala Ser
      580      585      590
Ile Tyr Leu Ala Ile Ser Asp Lys Thr Gln Asn Glu Ser Thr Ala Ile
      595      600      605
Phe Gly Glu Thr Ile Thr Pro Ala Ser Leu Pro Gln Gly Phe Tyr Ala
      610      615      620
Phe Asn Gly Gly Ala Phe Gly Ile His Arg Trp Gln Asp Lys Met Val
      625      630      635      640
Thr Leu Lys Ala Tyr Asn Thr Asn Val Trp Ser Ser Glu Ile Tyr Asn
      645      650      655
Lys Asp Asn Arg Tyr Gly Arg Tyr Gln Ser His Gly Val Ala Gln Ile
      660      665      670
Val Ser Asn Gly Ser Gln Leu Ser Gln Gly Tyr Gln Gln Glu Gly Trp
      675      680      685
Asp Trp Asn Arg Met Glu Gly Ala Thr Thr Ile His Leu Pro Leu Lys
      690      695      700
Asp Leu Asp Ser Pro Lys Pro His Thr Leu Met Gln Arg Gly Glu Arg
      705      710      715      720
Gly Phe Ser Gly Thr Ser Ser Leu Glu Gly Gln Tyr Gly Met Met Ala
      725      730      735
Phe Asn Leu Ile Tyr Pro Ala Asn Leu Glu Arg Phe Asp Pro Asn Phe
      740      745      750
Thr Ala Lys Lys Ser Val Leu Ala Ala Asp Asn His Leu Ile Phe Ile
      755      760      765
Gly Ser Asn Ile Asn Ser Ser Asp Lys Asn Lys Asn Val Glu Thr Thr
      770      775      780
Leu Phe Gln His Ala Ile Thr Pro Thr Leu Asn Thr Leu Trp Ile Asn
      785      790      795      800
Gly Gln Lys Ile Glu Asn Met Pro Tyr Gln Thr Thr Leu Gln Gln Gly
      805      810      815
Asp Trp Leu Ile Asp Ser Asn Gly Asn Gly Tyr Leu Ile Thr Gln Ala

```


820							825							830						
Glu	Lys	Val	Asn	Val	Ser	Arg	Gln	His	Gln	Val	Ser	Ala	Glu	Asn	Lys					
835							840							845						
Asn	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu	Gly	Asn	Phe	Ser	Ser	Ala	Trp	Ile	Asp	His					
850							855							860						
Ser	Thr	Arg	Pro	Lys	Asp	Ala	Ser	Tyr	Glu	Tyr	Met	Val	Phe	Leu	Asp					
865							870							875						
Ala	Thr	Pro	Glu	Lys	Met	Gly	Glu	Met	Ala	Gln	Lys	Phe	Arg	Glu	Asn					
885							890							895						
Asn	Gly	Leu	Tyr	Gln	Val	Leu	Arg	Lys	Asp	Lys	Asp	Val	His	Ile	Ile					
900							905							910						
Leu	Asp	Lys	Leu	Ser	Asn	Val	Thr	Gly	Tyr	Ala	Phe	Tyr	Gln	Pro	Ala					
915							920							925						
Ser	Ile	Glu	Asp	Lys	Trp	Ile	Lys	Lys	Val	Asn	Lys	Pro	Ala	Ile	Val					
930							935							940						
Met	Thr	His	Arg	Gln	Lys	Asp	Thr	Leu	Ile	Val	Ser	Ala	Val	Thr	Pro					
945							950							955						
Asp	Leu	Asn	Met	Thr	Arg	Gln	Lys	Ala	Ala	Thr	Pro	Val	Thr	Ile	Asn					
965							970							975						
Val	Thr	Ile	Asn	Gly	Lys	Trp	Gln	Ser	Ala	Asp	Lys	Asn	Ser	Glu	Val					
980							985							990						
Lys	Tyr	Gln	Val	Ser	Gly	Asp	Asn	Thr	Glu	Leu	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr					
995							1000							1005						
Phe	Gly	Ile	Pro	Gln	Glu	Ile	Lys	Leu	Ser	Pro	Leu	Pro								
1010							1015							1020						

<210> 99
<211> 684
<212> PRT
<213> Pedobacter heparinus

<220>
<223> Condroitin AC liasa

<400> 99

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

210	215	220
Gly Val Leu Lys Leu Ala Asn Tyr Val Arg Asp Thr Pro Tyr Ala Leu		
225	230	235
Ser Thr Glu Lys Leu Ala Ile Phe Ser Lys Tyr Tyr Arg Asp Ser Tyr		
	245	250
Leu Lys Ala Ile Arg Gly Ser Tyr Met Asp Phe Asn Val Glu Gly Arg		
	260	265
Gly Val Ser Arg Pro Asp Ile Leu Asn Lys Lys Ala Glu Lys Lys Arg		
	275	280
Leu Leu Val Ala Lys Met Ile Asp Leu Lys His Thr Glu Trp Ala		
	290	295
Asp Ala Ile Ala Arg Thr Asp Ser Thr Val Ala Ala Gly Tyr Lys Ile		
305	310	315
Glu Pro Tyr His His Gln Phe Trp Asn Gly Asp Tyr Val Gln His Leu		
	325	330
Arg Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Val Arg Met Val Ser Lys Arg Thr Arg		
	340	345
Arg Ser Glu Ser Gly Asn Lys Glu Asn Leu Leu Gly Arg Tyr Leu Ser		
	355	360
Asp Gly Ala Thr Asn Ile Gln Leu Arg Gly Pro Glu Tyr Tyr Asn Ile		
	370	375
Met Pro Val Trp Glu Trp Asp Lys Ile Pro Gly Ile Thr Ser Arg Asp		
385	390	395
Tyr Leu Thr Asp Arg Pro Leu Thr Lys Leu Trp Gly Glu Gln Gly Ser		
	405	410
Asn Asp Phe Ala Gly Gly Val Ser Asp Gly Val Tyr Gly Ala Ser Ala		
	420	425
Tyr Ala Leu Asp Tyr Asp Ser Leu Gln Ala Lys Lys Ala Trp Phe Phe		
	435	440
Phe Asp Lys Glu Ile Val Cys Leu Gly Ala Gly Ile Asn Ser Asn Ala		
	450	455
Pro Glu Asn Ile Thr Thr Leu Asn Gln Ser Trp Leu Asn Gly Pro		
465	470	475
Val Ile Ser Thr Ala Gly Lys Thr Gly Arg Gly Lys Ile Thr Thr Phe		
	485	490
Lys Ala Gln Gly Gln Phe Trp Leu Leu His Asp Ala Ile Gly Tyr Tyr		
	500	505
Phe Pro Glu Gly Ala Asn Leu Ser Leu Ser Thr Gln Ser Gln Lys Gly		
	515	520
Asn Trp Phe His Ile Asn Asn Ser His Ser Lys Asp Glu Val Ser Gly		
	530	535
Asp Val Phe Lys Leu Trp Ile Asn His Gly Ala Arg Pro Glu Asn Ala		
545	550	555
Gln Tyr Ala Tyr Ile Val Leu Pro Gly Ile Asn Lys Pro Glu Glu Ile		
	565	570
Lys Lys Tyr Asn Gly Thr Ala Pro Lys Val Leu Ala Asn Thr Asn Gln		
	580	585
Leu Gln Ala Val Tyr His Gln Gln Leu Asp Met Val Gln Ala Ile Phe		
	595	600
Tyr Thr Ala Gly Lys Leu Ser Val Ala Gly Ile Glu Ile Glu Thr Asp		
	610	615
Lys Pro Cys Ala Val Leu Ile Lys His Ile Asn Gly Lys Gln Val Ile		
625	630	635
Trp Ala Ala Asp Pro Leu Gln Lys Glu Lys Thr Ala Val Leu Ser Ile		
	645	650
Arg Asp Leu Lys Thr Gly Lys Thr Asn Arg Val Lys Ile Asp Phe Pro		
	660	665
Gln Gln Glu Phe Ala Gly Ala Thr Val Glu Leu Lys		
	675	680

<210> 100
 <211> 844
 <212> PRT
 <213> Victivallis vadensis ATCC BAA-548

<220>
 <223> Condroitin AC liasa

<400> 100

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

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

<210> 101
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> Pan troglodytes

<220>
 <223> PH20 de Chimpancé

<400> 101

Met	Gly	Val	Leu	Lys	Phe	Lys	His	Ile	Phe	Phe	Arg	Ser	Phe	Val	Lys
1					5				10					15	

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

<210> 102
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Macaca mulatta

<220>
 <223> PH20 de Mono Rhesus

<400> 102

```

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

```

<210> 103

<211> 505
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<220>
<223> Precursor de HuPH20 1-505

<400> 103

```

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

```

10

				325					330					335		
Val	Ile	Trp	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu	
			340					345					350			
Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn	
		355					360					365				
Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln	
	370					375					380					
Gly	Val	Cys	Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu	
385					390					395					400	
Asn	Pro	Asp	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr	
			405					410						415		
Val	Arg	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys	
			420				425						430			
Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp	
	435					440						445				
Val	Lys	Asp	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Cys	
	450					455					460					
Ile	Asp	Ala	Phe	Leu	Lys	Pro	Pro	Met	Glu	Thr	Glu	Glu	Pro	Gln	Ile	
465					470					475					480	
Phe	Tyr	Asn	Ala	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Thr	Met	Phe	Ile	Val	
			485						490					495		
Ser	Ile	Leu	Phe	Leu	Ile	Ile	Ser	Ser								
		500						505								

<210> 104
<211> 503
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor de HuPH20 1-503

<400> 104

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


```

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

```

<210> 105

<211> 501

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-501

<400> 105

```

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

```

```

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

```

<210> 106
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-499

<400> 106

```

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

```

ES 2 634 669 T3

[illegible]

<210> 107
<211> 497
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor de HuPH20 1-497

<400> 107

```

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

Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
      450      455      460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
      465      470      475      480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
      485      490      495
Ser

```

5

<210> 108
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-495

5

<400> 108

```

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
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
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165      170      175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180      185      190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195      200      205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210      215      220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225      230      235
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245      250      255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260      265      270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275      280      285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290      295      300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305      310      315
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325      330      335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340      345      350

Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355      360      365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370      375      380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385      390      395
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
405      410      415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
420      425      430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435      440      445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450      455      460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465      470      475
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile
485      490      495

```

ES 2 634 669 T3

<210> 109
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-493

10

<400> 109

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

Ala	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val
		275					280					285			
Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr
	290					295					300				
Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu
305					310					315					320
Leu	Val	Tyr	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile
				325					330					335	
Val	Ile	Trp	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu
		340						345				350			
Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn
		355				360						365			
Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln
	370					375					380				
Gly	Val	Cys	Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu
385					390					395					400
Asn	Pro	Asp	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr
				405					410					415	
Val	Arg	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys
		420						425				430			
Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp
		435				440						445			
Val	Lys	Asp	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Cys
	450					455					460				
Ile	Asp	Ala	Phe	Leu	Lys	Pro	Pro	Met	Glu	Thr	Glu	Glu	Pro	Gln	Ile
465					470					475					480
Phe	Tyr	Asn	Ala	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Thr	Met			
				485					490						

<210> 110
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-489

<400> 110

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		

ES 2 634 669 T3

```

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

```

<210> 111
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-489

<400> 111

```

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

```


ES 2 634 669 T3

```

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

```

<210> 112
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-490

<400> 112

```

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

```

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

<210> 113

<211> 487

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-487

10

<400> 113

```

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

```

5

<210> 114
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-485

<400> 114

5

```

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

```

<210> 115
 <211> 484
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-484

<400> 115

10

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

```

      290              295              300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305              310              315              320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
      325              330              335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
      340              345              350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
      355              360              365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
      370              375              380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385              390              395              400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
      405              410              415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
      420              425              430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
      435              440              445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
      450              455              460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465              470              475              480
Phe Tyr Asn Ala

```

<210> 116

<211> 476

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-476

<400> 116

```

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 2 634 669 T3

210		215		220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn				
225		230		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		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		400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr				
	405		410	415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys				
	420		425	430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp				
	435		440	445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys				
	450		455	460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu				
465		470		475

<210> 117

<211> 475

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-475

<400> 117

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

```

145          150          155          160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr
465          470          475

```

<210> 118
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-474

<400> 118

```

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												
Gly	Ile	Pro	Gln	Lys	Ile	Ser	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Asp	Lys	Ala	Lys
			115												
Lys	Asp	Ile	Thr	Phe	Tyr	Met	Pro	Val	Asp	Asn	Leu	Gly	Met	Ala	Val
			130												
Ile	Asp	Trp	Glu	Glu	Trp	Arg	Pro	Thr	Trp	Ala	Arg	Asn	Trp	Lys	Pro
145															
Lys	Asp	Val	Tyr	Lys	Asn	Arg	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Asn
			165												
Val	Gln	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Ala	Thr	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Glu	Phe
			180												
Glu	Lys	Ala	Gly	Lys	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Leu	Gly	Lys
			195												
Leu	Leu	Arg	Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys
			210												
Tyr	Asn	His	His	Tyr	Lys	Lys	Pro	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ser	Cys	Phe	Asn
225															
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser
			245												
Thr	Ala	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Gln	Gln	Ser	Pro	Val
			260												
Ala	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val
			275												
Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr
			290												
Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu
305															
Leu	Val	Tyr	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile
			325												
Val	Ile	Trp	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu
			340												
Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn
			355												
Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln
			370												
Gly	Val	Cys	Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu
385															
Asn	Pro	Asp	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr
			405												
Val	Arg	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys
			420												
Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp
			435												
Val	Lys	Asp	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Cys
			450												
Ile	Asp	Ala	Phe	Leu	Lys	Pro	Pro	Met	Glu						
			465												
			470												

<210> 119

<211> 473

<212> PRT

<213> Homo sapiens

$\langle 220 \rangle$

<223> Precursor de HuPH20 1-473

<400> 119

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	Gln	
			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	
					375					380						

<210> 100
<211> 844
<212> PRT
<213> *Victivallis vadensis* ATCC BAA-548

<220>
<223> Condroitin AC liasa

<400> 100

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

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

<210> 101
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> Pan troglodytes

<220>
 <223> PH20 de Chimpancé

<400> 101

Met	Gly	Val	Leu	Lys	Phe	Lys	His	Ile	Phe	Phe	Arg	Ser	Phe	Val	Lys
1					5				10					15	

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

<210> 102
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Macaca mulatta

<220>
 <223> PH20 de Mono Rhesus

5

10

<400> 102

```

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

```

<210> 103

<211> 505
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<220>
<223> Precursor de HuPH20 1-505

<400> 103

```

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

```

10

				325					330					335			
Val	Ile	Trp	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu		
			340					345					350				
Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn		
		355						360				365					
Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln		
		370				375					380						
Gly	Val	Cys	Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu		
385					390					395					400		
Asn	Pro	Asp	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr		
				405					410					415			
Val	Arg	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys		
			420					425					430				
Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp		
		435					440					445					
Val	Lys	Asp	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Cys		
		450				455					460						
Ile	Asp	Ala	Phe	Leu	Lys	Pro	Pro	Met	Glu	Thr	Glu	Glu	Pro	Gln	Ile		
465					470					475					480		
Phe	Tyr	Asn	Ala	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Thr	Met	Phe	Ile	Val		
				485					490					495			
Ser	Ile	Leu	Phe	Leu	Ile	Ile	Ser	Ser									
			500					505									

<210> 104
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-503

<400> 104

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


```

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

```

<210> 105

<211> 501

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-501

10

<400> 105

```

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

```

```

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

```

<210> 106
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-499

<400> 106

```

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

```

ES 2 634 669 T3

[illegible]

<210> 107
<211> 497
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor de HuPH20 1-497

<400> 107

```

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

Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450      455      460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465      470      475      480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
485      490      495
Ser

```

5

<210> 108
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-495

5

<400> 108

```

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
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
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165      170      175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180      185      190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195      200      205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210      215      220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225      230      235
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245      250      255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260      265      270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275      280      285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290      295      300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305      310      315
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325      330      335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340      345      350

Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355      360      365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370      375      380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385      390      395
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
405      410      415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
420      425      430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435      440      445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450      455      460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465      470      475
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile
485      490      495

```

ES 2 634 669 T3

<210> 109
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-493

10

<400> 109

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

Ala	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val
		275					280					285			
Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr
	290					295					300				
Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu
305					310					315					320
Leu	Val	Tyr	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile
				325					330					335	
Val	Ile	Trp	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu
		340						345				350			
Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn
		355				360						365			
Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln
	370					375					380				
Gly	Val	Cys	Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu
385					390					395					400
Asn	Pro	Asp	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr
				405					410					415	
Val	Arg	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys
		420						425				430			
Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp
		435				440						445			
Val	Lys	Asp	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Cys
	450					455				460					
Ile	Asp	Ala	Phe	Leu	Lys	Pro	Pro	Met	Glu	Thr	Glu	Glu	Pro	Gln	Ile
465					470					475					480
Phe	Tyr	Asn	Ala	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Thr	Met			
				485					490						

<210> 110
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-489

<400> 110

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		

ES 2 634 669 T3

```

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

```

<210> 111
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-489

<400> 111

```

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

```


ES 2 634 669 T3

```

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

```

<210> 112
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-490

<400> 112

```

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

```

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

<210> 113

<211> 487

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-487

10

<400> 113

```

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

```

5

<210> 114
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-485

<400> 114

5

```

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

      370      375      380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385      390      395      400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
405      410      415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
420      425      430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435      440      445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450      455      460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465      470      475      480
Phe Tyr Asn Ala Ser
      485

```

<210> 115
 <211> 484
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-484

<400> 115

10

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

```

      290              295              300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305              310              315              320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
      325              330              335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
      340              345              350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
      355              360              365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
      370              375              380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385              390              395              400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
      405              410              415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
      420              425              430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
      435              440              445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
      450              455              460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465              470              475              480
Phe Tyr Asn Ala

```

<210> 116

<211> 476

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-476

<400> 116

```

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 2 634 669 T3

210		215		220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn				
225		230		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		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		400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr				
	405		410	415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys				
	420		425	430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp				
	435		440	445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys				
	450		455	460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu				
465		470		475

<210> 117

<211> 475

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-475

<400> 117

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

```

145          150          155          160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr
465          470          475

```

<210> 118
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-474

<400> 118

```

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

```


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

<210> 119

<211> 473

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-473

<400> 119

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	Gln	
			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	
					375						3					

<210> 120
<211> 472
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor de HuPH20 1-472

<400> 120

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

5 <210> 121
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
<223> Precursor de HuPH20 1-471

<400> 121

```

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
465      470

```

5

<210> 122

<211> 470

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-470

<400> 122

5

```

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

Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340      345      350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355      360      365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370      375      380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385      390      395      400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
405      410      415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
420      425      430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435      440      445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450      455      460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys
465      470

```

10

<210> 123

<211> 469

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

5 <223> Precursor de HuPH20 1-469

<400> 123

```

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
 465

```

10

<210> 124
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-468

<400> 124

10

```

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

```

ES 2 634 669 T3

```

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

```

<210> 125
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-466

<400> 125

```

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

```


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

<210> 126

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-465

<400> 126

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
465

<210> 127

<211> 464

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-464

<400> 127

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15

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

<210> 128
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-462

<400> 128

Met	Gly	Val	Leu	Lys	Phe	Lys	His	Ile	Phe	Phe	Arg	Ser	Phe	Val	Lys	1	5	10	15
Ser	Ser	Gly	Val	Ser	Gln	Ile	Val	Phe	Thr	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Cys	20	25	30	35
Cys	Leu	Thr	Leu	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn	Val	Pro	40	45	50	55
Phe	Leu	Trp	Ala	Trp	Asn	Ala	Pro	Ser	Glu	Phe	Cys	Leu	Gly	Lys	Phe	60	65	70	75
Asp	Glu	Pro	Leu	Asp	Met	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Ile	Gly	Ser	Pro	Arg	80	85	90	95
Ile	Asn	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	Val	Thr	Ile	Phe	Tyr	Val	Asp	Arg	Leu	100	105	110	115
Gly	Tyr	Tyr	Pro	Tyr	Ile	Asp	Ser	Ile	Thr	Gly	Val	Thr	Val	Asn	Gly	120	125	130	135
Gly	Ile	Pro	Gln	Lys	Ile	Ser	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Asp	Lys	Ala	Lys	140	145	150	155
Lys	Asp	Ile	Thr	Phe	Tyr	Met	Pro	Val	Asp	Asn	Leu	Gly	Met	Ala	Val	160	165	170	175
Ile	Asp	Trp	Glu	Glu	Trp	Arg	Pro	Thr	Trp	Ala	Arg	Asn	Trp	Lys	Pro	180	185	190	195
Lys	Asp	Val	Tyr	Lys	Asn	Arg	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	200	205	210	215
Val	Gln	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Ala	Thr	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Glu	Phe	220	225	230	235
Glu	Lys	Ala	Gly	Lys	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Leu	Gly	Lys	240	245	250	255
Leu	Leu	Arg	Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys	260	265	270	275
Tyr	Asn	His	His	Tyr	Lys	Lys	Pro	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ser	Cys	Phe	Asn	280	285	290	295
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser	300	305	310	315
Thr	Ala	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Gln	Gln	Ser	Pro	Val	320	325	330	335
Ala	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val	340	345	350	355
Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr	360	365	370	375
Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu	380	385	390	395
Leu	Val	Tyr	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	400	405	410	415
Val	Ile	Trp	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu	420	425	430	435
Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn	440	445	450	455
Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln	460	465	470	475
Gly	Val	Cys	Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu	480	485	490	495
Asn	Pro	Asp	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr	500	505	510	515
Val	Arg	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys	520	525	530	535
Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp	540	545	550	555
Val	Lys	Asp	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly			560	565	570	575

<210> 129

<211> 460

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-460

10

<400> 129

ES 2 634 669 T3

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

5 <210> 130
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-458

<400> 130

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

5

<210> 131
<211> 456
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<220>
<223> Precursor de HuPH20 1-456

<400> 131

```

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

325      330      335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340      345      350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355      360      365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370      375      380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385      390      395      400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
405      410      415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
420      425      430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435      440      445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp
450      455

```

5

<210> 132

<211> 454

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-454

<400> 132

```

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

```

<210> 133

<211> 452

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-452

<400> 133

```

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
      450

```

<210> 134

<211> 450

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-450

<400> 134

5

```

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

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

```

10

<210> 135

<211> 508

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-508

5

<400> 135

```

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

```

```

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

```

<210> 136
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-506

<400> 136

```

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

```

ES 2 634 669 T3

	35					40					45					
Phe 50	Leu	Trp	Ala	Trp	Asn 55	Ala	Pro	Ser	Glu	Phe 60	Cys	Leu	Gly	Lys	Phe 80	
Asp 65	Glu	Pro	Leu	Asp	Met 70	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe 75	Ile	Gly	Ser	Pro	Arg 80	
Ile	Asn	Ala	Thr	Gly 85	Gln	Gly	Val	Thr	Ile 90	Phe	Tyr	Val	Asp	Arg 95	Leu	
Gly	Tyr	Tyr	Pro 100	Tyr	Ile	Asp	Ser	Ile 105	Thr	Gly	Val	Thr	Val	Asn 110	Gly	
Gly	Ile	Pro	Gln	Lys	Ile	Ser	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Asp	Lys	Ala	Lys	
Lys	Asp	Ile	Thr	Phe	Tyr	Met 135	Pro	Val	Asp	Asn	Leu	Gly	Met	Ala	Val	
Ile 145	Asp	Trp	Glu	Glu	Trp 150	Arg	Pro	Thr	Trp	Ala 155	Arg	Asn	Trp	Lys	Pro 160	
Lys	Asp	Val	Tyr	Lys 165	Asn	Arg	Ser	Ile	Glu 170	Leu	Val	Gln	Gln	Gln 175	Asn	
Val	Gln	Leu	Ser 180	Leu	Thr	Glu	Ala	Thr 185	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Glu	Phe	
Glu	Lys	Ala	Gly	Lys	Asp	Phe	Leu	Val 200	Glu	Thr	Ile	Lys	Leu	Gly	Lys	
Leu	Leu	Arg	Pro	Asn	His	Leu 215	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu 220	Phe	Pro	Asp	Cys	
Tyr 225	Asn	His	His	Tyr	Lys 230	Lys	Pro	Gly	Tyr	Asn 235	Gly	Ser	Cys	Phe	Asn 240	
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Asn 245	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser	
Thr	Ala	Leu	Tyr 260	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu 265	Asn	Thr	Gln	Gln	Ser	Pro	Val	
Ala	Ala	Thr 275	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg 280	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val	
Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys 295	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr	
Arg 305	Ile	Val	Phe	Thr	Asp 310	Gln	Val	Leu	Lys	Phe 315	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu	
Leu	Val	Tyr	Thr	Phe 325	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	
Val	Ile	Trp	Gly 340	Thr	Leu	Ser	Ile	Met 345	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu	
Leu	Leu	Asp 355	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile 360	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn	
Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met 375	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln	
Gly 385	Val	Cys	Ile	Arg	Lys 390	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser 395	Asp	Tyr	Leu	His	Leu	
Asn	Pro	Asp	Asn	Phe 405	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys 410	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr	
Val	Arg	Gly	Lys 420	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp 425	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys	
Phe	Tyr	Cys 435	Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu 440	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp	
Val	Lys	Asp 450	Thr	Asp	Ala	Val	Asp 455	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Cys	
Ile 465	Asp	Ala	Phe	Leu	Lys 470	Pro	Pro	Met	Glu	Thr 475	Glu	Glu	Pro	Gln	Ile	
Phe	Tyr	Asn	Ala	Ser 485	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala 490	Thr	Met	Phe	Ile	Val	
Ser	Ile	Leu	Phe 500	Leu	Ile	Ile	Ser	Ser 505	Val							

<210> 137
<211> 504
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor de HuPH20 1-504

<400> 137

```

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

Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450      455      460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465      470      475      480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
      485      490      495
Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser
      500

```

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-502

5

<400> 138

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

ES 2 634 669 T3

```

Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
    355                      360          365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370                      375          380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                      390          395          400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
    405                      410          415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
    420                      425          430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
    435                      440          445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                      455          460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                      470          475          480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
    485                      490          495
Ser Ile Leu Phe Leu Ile
    500

```

<210> 139

<211> 500

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-500

<400> 139

```

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

```



```

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

```

<210> 140
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-498

<400> 140

```

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

```

```

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

```

<210> 141
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-496

<400> 141

```

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

```

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

<210> 142
 <211> 494
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-494

<400> 142

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

485

490

5 <210> 143
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>

ES 2 634 669 T3

<223> Precursor de HuPH20 1-492

<400> 143

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

<210> 144

<211> 488
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-488

<400> 144

```

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

10

```

          325          330          335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
          340          345          350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
          355          360          365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
          370          375          380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
          385          390          395          400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
          405          410          415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
          420          425          430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
          435          440          445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
          450          455          460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
          465          470          475          480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr
          485

```

<210> 145
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-486

<400> 145

```

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

```

ES 2 634 669 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
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro
                485

```

<210> 146

<211> 472

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HuPH20 madura 36-507

<400> 146

```

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

```


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

<210> 147
<211> 470
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 madura 36-505

<400> 147

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

ES 2 634 669 T3

				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														

<210> 148
<211> 468
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 madura 36-503

<400> 148

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

ES 2 634 669 T3

[illegible]

<210> 149
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 madura 36-501
<400> 149

```

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

```

<210> 150

<211> 464

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HuPH20 madura 36-499

<400> 150

```

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

Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
 420      425      430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
 435      440      445
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu
 450      455      460

```

5

<210> 151

<211> 462

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> esHuPH20 36-497

ES 2 634 669 T3

<400> 151

```

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

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

```

5

<210> 152

<211> 460

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<220>

<223> esHuPH20 36-495

<400> 152

```

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

Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
 325      330      335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
 340      345      350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
 355      360      365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
 370      375      380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
 385      390      395      400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
 405      410      415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
 420      425      430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
 435      440      445
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile
 450      455      460

```

5

<210> 153

<211> 458

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> esHuPH20 36-493

<400> 153

```

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

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

```

5

<210> 154

<211> 456

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> esHuPH20 36-491

<400> 154

```

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

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

```

5

<210> 155

<211> 454

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> HuPH20 madura 36-489

<400> 155

```

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

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

```

5

<210> 156

<211> 455

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> HuPH20 madura 36-490

<400> 156

```

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

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

```

5

<210> 157

<211> 452

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> HuPH20 madura 36-487

<400> 157

```

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

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

```

5

<210> 158

<211> 450

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> HuPH20 madura 36-485

<400> 158

```

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

```

5

<210> 159

<211> 449

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> HuPH20 madura 36-484

<400> 159

```

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

```

5 <210> 160
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-476

<400> 160

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

435

440

5

<210> 161
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <223> HuPH20 madura 36-475

15

<400> 161

ES 2 634 669 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
                                435                                440

```

5 <210> 162
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-474
 <400> 162

ES 2 634 669 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
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
 85      90      95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
100      105      110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
115      120      125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130      135      140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145      150      155
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
165      170      175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
180      185      190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
195      200      205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
210      215      220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225      230      235
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
245      250      255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
260      265      270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
275      280      285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
290      295      300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305      310      315
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
325      330      335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
340      345      350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
355      360      365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
370      375      380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385      390      395
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
405      410      415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
420      425      430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu
435

```

5 <210> 163
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-473
 <400> 163

ES 2 634 669 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
 435

```

5 <210> 164
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-472
 <400> 164

ES 2 634 669 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
 435

```

5 <210> 165
 <211> 436
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-471
 <400> 165

ES 2 634 669 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
 435

```

5 <210> 166
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-470
 <400> 166

ES 2 634 669 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
 435

```

5 <210> 167
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-469
 <400> 167

ES 2 634 669 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

```

5 <210> 168
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-468
 <400> 168

```

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

```

5 <210> 169
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-466
 <400> 169

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

5 <210> 170
 <211> 430
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-465

 <400> 170


```

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
 420      425      430

```

5 <210> 171
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-464
 <400> 171

ES 2 634 669 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
      420      425

```

5 <210> 172
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-462
 <400> 172

ES 2 634 669 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
420      425

```

5 <210> 173
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-460
 <400> 173

ES 2 634 669 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
 420      425

```

5 <210> 174
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-458
 <400> 174

```

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

```

5 <210> 175
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-456
 <400> 175

ES 2 634 669 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
      420

```

5 <210> 176
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-454
 <400> 176

ES 2 634 669 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

```

5 <210> 177
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-452
 <400> 177

15 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															

<210> 178
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> HuPH20 madura 36-450
 <400> 178

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp

ES 2 634 669 T3

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

<210> 179

<211> 473

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HuPH20 madura 36-508

<400> 179

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp

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

<210> 180
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> HuPH20 madura 36-506

<400> 180

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

5

<210> 181
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<220>

<223> HuPH20 madura 36-504

<400> 181

```

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

Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
 385      390      395      400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
 405      410      415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
 420      425      430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
 435      440      445
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu
 450      455      460
Phe Leu Ile Ile Ser
 465

```

5

<210> 182

<211> 467

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HuPH20 madura 36-502

5

<400> 182

```

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

Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
 325      330      335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
 340      345      350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
 355      360      365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
 370      375      380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
 385      390      395      400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
 405      410      415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
 420      425      430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
 435      440      445
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu
 450      455      460
Phe Leu Ile
 465

```

10

<210> 183
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> HuPH20 madura 36-500

<400> 183

10

```

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

ES 2 634 669 T3

```

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

```

<210> 184
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> HuPH20 madura 36-498

<400> 184

```

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

```

ES 2 634 669 T3

```

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
    450                455                460

```

<210> 185

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> esHuPH20 36-496

<400> 185

```

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

```



```

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

```

<210> 186
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> esHuPH20 36-494

<400> 186

```

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

```

ES 2 634 669 T3

```

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

```

<210> 187
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> esHuPH20 36-492

<400> 187

```

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

```

ES 2 634 669 T3

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

<210> 188
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> HuPH20 madura 36-488

<400> 188

```

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

```

<210> 189

<211> 451

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HuPH20 madura 36-486

<400> 189

```

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

```

450

REIVINDICACIONES

1. Un liposoma multivesicular (LMV) que comprende una enzima de degradación de hialuronano, en donde el LMV comprende:

un lípido neutro;
un lípido anfipático; y
una enzima de degradación de hialuronano, en donde la concentración de la enzima de degradación de hialuronano está entre o entre aproximadamente 0,1 mg/mL y 1 mg/mL.

2. El liposoma multivesicular de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente ácido hialurónico.

3. Un liposoma multivesicular (LMV), que comprende:

un lípido neutro;
un lípido anfipático;
una enzima de degradación de hialuronano; y
ácido hialurónico.

4. El liposoma multivesicular de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la enzima de degradación de hialuronano es una hialuronidasa, una condroitinasa o una liasa.

5. El liposoma multivesicular de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la enzima de degradación de hialuronano es una hialuronidasa que es una hialuronidasa PH20.

6. El liposoma multivesicular de la reivindicación 5, en donde la hialuronidasa PH20 se selecciona entre polipéptidos que contienen la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de los SEC ID NO: 4-9 y 47-48, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de los SEQ ID NO: 4-9 y 47-48.

7. El liposoma multivesicular de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde:

la enzima de degradación de hialuronano se modifica por conjugación con un polímero; o
la enzima de degradación de hialuronano está conectada, directa o indirectamente, a una marca o a un radical detectable.

8. El liposoma multivesicular de cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en donde:

el LMV contiene ácido hialurónico; y
la concentración de ácido hialurónico es de, o está entre, 0,05 mg/mL y 50 mg/mL.

9. El liposoma multivesicular de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el lípido neutro es un diglicérido o un triglicérido.

10. El liposoma multivesicular de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el lípido anfipático es un fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), fosfatidilserina (PS), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomielina o diaciltrimetilamoniopropano (DITAP).

11. El liposoma multivesicular de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende adicionalmente uno o ambos de dipalmitoilfosforilglicerol (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol o DPPG) o colesterol.

12. El liposoma multivesicular de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende un agente terapéutico.

13. Un liposoma multivesicular de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, preparado mediante un procedimiento u obtenible mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

a) formar un primer componente acuoso que comprende una enzima de degradación de hialuronano a una concentración inferior a 2 mg/mL;
b) formar un componente lipídico que comprende al menos un disolvente orgánico, al menos un lípido anfipático y al menos un lípido neutro;
c) formar una emulsión a partir del primer componente acuoso y del componente lipídico;
d) dispersar la emulsión en un segundo componente acuoso para formar esférulas de disolvente; y
e) separar el disolvente orgánico de las esférulas de disolvente para formar liposomas multivesiculares suspendidos en el segundo componente acuoso, en donde el liposoma multivesicular resultante comprende de

0,1 mg/mL a 1 mg/mL de la enzima de degradación de hialuronano.

14. El liposoma multivesicular de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la enzima de degradación de hialuronano está encapsulada.

15. Una composición, que comprende un liposoma multivesicular de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 en un portador farmacéuticamente aceptable.

16. La composición de la reivindicación 15, que comprende un agente terapéutico.

17. Una combinación, que comprende:

una primera composición que comprende una composición de la reivindicación 15; y
una segunda composición que comprende un agente terapéutico.

18. La composición de la reivindicación 16 o combinación de la reivindicación 17, en donde el agente terapéutico es un agente adecuado para tratar la hiperplasia benigna de próstata, en donde el agente se selecciona entre un antiandrógeno, un bloqueador alfa, una toxina botulínica y una enzima hidrolítica.

19. Una composición, que comprende:

una enzima de degradación de hialuronano, en donde:

la concentración de la enzima de degradación de hialuronano es de al menos 50 U/mL; y
la enzima de degradación del hialuronano es una hialuronidasa, una condroitinasa o una liasa; y

ácido hialurónico, con lo que la enzima de degradación de hialuronano conserva al menos 50% de la actividad hialuronidasa durante al menos seis meses entre 28°C y 32°C o al menos un año entre 2°C y 8°C.

20. La composición de la reivindicación 19, en donde la enzima de degradación de hialuronano es una hialuronidasa PH20.

21. La composición de la reivindicación 20, en donde la hialuronidasa PH20 se selecciona entre polipéptidos que contienen la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de los SEC ID NO: 4-9 y 47-48, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos 95% de identidad de secuencia con cualquiera de los SEQ ID NO: 4-9 y 47-48.

22. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en donde la enzima de degradación de hialuronano se modifica mediante conjugación con un polímero.

23. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 19-22, en donde:

la concentración de enzima de degradación de hialuronano está entre 100 U/mL y 1000 U/mL; y/o
la concentración de ácido hialurónico está entre aproximadamente 1 mg/mL y 100 mg/mL; y/o
la composición se formula en un volumen entre o aproximadamente entre 0,5 mL y 50 mL.

24. Una composición o combinación de cualquiera de las reivindicaciones 15-23 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada a hialuronano, en donde la enfermedad o afección es la hiperplasia benigna de próstata, el cáncer, presión de disco o edema.